

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

Joana Angélica Barbosa Ferreira

**DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE *SCHINUS
TEREBINTHIFOLIUS* E *CURCUMA LONGA*, DA MATÉRIA PRIMA ATÉ O PRODUTO
FINAL**

Rio de Janeiro

2016

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

Joana Angélica Barbosa Ferreira

**DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SCHINUS
TEREBINTHIFOLIUS E CURCUMA LONGA, DA MATÉRIA PRIMA ATÉ O
PRODUTO FINAL**

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

Orientador: Victor Augustus Marin
Coorientadora: Shirley Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Ferreira, Joana Angélica Barbosa

Determinação da qualidade microbiológica de *Schinus terebinthifolius* e *Curcuma longa*, da matéria prima até o produto final. / Joana Angélica Barbosa Ferreira. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016.

135 f., il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadores: Victor Augustus Marin e Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Plantas Medicinais. 2. Fitoterápico 3. Controle de Qualidade. 4. Boas Práticas de Manipulação.

Determination of microbiological quality of *Schinus terebinthifolius* and *Curcuma longa*, from feedstock to finished product

Joana Angélica Barbosa Ferreira

**DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE *SCHINUS
TEREBINTHIFOLIUS* E *CURCUMA LONGA*, DA MATÉRIA PRIMA ATÉ O PRODUTO
FINAL**

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

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marco Antonio Mota da Silva (Doutor)
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Eliana Rodrigues Machado (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

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

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora) – Coorientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta de trabalho e de estudo. A minha família que soube entender a minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no doutorado, até a conclusão desta tese.

Aos meus queridos e amados marido e filhos, pela ajuda e por agüentarem meus momentos de ansiedade e estresse nos meses em que me dediquei ao doutorado.

Aos meus orientadores Shirley e Victor que me conduziram no desenvolvimento desta tese

A todos os professores e alunos que participaram da pesquisa.

A todos os professores e colaboradores do setor de Não estéreis e do Departamento de Microbiologia que me apoiaram na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela dádiva da minha existência.

Aos meus filhos Rafael Barbosa Ferreira, Thiago Barbosa Ferreira, Yasmin Barbosa de Sant'anna e esposo Carlos Alberto Ferreira, que me deram o exemplo de perseverança e me apoiaram em todas as etapas do caminho.

As amigas e colaboradoras, Priscila Rodrigues de Jesus, Hilda do Nascimento Nóbrega, Jeicyelly de Araujo Costa, Amanda Viegas Valverde e Sandra A.P.M. Fraga pela compreensão e companheirismo.

Aos orientadores Shirley Mello Pereira Abrantes e Victor Augustus Marin pela paciência e empenho na condução e desenvolvimento dos trabalhos.

RESUMO

Este estudo propõe ampliar um novo modelo de controle e monitoramento microbiológico e de boas práticas no pré e pós cultivo das plantas medicinais, *Schinus terebinthifolius*, nos estágios: 1- planta medicinal (folha fresca); 2- material processado (extrato) e 3- produto final (sabonete líquido) para uso no tratamento de tecidos ulcerados da pele e de *Curcuma longa* nos estágios: 1- rizoma (fresco); 2- rizoma (seco); 3- material pré-processado (rizoma triturado) e 4- produto final (pó), para uso no tratamento de diabéticos e hipertensos. As amostras foram provenientes de cinco agricultores de diferentes locais no Estado do Rio de Janeiro. Foi determinado para as mesmas, o número total de bactérias aeróbicas, bolores e leveduras; bactérias Gram-negativas bile tolerantes e a pesquisa de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; *Clostridium* spp., *Shigella* spp; *Bacillus cereus*; *Enterobacter cloacae*; *Serratia marcescens*; *Klebsiella* sp.; *Burkholderia cepacia*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Pseudomonas stutzeri*; *Candida albicans*; *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os estudos foram realizados no período de 2012 - 2015. A metodologia utilizada foi a preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Farmacopéia Brasileira. Observou-se que das 144 amostras de *Curcuma longa*, obtidas no período de 2012 a 2013, 124 amostras (86%) estavam insatisfatórias em todas as 4 fases em relação ao número total de bactérias aeróbicas, bolores e leveduras, bactérias bile tolerantes e quanto a presença de *E. coli*; *Salmonella* spp.; *S. aureus*; *Citrobacter freundii*; *Shigella sonnei*; *Cronobacter sakazakii*; *Klebsiella oxytoca*; *E. cloacae*; *E. aerogenes*; *S. marcescens*; *C. albicans*; *A. flavus* e *A. parasiticus*, e 20 amostras (14%) estavam satisfatórias em todas as fases. Entretanto no período de 2014 a 2015, a maioria das amostras tiveram resultados satisfatórios em todas as fases, com ausência de patógenos. Já as amostras de *Schinus terebinthifolius* na fase 1- planta medicinal (folha fresca) no período de 2013 a 2015 tiveram seus resultados satisfatórios, embora, nas fases extrato aquoso e sabonete líquido no período de 2013 a 2014 estavam insatisfatórias em relação ao número total de bactérias, bolores e leveduras e presença de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pantoeae agglomerans*, *E. cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Brevundimonas diminuta*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Sphingomonas paucimobilis*, ou seja, fora dos parâmetros estabelecidos. Após o estabelecimento de pontos críticos, das boas práticas em todas as fases do processo, tomada de medidas preventivas e corretivas, os resultados demonstraram que houve melhoria da qualidade dos produtos, segundo

os limites microbiológicos estabelecidos pela OMS e Farmacopéia Brasileira. Conclui-se então que a inclusão da avaliação microbiológica durante as fases é de fundamental importância e além disso contribui para uma visão de abrangência, no âmbito da Vigilância Sanitária, com relação a qualidade das Plantas Medicinais e Fitoterápicos, utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), subsidiando intervenções sobre os riscos sanitários e na certificação de matérias primas, garantindo assim a qualidade desde a matéria prima até o produto final (fitoterápico) a ser utilizado pela população.

Palavras chave: Plantas medicinais. Fitoterápico. Qualidade microbiológica. Boas Práticas de Fabricação.

ABSTRACT

This study proposes to extend a new model of control and microbiological monitoring and good practices in the pre, post cultivation of medicinal plants, (*Schinus terebinthifolius*) in stages: 1 medicinal plant (fresh leaf); 2- processed material (extract) and 3- final product (soap liquid) for use in the treatment of ulcerated tissues skin (*Curcuma longa*) Rhizome 1- (fresh); 2 Rhizome (dry); 3 pre-processed material (crushed rhizome); 4- final product (powder), for use in the treatment of diabetics and person sick with hypertension. The samples were from five farmers in different locations of Rio de Janeiro state, was determined for the same, the total number of aerobic bacteria, yeasts and molds; Gram-negative bile tolerant bacteria and the search of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella* spp .; *Staphylococcus aureus*; *Clostridium* spp, *Shigella* spp.; *Bacillus cereus*; *Enterobacter cloacae*; *Serratia marcescens*; *Klebsiella* sp .; *Burkholderia cepacia*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Pseudomonas stutzeri*; *Candida albicans*; *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The studies were conducted in the period 2012 - 2015. The methodology used was based on the World Health Organization and the Brazilian Pharmacopoeia. It was observed that 144 samples of *Curcuma longa* phases: 1- Rhizome (fresh); 2 Rhizome (dry); 3 pre-processed material (crushed rhizome); 4- final product (powder) in the period (2012- 2013), 124 samples were unsatisfactory in all stages to the total number of bacterias aeróbias, molds and yeasts, bili tolerant bacteria and *Escherichia coli*; *Salmonella* spp .; *Staphylococcus aureus*; *Citrobacter freundii*; *Shigella sonnei*; *Cronobacter sakazakii*; *Klebsiella oxytoca*; *Enterobacter cloacae*; *Enterobacter aerogenes*; *Serratia marcescens*; *Candida albicans*; *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, of which 20 samples were satisfactory in all stages. However in the term (2014 - 2015), majority of samples had satisfactory results in all stages, absence of pathogens. On the other hand, the samples of *Schinus terebinthifolius* in phase: 1- medicinal plant (fresh leaf); in the period (2013 - 2015) had their satisfactory results, although the aqueous extract phase and liquid soap in the period (2013-2014) were unsatisfactory compared to the total number of bacteria, yeasts and *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pantoeae agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Brevundimonas diminuta*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Sphingomonas paucimobilis*, outside the established parameters there out of. After critical points stablishement of good practices at all stages of the process, taking

preventive and corrective measures, the results showed improvement of product quality, according to microbiological limits established by the World Health Organization and the Brazilian Pharmacopoeia . So the inclusion of microbiological evaluation during the phases is fundamental importance and furthermore contributes to a view of coverage under the Health Surveillance, regarding the quality of Medicinal Plants and Herbal medicines used by health unic system, supporting interventions about sanitary risks the health and raw materials certification, thus ensuring the quality since raw material up to finished product (herbal medicine) to be used by the population.

Key words: Medicinal plant. Phytotherapy Microbiological quality. Good Manufacturing Practices.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Limites microbiológicos estabelecidos pela OMS para planta e produto final	28
Figura 1. Vista do Parque Estadual da Pedra Branca, onde vivem os agricultores.....	32
Figura 2. Mapa dos locais de cultivo de Curcuma e Schinus.....	33
Figura 3. Coleta de <i>Schinus terebintifolius</i> , aroeira, realizada na propriedade do agricultor MC, da Agrovargem, pelo técnico Rodrigo Marins. Foto cedida pela PAF.....	40
Figura 4. Fase 1- Seleção das folhas frescas de <i>Schinus terebintifolius</i> , aroeira, após a coleta Foto do cedida pela PAF.....	40
Figura 5. Fase 2 Processo de obtenção do extrato aquoso de <i>Schinus terebintifolius</i> : início (folhas selecionadas e água destilada) e extrato finalizado. Foto do cedida pela PAF.....	41
Figura 6. Fase 3 Produto final - Sabonete líquido de Aroeira (<i>Schinus terebintifolius</i>), produzidos por agricultores do projeto Profito embalado e etiquetado.....	41
Figura 7. Fase 1 Rizoma de <i>Curcuma longa</i> fresca	42
Figura 8. Fase 2- <i>Curcuma longa</i> seca a 40°C em estufa de circulação de ar forçado.....	42
Figura 9. Fase 3 - <i>Curcuma longa</i> triturada (pós moagem): após secagem os rizomas passam pelo processo de moagem em moinho de facas, MA008.....	43
Figura 10. Fase 4 - Produto final obtido da <i>Curcuma longa</i> (pó) embalado e etiquetado.....	43
Figura 11. Teste de Verificação da Capacidade Inibitória de produtos não estéreis.....	46
Figura 12. Esquema das diluições.....	49
Figura 13. Exemplo experimental de contagem de colônias.....	50

Figura 14.	Modelo de cálculo de incerteza de resultado.....	51
Figura 15.	Placas de determinação de bactérias Gram-negativas bile tolerantes.....	53
Quadro 2.	Determinação do número mais provável de bactérias por grama.....	54
Figura 16.	Esquema da Pesquisa de patógenos.....	56
Figura 17.	Esquema de Isolamento de colônias distintas para pesquisa específica.....	58
Figura 18.	Coloração de Gram de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que apresentam-se como bastonetes Gram negativos	60
Figura 19.	Prova da oxidase para confirmação de pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
Figura 20.	Prova de Detecção da fluoresceína das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
Figura 21.	Interpretação de oxidação e fermentação de glicose para cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
Figura 22.	Resultado positivo para detecção de piocianina	63
Figura 23.	Provas Bioquímicas complementares para bactérias não fermentadoras de glicose....	65
Figura 24.	Provas Bioquímicas complementares para bactérias não fermentadoras de glicose....	66
Figura 25.	Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em placa de ágar sal manitol positiva	67
Figura 26.	Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em coloração de Gram.....	67
Figura 27.	Prova da DNase para <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Figura 28.	Controles positivo e negativo para prova da coagulase	69

Figura 29. Controle positivo e negativo para prova da catalase	70
Figura 30. Prova da catalase positiva para <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Figura 31. Prova da utilização anaeróbica da glicose positiva	71
Figura 32. Colônias de <i>C. albicans</i> (pretas) em agar Nickerson	72
Figura 33. Colônias de <i>C. albicans</i> em agar Sabourad positivo (colônias brancas)	72
Figura 34. Características Macromorfológicas de colônias de <i>Aspergillus flavus</i> em corante azul de de algodão lactofenol	73
Figura 35. Fotomicroscopia de <i>Aspergillus sp.</i>	73
Figura 36. Características morfológicas de colônias de agar Sabourad com presença de <i>Aspergillus parasiticus</i>	74
Figura 37. Esquema de metodologia para Pesquisa de <i>Clostridium sp.</i>	75
Figura 38. Características macromorfológicas de colônias de <i>Clostridium sp.</i> em agar Columbia.....	75
Figura 39. Macromorfologia de Bastonetes Gram positivos visualizados através da coloração de Gram	76
Figura 40. Endospóros visualizados em coloração de Gram	76
Figura 41. Tubos contendo caldo de enriquecimento para <i>Salmonella</i> Rappaport Vassiliadis	77
Figura 42. Colônias de <i>Salmonella</i> em agar XLD	77
Figura 43. Produção de H ₂ S no meio de SIM.....	78

Figura 44. Sorologia para <i>Salmonella sp.</i>	78
Figura 45. <i>Shigella spp</i> no meio de KIA	79
Figura 46. Macromorfologia de colônias de <i>E.coli</i> em Agar MacConkey	80
Figura 47. Brilho metálico de <i>E.coli</i> no meio de Eosina Azul de Metileno.....	80
Figura 48. Oficina de capacitação com agricultores em Curicica utilizando EPI, e lavagem das embalagens.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites microbianos para produtos não estéreis pela Farmacopéia Brasileira.....	29
Tabela 2. Espécies vegetais utilizadas neste trabalho com o seu nome popular	39
Tabela 3. Espécies trabalhadas, fases da produção, da matéria prima até o produto final.....	39
Tabela 4. Micro-organismos de referência usados como Controles Positivos e/ou Negativos nos diferentes ensaios.....	48
Tabela 5. Determinação do número total de bactérias aeróbias, Fungos e leveduras, Bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de <i>Curcuma longa</i> obtidas de 3 agricultores de localidades diferentes no Estado do Rio de Janeiro.....	84
Tabela 6. Micro-organismos identificados em cada amostra de <i>Curcuma longa</i> obtidas dos 3 agricultores participantes VG/M, PF/J e Q/D nos anos de 2012 a 2015.....	95
Tabela 7. Contagens de bactérias Aeróbias, de bactérias Gram negativa bile tolerantes, bolores e Leveduras das amostras de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidas dos 4 agricultores de localidades diferentes no Estado do Rio de Janeiro no período de 2013 a 2015.....	98
Tabela 8. Micro-organismos identificados de cada amostras de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidos de 4 agricultores de 4 localidades, Vargem Grande (VG), Rio da Prata (RP), Pau da Fome (PF) e Curicica (C), nos anos de 2012 a 2015.....	112

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor VG/M no ano de 2012.....86
- Gráfico 2.** Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor VG/M no ano de 2013.....87
- Gráfico 3.** Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor VG/M no ano de 2014.....88
- Gráfico 4.** Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor VG/M no ano de 2015.....89
- Gráfico 5.** Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor PF/J no ano de 2012.....90
- Gráfico 6.** Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor PF/J no ano de 2013.....91
- Gráfico 7.** Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor PF/J no ano de 2014.....92

Gráfico 8. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de <i>Curcuma longa</i> obtidas do agricultor PF/J no ano de 2015.....	93
Gráfico 9. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de <i>Curcuma longa</i> obtidas do agricultor Q/D no ano de 2013.....	94
Gráfico 10. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidas do agricultor VG/M nos anos de 2013, 2014 e 2015.....	100
Gráfico 11. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de extrato aquoso de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidas do agricultor VG/M nos anos de 2013, 2014 e 2015.....	101
Gráfico 12. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de sabonete de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidas do agricultor VG/M nos anos de 2013, 2014 e 2015.....	102
Gráfico 13. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidas do agricultor RP/E nos anos de 2013, 2014 e 2015.....	103
Gráfico 14. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidas do agricultor RP/E nos anos de 2013, 2014 e 2015.....	104
Gráfico 15. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de <i>Schinus terebinthifolius</i> obtidas do agricultor E de Rio da Prata nos anos de 2013, 2014 e 2015.....	105

Gráfico 16. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor PF/R nos anos de 2013, 2014 e 2015.....106

Gráfico 17. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor RP/E nos anos de 2013, 2014 e 2015.....107

Gráfico 18. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor RP/E nos anos de 2013, 2014 e 2015.....108

Gráfico 19. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas e extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor C/FIO nos anos de 2013, 2014 e 2015.....109

Gráfico 20. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de extrato aquoso e sabonete de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor C/FIO nos anos de 2013, 2014 e 2015.....110

Gráfico 21. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de sabonete de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor C/FIO nos anos de 2013, 2014 e 2015.....111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

C/FIO – Curicica/ Campus da Fiocruz/NGBS

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

EMB – Eosina azul de metileno

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – grama

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

KIA – Agar Ferro de Kliger

mL – mililitro

NGBS – Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAF- Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos

POP – Procedimento Operacional Padronizado

Profito – Projeto de Fitoterápicos

PF/J- Pau da Fome/agricultor J

PF/R – Pau da Fome/agricultor R

Q/D- Queimados/agricultor D

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada da ANVISA

RENISUS – Relação de plantas medicinais de interesse do SUS

RE – Resolução

RP/E- Rio da Prata/agricultor E

SIM – H₂S(ácido sulfídrico), indol e motilidade

SUS – Sistema Único de Saúde

TSA – Agar Caseína Soja

UFC – unidade formadora de colônia

VG/M-Vargem Grande/agricultor M

VISA – Vigilância Sanitária

VRBG - Agar Violeta Vermelho Neutro Bile com Glicose

XLD - Xilose lisina desoxicolato

VM – Vermelho de metila

VP – Voges- Proskauer

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	23
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	30
1.2 FITOTERÁPICOS	31
1.3 DROGA VEGETAL	31
1.4 PROFITO	31
2.JUSTIFICATIVA	34
3.OBJETIVO GERAL	36
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4.MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 PROCESSAMENTO DAS ESPÉCIES VEGETAIS.....	37
4.1.1 Secagem	37
4.1.2 Moagem	38

4.1.3 Extrato aquoso	38
4.2 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS.....	44
4.2.1 Manipulação da Amostra:.....	44
4.2.2 Verificação da Capacidade Inibitória de produtos não estéreis.....	44
4.2.2.1 Avaliação dos resultados.....	47
4.2.2.2 Método de diluição	47
4.2.2.3 Método de inativação	47
4.2.2.4 Associação dos métodos da diluição e inativação	47
4.2.2.5 Método de filtração por membrana	47
4.3 MICRO-ORGANISMOS DE REFERÊNCIA.....	48
4.4 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE BACTÉRIAS AERÓBIAS – Método de Semeadura em Profundidade.....	48
4.4.1 Contagem de Colônias	50
4.4.2 Controle do Ensaio	52
4.5 DETERMINAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS – Método de Semeadura em Profundidade.....	52
4.5.1 Contagem de Colônias, bolores e leveduras	52
4.5.2 Controle do Ensaio	53
4.6 DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS BILE TOLERANTES.....	53
4.6.1 Interpretação dos Resultados	54
4.6.2 Controle do ensaio.....	54
4.7 DETERMINAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	55
4.8 ISOLAMENTO DE COLÔNIAS DISTINTAS PARA PESQUISA EM MEIO ESPECÍFICO.....	57
4.8.1 Determinação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
4.8.1.1 Coloração pelo método de Gram	59
4.8.1.2 Detecção de Citocromo oxidase.....	60
4.8.1.3 Detecção de fluoresceína	61
4.8.1.4 Oxidação/fermentação da glicose.....	61
4.8.1.5 Detecção de piocianina.....	62
4.8.1.6 Crescimento a $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$	63

4.8.2 Determinação de <i>Burkholderia cepacia</i> ; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Acinetobacter</i> sp. e <i>Pseudomonas stutzeri</i>	64
4.8.3 Determinação de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
4.8.3.1 Prova da DNase	68
4.8.3.2 Prova da Coagulase	68
4.8.3.3 Prova da Catalase	69
4.8.3.4 Prova da utilização anaeróbica da glicose	71
4.8.4 Determinação de <i>Bacillus cereus</i>	71
4.8.5 Determinação de <i>Candida albicans</i> ; <i>Aspergillus flavus</i> ; <i>Aspergillus parasiticus</i>	72
4.8.6 Determinação de <i>Clostridium</i> sp.....	74
4.8.6.1 Endósporos	76
4.8.7 Determinação de <i>Salmonella</i>	76
4.8.8 Determinação de <i>Shigella</i> spp.	78
4.8.9 Determinação de <i>Escherichi coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Klebsiella</i> sp.....	79
4.9 Capacitação dos agricultores.....	81
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1 Capacitação dos agricultores	83
5.2 Reultado das análises microbiológicas nas amostras de <i>Curcuma longa</i>	83
5.3 Resultados das análises microbiológicas nas amostras de <i>Schinus terebinthifolius</i>	97
5.4 Micro-organismos patogênicos encontrados neste estudo.....	116
6. CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	121
APÊNDICE A – Material, Equipamentos, Soluções e Meios de Cultura	127

1. INTRODUÇÃO

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

Como resultado deste processo as plantas denominadas medicinais têm sido utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de diversas enfermidades. Assim, referências históricas relatam o uso de plantas medicinais em praticamente todas as antigas civilizações, o primeiro relato foi a obra chinesa *Pen Ts'ao* (A Grande Fitoterapia), de Shen Nung, que remonta a 2.800 a.C. (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

No Brasil a utilização de plantas medicinais como forma terapêutica deu-se através da assimilação dos conhecimentos indígenas e com a contribuição da cultura trazida por escravos e imigrantes, o que resultou no surgimento de uma medicina popular rica e original, na qual o emprego de plantas medicinais ocupa um lugar de destaque (GUERRA et al., 2007).

A grande parte dos medicamentos comercializados atualmente originaram-se de produtos naturais, em especial as plantas. Estima-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% de espécies vegetais. Entre os anos de 1989 e 1994 cerca de 200 medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), agência reguladora americana de controle de medicamentos e alimentos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (PAIXÃO; OLIVEIRA; SILVA, 2004).

Anualmente, no mundo, o mercado consumidor de produtos fitoterápicos movimenta cerca de 22 bilhões de dólares (KLEIN; BRUSCHI; MELLO, 2009). No Brasil, no período de novembro de 2003 a outubro de 2006, este faturou R\$ 1.840.228.655,00 com a venda de 122.696.549 unidades farmacêuticas. Estes valores referem-se a fitoterápicos industrializados, não incluindo produtos provenientes de plantas medicinais, drogas vegetais, fitoterápicos manipulados ou produtos registrados como alimentos e cosméticos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estas cifras refletem o grande volume de vendas devido ao

custo reduzido, ausência de patente e a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais” (FREITAS, 2007).

Neste contexto, a Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999 (BRASIL, 1999a), que cria a ANVISA insere a Vigilância Sanitária. Por ser o segmento da saúde responsável por eliminar, diminuir ou prevenir os riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção, circulação de bens e prestação de serviços de interesse da saúde, possui entre suas competências o controle de qualidade de produtos com finalidades terapêuticas (BRASIL, 1999a).

O início dos questionamentos sobre a qualidade dos fitoterápicos brasileiros data das décadas de 30 e 40 (FARIAS et al, 1985). Dois relatos sobre avaliação microbiológica realizados nos anos de 1992 e 2004 foram publicados. O primeiro pesquisou 84 lotes de fármacos de uso oral em formas de cápsulas, comprimidos e em pó; abrangendo 17 tipos de drogas vegetais produzidas por 20 fabricantes diferentes. Detectou-se contaminação por bactérias mesófilas e fungos acima do preconizado pela Federação Farmacêutica Internacional, além da presença de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (FISCHER, 1992). No segundo relato foram analisadas 50 amostras de 18 espécies vegetais em cinco estabelecimentos comerciais de Piracicaba, São Paulo. Trinta e seis por cento das amostras estavam contaminadas com bolores e leveduras, havendo variação de $1,0 \times 10^1$ a $4,2 \times 10^3$ UFC/g. A contaminação por bactérias mesófilas aeróbias foi de 58%, com variação de 10^1 a $3,4 \times 10^5$ UFC/g (PAIXÃO; OLIVEIRA; SILVA, 2004).

No Maranhão foi realizada análise de doze espécies de drogas vegetais. A inoculação das amostras em meios seletivos para bactéria e para fungos apresentou crescimento de colônias (AMARAL et al., 2003).

Em 2004, 72 amostras de plantas medicinais de sete regiões do Estado do Paraná foram pesquisadas seguindo-se a metodologia preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que envolve a contagem de micro-organismos aeróbios viáveis, bolores, leveduras, pesquisa de enterobactérias, *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureus* e *Pseudomonas*.

Na avaliação de drogas vegetais, foram colhidas dez amostras comercializadas livremente na cidade de Londrina/PR. Verificando-se a qualidade microbiológica antes e após o processo de infusão, foi constatada carga de micro-organismos aeróbios mesófilos variando entre 1×10^3 a 1×10^7 UFC/g, leveduras de 4×10^2 a 4×10^3 UFC/g e presença de enterobactérias em uma das

amostras. Nos infusos a carga de micro-organismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras foram menores, não havendo presença de enterobactérias (FURNANETO; MARINS; ENDO, 2003).

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

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

Em relação à avaliação da adequação técnica da indústria de medicamentos fitoterápicos, averiguou-se que 29,2% estavam classificadas como satisfatórias; 10,4% satisfatórias, porém com restrições; 6,2% insatisfatórias; 39,6% interditadas e 14,6% com recomendações para cancelamento de processo por não cumprirem a RDC nº 210/03, que estabelece todos os requisitos das Boas Práticas de Fabricação (ALVES et al., 2008; BRASIL, 2003c).

No ano de 2010 foi verificada a qualidade microbiológica de amostras de pata de vaca (*Bauhinia forticata*), quixabeira (*Bumelia sertorum*) e umburana (*Amburana cearensis*) no município de Currais Novos, Rio Grande do Norte. Foram quantificados: aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E. coli*, bolores e leveduras e *S. aureus*. Todas as amostras analisadas apresentaram contagens de bactérias do grupo dos coliformes totais. *E. coli* foi detectada em 34% das amostras. Níveis de bolores e leveduras e aeróbios mesófilos acima dos recomendados foram observados em 100% e 84% das amostras, respectivamente. *S. aureus* foi detectado em 25% das amostras. Os níveis de contaminação registrados apontam o material analisado como potencialmente danoso à saúde humana (ROCHA; MEDEIROS; SILVA, 2010).

A Vigilância Sanitária pode ser compreendida como um conjunto integrado de ações legais, técnicas, de pesquisa e de fiscalização, que exerce o controle sanitário das atividades, da produção e consumo de produtos visando à proteção e a promoção da saúde da população. Este

conceito de Vigilância Sanitária foi ampliado no decorrer do tempo, com a finalidade de abranger sua multiplicidade de ações (COSTA, 2001).

As ações de Vigilância Sanitária têm fundamento jurídico nas Leis nº 8.080 e 8.078, a primeira destaca a Vigilância Sanitária como parte integrante das ações de proteção à saúde da população e de competência comum das três esferas do governo: União, Estados e Municípios (BRASIL, 1990a). O Código de Defesa do Consumidor, Lei nº 8.078, reconhecendo as condições de vulnerabilidade do consumidor no mercado de consumo determinou que os produtos e serviços colocados no mercado não poderão gerar risco a saúde ou a segurança dos consumidores (BRASIL, 2010c).

Em consequência da promulgação das leis citadas anteriormente e com a finalidade de operacionalizar as ações de Vigilância Sanitária, em 1999, foi criada a ANVISA. Em sua lei criadora nº. 9.782, os medicamentos para uso humano são considerados produtos sujeitos ao controle e fiscalização sanitária (BRASIL, 1999). E segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC) nº 14, de 31 de março de 2010, que dispõe sobre o registro de fitoterápicos, esta classe de produtos é considerada medicamento; assim, portanto o controle de qualidade destes produtos encontra-se dentro das suas competências (BRASIL, 2010a).

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

O ato normativo RDC nº 14/2010 dispõe sobre o registro destes medicamentos, determinando todos os requisitos necessários para a sua concessão. Dentre as exigências encontram-se a avaliação da matéria-prima, dos derivados da droga vegetal e do produto final. Para a obtenção do registro, ainda, faz-se necessário o certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e relatório completo de produção. Para tal, a indústria deve atender os critérios da RDC nº 17/2010 (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b).

Existem outras normas que dispõem sobre a produção, regulamentação e registro de medicamentos, incluindo os fitoterápicos: a RDC nº 138/2004 (BRASIL, 2004) estabelece o enquadramento nas categorias de venda, a Resolução nº 899/2003b que define o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. A RDC nº 333/2003a e a RDC nº 96, de

17/12/2008a, dispõem sobre a propaganda, publicidade, informação e outras práticas cujo objetivo seja a divulgação ou promoção comercial de medicamentos (BRASIL, 2003b; BRASIL, 2008b).

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

Segundo a Portaria 2.960 de 9 de dezembro de 2008, a Política e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foram elaborados com a participação e comprometimento da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (BRASIL, 2008b). Assim em 2010 no Coletivo de Gestores foi apresentada a proposta de Plano Quadrienal (PQ) da Fiocruz para o período de 2011-2014, o mapa estratégico Fiocruz 2022 e os seus respectivos objetivos, ressaltando em seu macroprojeto o objetivo de “Estabelecer um sistema integrado de pesquisa, desenvolvimento e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos”.

Para avaliar a qualidade microbiológica das plantas medicinais utilizadas como fitoterápicos ou como matéria prima de outros produtos, existem parâmetros já preconizados. O Quadro 1 apresenta os limites microbiológicos estabelecidos pela OMS para planta medicinal e produto final, já a Tabela 1 mostra os limites microbiológicos para produtos não estéreis estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (WHO, 2011; ANVISA, 2010).

Quadro 1: Limites microbiológicos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para planta e produto final.

Limites microbiológicos segundo OMS, 2011		
	Planta medicinal	Produto final
Bactérias aeróbicas	10 ⁷ UFC por grama	10 ⁵ UFC por grama
Fungos	10 ⁴ UFC por grama	10 ³ UFC por grama
<i>Escherichia coli</i>	10 UFC por grama	Ausência em 1g
Outras enterobactérias	10 ³ UFC por grama	10 ² UFC por grama
<i>Salmonella</i>	Ausência em 1g	Ausência em 1g
<i>Clostridium</i>	Ausência em 1g	Ausência em 1g
<i>Shigella</i>	Ausência em 1g	Ausência em 1g

Fonte: WHO, 2011

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

Tabela 1: Limites microbianos para produtos não estéreis preconizados pela Farmacopéia Brasileira

<i>Via de administração*</i>	<i>Contagem total de bactérias aeróbias</i> <i>UFC/g ou mL</i>	<i>Contagem total de Fungos/leveduras</i> <i>UFC/g ou mL</i>	<i>Pesquisa de Patógenos</i>
Produtos sintéticos e biológicos ^a			
Preparação aquosa para uso oral	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1 g, ou mL
Preparação não aquosa para uso oral	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1 g, ou mL
Preparação para uso retal	10 ³	10 ²	–
Preparação uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular)	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1 g, ou mL
Inalatórios	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Bactéria Gram negativa bile tolerante ^b em 1 g, ou mL
Preparação vaginal	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i> em 1 g, ou mL
Dispositivo Transdérmico (limite por unidade)	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /dispositivo
Produtos de origem vegetal, mineral e/ou animal ^a			
Preparação para uso oral contendo matéria-prima de origem natural	10 ⁴	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em 1 g, ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g, ou 10 mL. Limite máximo de 10 ² bactérias Gram negativa bile tolerante ^b em 1 g, ou mL.
Drogas vegetais que serão submetidas a processos extrativos a quente	10 ⁷	10 ⁴	Limite máximo de 10 ² <i>Escherichia coli</i> em 1 g. Limite máximo de 10 ⁴ bactérias Gram negativa bile tolerante ^b em 1 g, ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g
Drogas vegetais que serão submetidas a processos extrativos a frio	10 ⁵	10 ³	Limite máximo de 10 ¹ <i>Escherichia coli</i> em 1 g. Limite máximo de 10 ³ bactérias Gram negativa bile tolerante ^b em 1 g, ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g
Extrato seco	10 ⁴	10 ³	Ausência de <i>Salmonella</i> spp e <i>Escherichia coli</i> em 10 g
Tintura, Extrato fluido	10 ⁴	10 ³	–
Substâncias para uso farmacêutico			
Matéria-prima, base galênica	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em 1 g, ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> spp em 10 g, ou 10mL.

(a) para produtos que se enquadrem em mais de uma situação prevalecerão os limites mais restritivos

(b) outras enterobactérias

Fonte: ANVISA, 2010

1.1 PLANTAS MEDICINAIS:

Plantas medicinais são aquelas embaladas com identificação botânica e prazo de validade de acordo com a Lei Nº 5.991/73, que são tradicionalmente utilizadas pela população para prevenir, aliviar ou curar enfermidades (BRASIL, 1973). Após passarem por processamento dão origem aos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2007). No Brasil, estima-se haver em torno de 120.000 espécies de plantas superiores e, devido a esta ampla diversidade de espécies vegetais e à riqueza étnica cultural brasileira, as plantas medicinais ocupam uma posição de destaque na medicina popular para o tratamento de diversas doenças.

A comercialização de produtos fitoterápicos encontra-se em expansão em todo o mundo em razão de diferentes fatores como: o alto custo dos medicamentos sintéticos, insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, modismo e a crença popular da ausência de efeitos adversos destas formas terapêuticas (HEINZMANN; BARROS, 2007).

Curcuma longa L. é uma planta herbácea da família *Zingiberaceae*. Rizoma com extensões laterais chamadas “dedos”, apresenta a vantagem de não exigir tratos culturais especiais, desenvolvendo-se bem em diversas condições tropicais (PEREIRA; STRINGHEIX, 1998). Possui atividade anti-inflamatória (SRIMAL, 1997 ; BROADHURST, 1997), reduz as taxas de colesterol (ROA; CHANDRASHEKHARA; SATYANRAYANA; SRINI-VASAN, 1970), atua na função hepática (KISO; SUZUKI; WATANABE; OSHIMA; HIKINO, 1983), é antioxidante (SELVAM et al., 1995), antitumoral-,principalmente tumores de fígado, cólon, útero, e ovários (KAWAMORI et al.1999 ; CHUANG et al. 2000 ; STONER, 1995).

Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira-vermelha) é uma espécie pertencente à família *Anacardiaceae*, característica na restinga, onde apresenta-se como um arbusto lenhoso, com caule espesso e tortuoso. Neste ambiente, a espécie ocupa estágios herbáceo e/ou subarbusivo e arbustivo (LENZI; ORTH, 2004). Possui atividade anti-inflamatória em reparo de tecido sobre

lesões ulceradas (MARTORELLI et al; 2011), estomatite prótica(SOARES et al., 2010), e cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos (LUCENA et al., 2006).

As plantas são cultivadas e fornecidas pelos agricultores do Projeto de Fitoterápicos (PROFITO) do Núcleo de Gestão em Biodiversidade (NGBS) do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da FIOCRUZ. Constam na lista de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) e que são utilizadas para produção de um produto (pó) para uso no tratamento de diabéticos e hipertensos (*Curcuma*) e uso tópicos (sabonete líquido) na terapêutica de tecidos ulcerados da pele (*Schinus*), ministrados pela secretaria municipal de saúde do Estado do Rio de Janeiro (BRASIL, 2015). Não foram submetidas a nenhuma avaliação sob o ponto de vista microbiológico em suas fases de produção. Enquanto inúmeros estudos comprovam elevado nível de contaminação por micro-organismos altamente patogênicos no produto final (ALVES, 2008; FREITAS, 2007; FURNANETO, 2003) .

1.2 - FITOTERÁPICOS:

De acordo com a RDC nº14 de 31 de março de 2010, os fitoterápicos são medicamentos produzidos exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros), cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos (busca na ciência através do conhecimento popular sobre fármacos de determinado grupo étnico ou social), de uso, documentações tecnológicas ou evidências clínicas (BRASIL, 2010a).

Esses medicamentos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. Desta classe de medicamentos excluem-se os que em sua composição contenham substâncias ativas isoladas, de qualquer origem e as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2010a).

1.3 - DROGA VEGETAL:

É o nome dado à planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, de acordo com a Farmacopéia brasileira e a RDC nº 48, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004a).

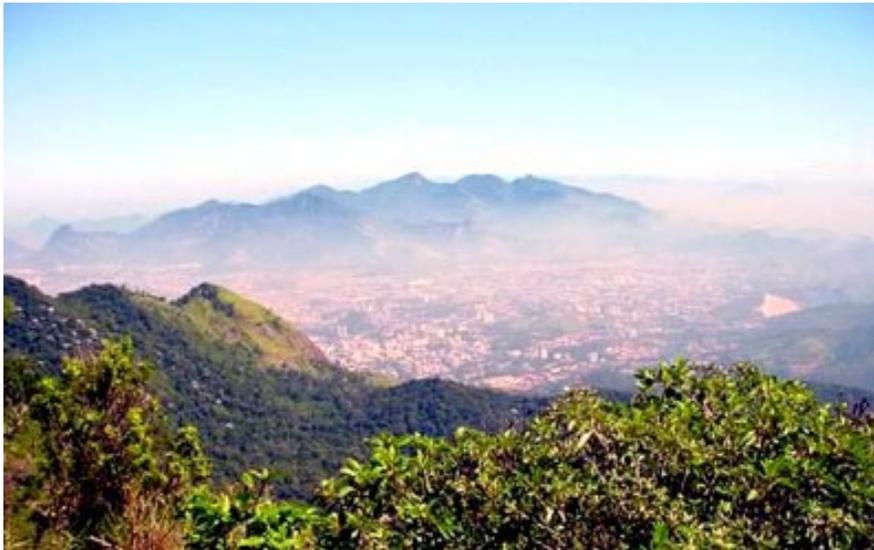
1.4 - PROFITO

Programa do Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde (NGBS)/Farmanguinhos que em conjunto com associações de agricultores de Vargem Grande, Rio da Prata e Pau da Fome e Queimados, implantaram a produção de plantas medicinais nas comunidades do Maciço da Pedra Branca (Figura 1) como alternativa de desenvolvimento socioambiental, monitorando o cultivo, o beneficiamento e a comercialização de plantas medicinais nativas da Mata Atlântica.

Este Projeto segue as diretrizes do Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos estabelecido pela Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008 (BRASIL, 2008b).

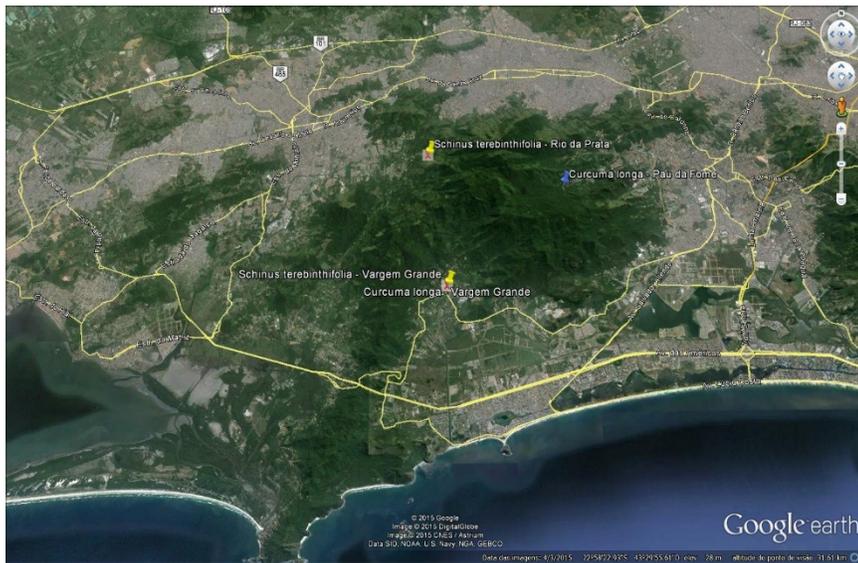
A Figura 2 apresenta o mapa dos locais de cultivo das plantas.

Figura 1. Vista do Parque Estadual da Pedra Branca, onde vivem os agricultores.



Fonte:<https://agencia.fiocruz.br/agricultores-do-profitto-pedra-branca-conquistam-computadores>

Figura 2. Mapa dos locais de cultivo de *Curcuma* e *Schinus*



Fonte: <https://www.google.com/earth/>

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país com rica biodiversidade, aliada a uma diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Possui grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas apropriadas para a população brasileira, geradoras de produtos tecnológicos e terapêuticos, levando-se em consideração seus regionalismos e valores culturais, que podem promover a melhoria na qualidade de vida, o fortalecimento da agricultura familiar, a geração de emprego e renda, o desenvolvimento industrial e tecnológico, com inovação e inclusão social. Considerando esse potencial, o governo federal, em 2006, estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo Decreto nº 5.813 de 2006 (BRASIL, 2006).

Neste contexto o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária. Desde sua fundação presta serviço ao setor público (federal, estadual e municipal) realizando análises na área de controle da qualidade e elaborando pareceres técnicos que podem nortear o registro e a comercialização de insumos e produtos com potencial risco à saúde da população, visto que as análises realizadas pelo setor são acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e qualificadas pela OMS. Em parceria com Farmanguinhos propõe com este estudo ampliar um novo modelo de controle e monitoramento microbiológico e de boas práticas no pré, pós cultivo e produção de *Schinus terebinthifolius* e *Curcuma longa* desde a matéria prima até o produto final, visando numa abordagem interdisciplinar, prevenir, garantir e proteger à população, o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos, fortalecendo os Programas de Fitoterapia das Secretarias

Municipais de Saúde (SMS). E conseqüentemente oferecendo abastecimento de matérias-primas de qualidade, agricultores qualificados, e potencializando as opções da rede SUS.

A escolha das duas espécies, *S. terebinthifolius* e *C. longa*, se deve ao fato de seu uso, como fitoterápico, no monitoramento de diabéticos e hipertensos, pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

O nível de alguns contaminantes microbiológicos presentes na planta medicinal pode mudar o processamento pós-colheita (secagem por exemplo), em preparações à base de plantas tais como: extratos e no produto final.

3. OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento Microbiológico de acordo com a Organização Mundial de Saúde, colocando em prática este modelo nas propriedades dos agricultores e promovendo as boas práticas nas diferentes fases do processo de produção do fitoterápico, proporcionando um modelo sócio produtivo e agroecológico de plantas medicinais e fitoterápicos, de relevância para o SUS, num exemplo de convergência entre as áreas de Vigilância Sanitária, ambiental, saúde e social.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter amostras de *S. terebinthifolius* (aroeira), destinadas à produção de sabonete líquido com finalidade terapêutica para uso tópico, nos diferentes estágios de produção;
- Obter amostras de *C. longa* (curcuma) com finalidade terapêutica para diabéticos e hipertensos, nos diferentes estágios de produção;
- Determinar o número total de bactérias aeróbicas, bolores e leveduras; bactérias Gram-negativas bile tolerantes e determinar a presença de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; *Clostridium* spp., *Shigella* spp; *Bacillus cereus*; *Enterobacter cloacae*; *Serratia marcescens*; *Klebsiella* spp.; *Burkholderia cepacia*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Pseudomonas stutzeri*; *Candida albicans*; *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.
- Determinar os pontos críticos, relativos à qualidade microbiológica das espécies vegetais
- Propor soluções para eliminar as possíveis contaminações encontradas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As espécies vegetais de *S. terebinthifolius* e *C. longa* (Tabela 2) utilizadas neste estudo foram cultivadas no bioma da Mata Atlântica provenientes de cinco agricultores de locais diferentes. E que já tiveram iniciados os estudos botânicos, genéticos e químicos em busca da certificação, escolhidas de acordo com o estabelecido pelo programa Farmanguinhos/INCQS juntamente com a Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil do Município do Rio de Janeiro/Coordenadoria de Saúde da Área de Planejamento 4 (SMSDC-RJ/CAP 4) e com o trabalho conjunto com agricultores tradicionais do Maciço da Pedra Branca.

As atividades foram acompanhadas em todas as fases (colheita, seleção, extração e produção – Tabela 3) e ao longo do processo houve a exigência das boas práticas, tanto no cultivo como na produção (CORRÊA JUNIOR.; SCHEFFER.,2013).

4.1 – PROCESSAMENTO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

4.1.1 - Secagem

A secagem é uma das etapas do pré-processamento que tem por finalidade a eliminação da água contida nos produtos agrícolas por evaporação. A eliminação da água ocorre com transferência de calor e massa (umidade) entre o produto e o ar de secagem (BORGIO et al 2010; SILVA; AFONSO & DONZELLES, 2008).

O processo de secagem, interrompe a degradação por processos metabólicos, e impede o desenvolvimento de micro-organismos. A distribuição do produto no local a ser utilizado para a secagem deve ser uniforme, garantindo a homogeneização da secagem (BORGIO et al 2010).

O teor de umidade das plantas varia conforme a parte de interesse. Portanto, o tempo e a temperatura são ajustados de acordo com a umidade de cada parte do vegetal e o conhecimento

da composição química e suas estruturas armazenadoras (SILVA; AFONSO & DONZELLES, 2008).

A temperatura do ar de secagem pode variar de 35 a 70 °C. Para plantas com substâncias termolábeis, deve-se verificar a temperatura segura para evitar a degradação do princípio ativos, lembrando que a presença de água após a colheita também levaria a perdas por degradação e deterioração (SILVA; AFONSO & DONZELLES, 2008).

4.1.2 Moagem

A moagem tem como objetivo, a redução do material vegetal em partículas menores, podendo chegar até a forma de pó. Para a comercialização de plantas medicinais secas é necessária a pulverização, como por exemplo para a cúrcuma.

O processo de moagem foi realizado por meio de moinho de facas (Marconi® MO008), contendo 11 lâminas, e 3 opções de malhas, variando de partículas maiores até a forma de pó.

Como neste estudo o material vegetal moído foi destinado a comercialização, foram realizados processos em diferentes porções, de acordo com a espécie, a fim de garantir amostras que representassem todo o material. Sendo que na maioria das vezes o material vegetal permanecia íntegro, para facilitar a visualização pelo consumidor.

4.1.3 Extrato aquoso

A extração de materiais vegetais tem por objetivo carrear as substâncias presentes no mesmo, transportando-os para a via fluídica. O termo extração, significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros.

Para a realização do produto em estudo, os extratos foram obtidos pela técnica de maceração, esta operação foi realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (5 dias corridos), sob agitação ocasional (uma vez ao dia) e sem renovação do líquido extrator (água destilada), processo estático.

Todo o processamento foi realizado no Laboratório de Biologia da Biodiversidade – Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (PAF)/NGBS/Farmanguinhos/Fiocruz, com o envolvimento de um grupo de agricultores inseridos no projeto e, também de técnicos do Laboratório Não Estéreis do INCQS.

A Tabela 2 apresenta as espécies utilizadas no estudo, e a Tabela 3 apresenta as espécies com as determinadas fases de análise.

Tabela 2: Espécies vegetais utilizadas neste trabalho com o seu nome popular

Espécie vegetal	Nome popular	
Espécies	Fases	Produtos
<i>Curcuma longa</i>	1	Rizoma fresco
<i>Curcuma longa</i>	2	Rizoma seco
<i>Curcuma longa</i>	3	Rizoma triturado
<i>Curcuma longa</i>	4	Produto final
<i>Schinus terebinthifolius</i>	1	Folhas frescas
<i>Schinus terebinthifolius</i>	2	Extrato aquoso
<i>Curcuma longa</i>	Cúrcuma/açafrão da terra	
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira/pimenta rosa	

Fonte: ANVISA, 2010.

Tabela 3 : Espécies trabalhadas, fases da produção, da matéria prima até o produto final

Schinus terebinthifolius

3

Sabonete líquido

Fonte: ANVISA, 2010.

Para a manipulação da *S. terebinthifolius* (aroeira), inicialmente foi realizada coleta de folhas frescas nas propriedades dos agricultores participantes, como apresentado na Figura 3, após seleção das folhas como na Figura 4, obtenção do extrato aquoso em laboratório (Figura 5) e com este a obtenção de um produto final, que neste caso foi o sabonete líquido (Figura 6).

Para manipulação da *Curcuma longa*, obteve-se o rizoma dos agricultores participantes (Figura 7), após este, o rizoma foi seco em estufa a 40° C (Figura 8), triturado em moinho (Figura 9) e embalado e etiquetado como apresenta-se seu produto final (Figura 10).

Figura 3. Coleta de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius*, aroeira, realizada na propriedade do agricultor VG/M, da Agrovargem, pelo técnico Rodrigo Marins.



Foto do próprio autor.

Figura 4. Fase 1- Seleção das folhas frescas de *Schinus terentipholius*, aroeira, após a coleta.



Foto cedida pela PAF.

Figura 5. Fase 2 Processo de obtenção do extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius*: início (folhas selecionadas e água destilada) e extrato finalizado.



Foto cedida pela PAF.

Figura 6. Fase 3 Produto final - Sabonete líquido de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*), produzidos por agricultores do projeto Profito, embalado e etiquetado.



Foto cedida pela PAF.

Figura 7. Fase 1 Rizoma de *Curcuma longa* fresca



Foto cedida pela PAF.

Figura 8. Fase 2- *Curcuma longa* seca a 40°C em estufa de circulação de ar forçado



Foto cedida pela PAF.

Figura 9. Fase 3 -*Curcuma longa* triturada (Pós moagem): após secagem os rizomas passam pelo processo de moagem em moinho de facas, MA 008



Foto cedida pela PAF.

Figura 10. Fase 4 - Produto final obtido da *Curcuma longa* (pó) embalado e etiquetado.



Foto cedida pela PAF.

4.2 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) do INCQS: Verificação da Capacidade Inibitória de Produtos

Não Estéreis/INCQS/FIOCRUZ (65.3210.009); Pesquisa de Patógenos em Produtos Não Estéreis e Matérias-Primas de Uso em sua Fabricação e Água para Diálise/INCQS/FIOCRUZ (65.3210.008); Contagem de Viáveis Totais e Bactérias Bile Tolerantes em Produtos Farmacêuticos, Matérias-Primas e Água para Diálise/INCQS/FIOCRUZ (65.3210.010), todos os POPs baseados na FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010.

4.2.1 Manipulação da Amostra:

O armazenamento da amostra foi realizado de acordo com o POP INCQS/FIOCRUZ 65.3210.025: Fluxo de amostras do Setor de Medicamentos Não Estéreis, Cosméticos, Artigos e Insumos de Saúde do Departamento de Microbiologia. Antes de iniciar o processamento, inspecionou-se cuidadosamente qualquer irregularidade em relação às embalagens e aspecto, com o intuito de verificar algum motivo que impossibilitasse a realização da análise. a solução de álcool etílico 70% (v/v) foi utilizada para a assepsia da embalagem. O uso de técnicas assépticas na amostragem e na execução das análises, foram empregadas em capela de fluxo laminar.

4.2.2 Verificação da Capacidade Inibitória de produtos não estéreis

A metodologia realizada de acordo com o POP 65.3210.009 foi realizada para verificar a presença de substâncias inibidoras de crescimento microbiano que podem estar interferindo nos resultados, como por exemplo os falsos negativos.

O ensaio teve início a partir dos subcultivos dos micro-organismos de referência, que foram inoculados em 5 mL de caldo de caseína-soja separadamente e incubados a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas, com exceção de *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* que foram incubados a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, até 5 dias;

Após período de incubação foram feitas diluições decimais (a partir do fator 2, diluir até 10^{-8}) de cada uma dessas culturas utilizando tampão cloreto de sódio-peptona, de modo a obter uma suspensão contendo aproximadamente 100 células viáveis por mL.

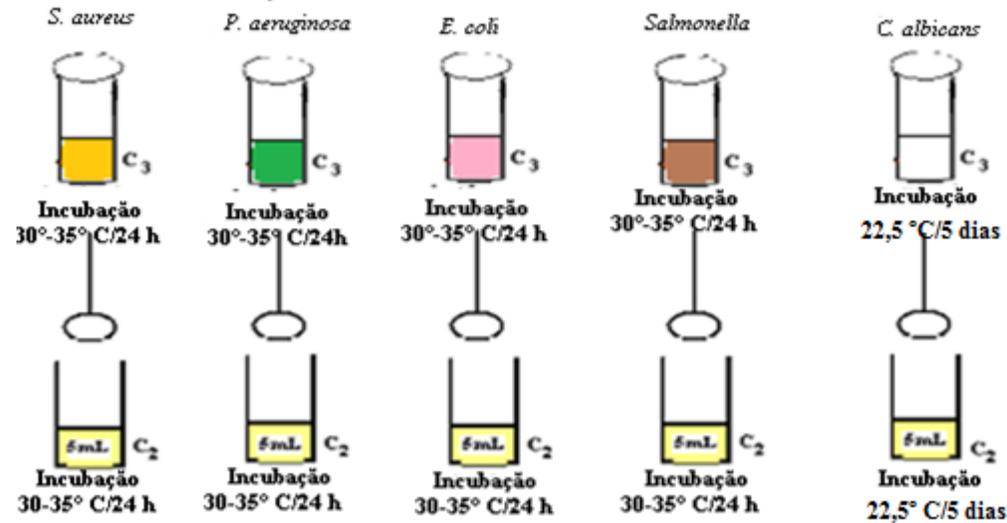
A seguir foi inoculado 1 mL da suspensão de cada micro-organismo separadamente em tubo contendo 8 mL de caldo de caseína-soja e 1 mL/1 g da amostra (presença da amostra); paralelamente foi inoculado 1 mL da suspensão, em tubo contendo 9 mL de caldo caseína-soja

sem a amostra (ausência da amostra) e tubo contendo meio sem amostra e sem micro-organismo (branco). O esquema da realização do teste pode ser visto na figura 11.

Figura 11. Teste de Verificação da Capacidade Inibitória de produtos não estéreis

Teste Preparatório

VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA



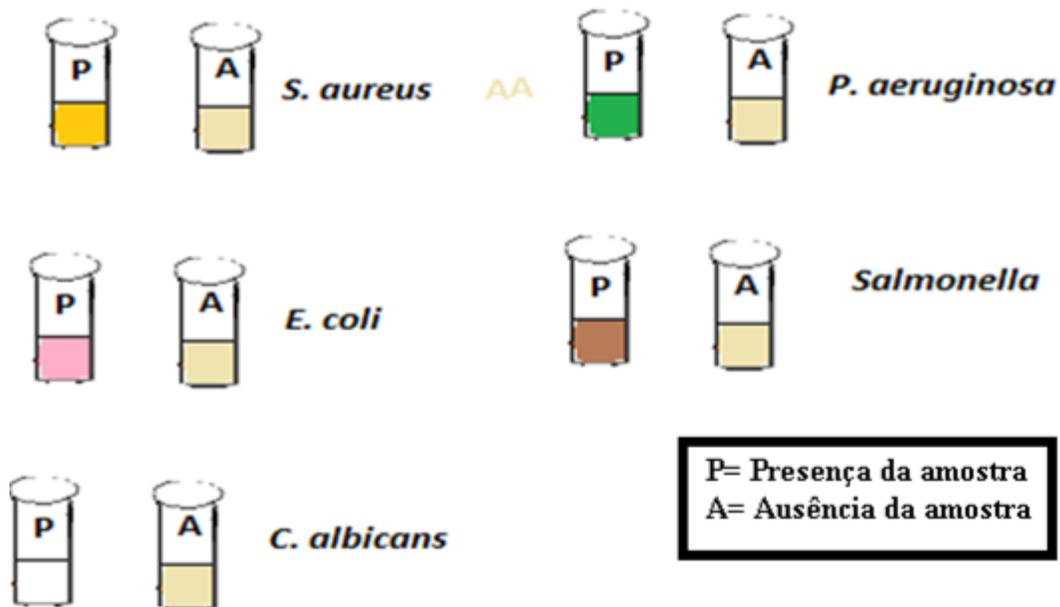
Fazer diluições decimais em tampão cloreto de sódio peptona até obter uma suspensão que contenha 100 células viáveis por mL.

Empregar 1 mL do inóculo dos microrganismos separadamente na presença e na ausência da amostra.

Incubar a 30-35° C por 24 h, exceto para *C. albicans* 20 - 25° C por 48 h.

C₂ Caldo caseína - soja

C₃ ágar caseína - soja



Fonte: Própria do autor

4.2.2.1 Avaliação dos resultados:

A presença de crescimento dos micro-organismos empregados frente à amostra indica a ausência de substâncias inibidoras. Deve-se então dar prosseguimento às análises microbiológicas da amostra. Já a ausência de crescimento dos micro-organismos empregados frente à amostra indica a presença de substâncias inibidoras. Essa atividade inibitória deve ser então eliminada, antes das análises microbiológicas através dos métodos:

4.2.2.2 Método de diluição:

Aumentar o volume do meio de cultura a ser utilizado mantendo-se a mesma quantidade da amostra. O ensaio deve ser repetido até se determinar a relação ideal entre a concentração da amostra e o volume do meio suficiente para eliminar a atividade inibitória.

4.2.2.3 Método de inativação:

Adicionar ao meio de cultura substâncias inativadoras em quantidade suficiente, de acordo com a substância presente na amostra. Como por exemplo uso de Caldo neutralizante DEY-ENGLEY.

4.2.2.4 Associação dos métodos da diluição e inativação:

Aumentar o volume do meio utilizado e adicionar ao mesmo a substância inativadora, conforme o caso.

4.2.2.5 Método de filtração por membrana:

Esta técnica permite eliminar, através de lavagens sucessivas, as substâncias inibitórias presentes na amostra que possam dificultar ou inibir o crescimento de micro-organismos contaminantes.

4.3 MICRO-ORGANISMOS DE REFERÊNCIA:

A Tabela 4 apresenta os micro-organismos utilizados nos ensaios como controles positivos e negativos.

Tabela 4: Micro-organismos de referência usados como Controles Positivos e/ou Negativos nos diferentes ensaios

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	INCQS 00230 (ATCC 9027)
<i>Escherichia coli</i>	INCQS 00219 (ATCC 8739)
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00039 (ATCC 6538)
<i>Candida albicans</i>	INCQS 40006 (ATCC 10231)
<i>Salmonella sp</i>	INCQS 00150 (ATCC 14028)
<i>ClOstridium sporogenes</i>	INCQS 00060 (ATCC 11437)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	INCQS 40036 (ATCC 16404)
<i>Bacillus subtilis</i>	INCQS 00001 (ATCC 6633)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS 00143 (ATCC 19606)

Fonte: POP INCQS 65.3210.009

4.4 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE BACTÉRIAS AERÓBIAS – Método de Semeadura em profundidade

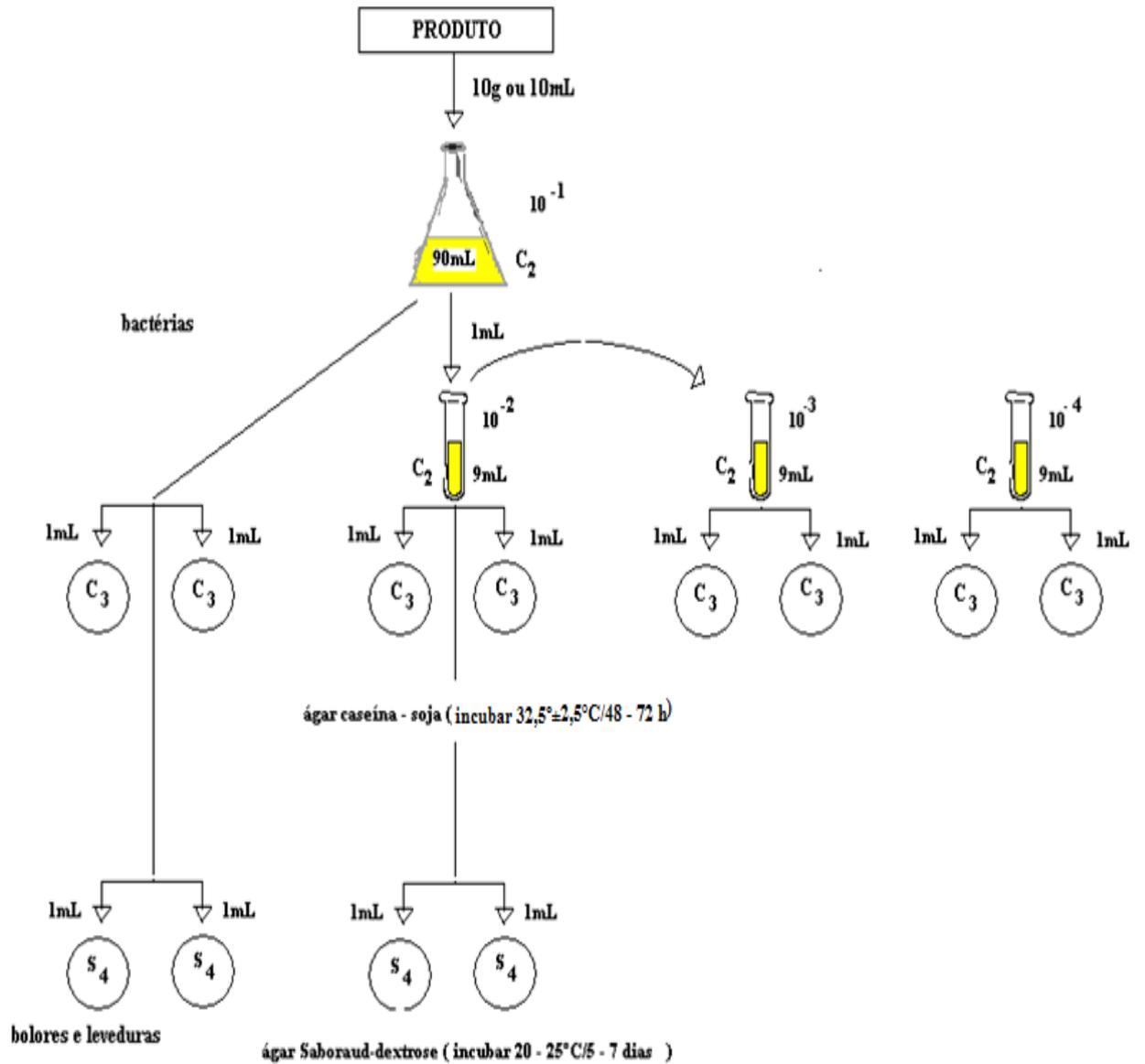
A amostra foi triturada até a obtenção de um pó fino, depois foram pesados 10 g e adicionados em 90 mL de caldo caseína-soja (diluição 1:10), após homogeneização, foram preparadas diluições decimais até 10^{-7} para determinação do número total de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e bactérias (10^{-6}) Gram-negativas bile tolerantes (10^{-4}).

Alíquotas de 1 mL de cada diluição (10^{-1} até 10^{-7}) da amostra, foram transferidas separadamente para 2 placas de Petri estéreis e adicionados 15-20 mL de ágar caseína-soja, previamente fundido e resfriado a 44-50 °C. Após homogeneização da mistura da amostra com o meio em movimentos rotatórios e solidificação, as placas foram invertidas e incubadas a 32,5 °C \pm 2,5 °C por 48 horas. Como mostrado na figura 12.

Figura 12. Esquema das diluições

ANÁLISE DE MEDICAMENTOS NÃO ESTÉREIS

MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA



obs.: Fitoterápicos - diluir até 10^{-5} bactérias.
 diluir até 10^{-3} fungos e leveduras

C_3 = placa de agar Caseína soja
 S_4 = placa de agar Sabouraud dextrose

Fonte: Própria do autor

4.4.1 Contagem de colônias

Foi realizada a contagem do número de colônias nas placas de ágar caseína-soja (Figura 13) que apresentaram até 300 colônias de bactérias. O cálculo foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$N = \frac{(\sum Pi)}{(\sum Vi)} D$$

Onde:

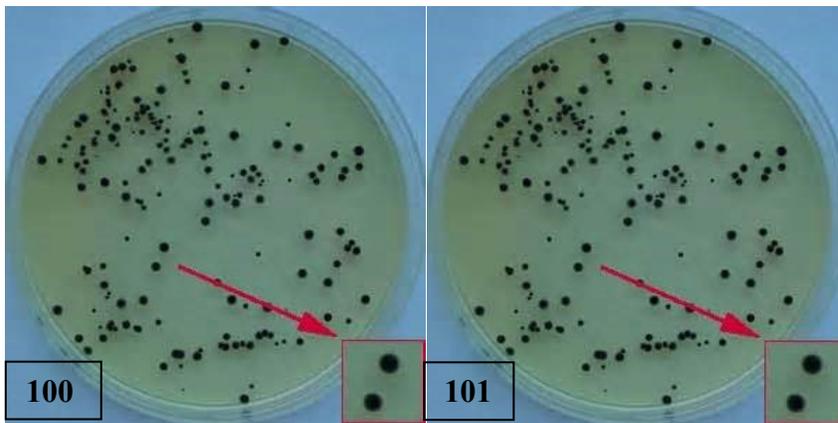
N = númeroº de UFC/1 g ou 1 mL

D = Fator de diluição utilizada

Pi = Somatório do número de colônias observadas em cada placa

Vi = Somatório do volume da amostra em cada placa

Figura 13. Exemplo experimental de contagem de colônias



$$N = 100 + 101 / 2 \times (D) \text{ fator de diluição } (10^7)$$

$$N = 201 / 2 = 100,5 \times 10^7 = 1,0 \times 10^9$$

$$N = 1,0 \times 10^9 \text{ U.F.C./g}$$

Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

Realizou-se o cálculo de incerteza segundo o POP 65.1120.061 - Incerteza em medições analíticas, utilizando planilhas constante do Anexo D desse POP (Figura 14).

Figura 14. Modelo de cálculo de incerteza de resultado.

Contagem

POP rev.:

Determinação de Incerteza:

Amostra:
Data:

preparo da amostra por:
quantidade: mL

Dados (PREENCHER):

P1=	<input type="text" value="100"/>	Contagem placa 1
P2=	<input type="text" value="101"/>	Contagem placa 2
D=	<input type="text" value="10000000"/>	Fator de diluição
V=	<input type="text" value="2"/>	Volume total de teste (mL)
n=	<input type="text" value="7"/>	número de diluições 1:10
	<input type="text" value="1"/>	menor diluição

Resultado:

N=	<input type="text" value="1,01E+09"/>	UFC/mL	Número de UFC/mL
U(N)=	<input type="text" value="16,13"/>	%	incerteza percentual do resultado
	<input type="text" value="1,62E+08"/>	UFC/mL	incerteza número de UFC/mL

(Expressão do resultado- Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro da amostra.) - Fonte: POP 653210010 - Contagem de Viáveis Totais e Bactérias Bile Tolerantes em Produtos Farmacêuticos, Matérias-Primas e Água para Diálise.

4.4.2 Controle do Ensaio

Com a finalidade de garantir os resultados, em paralelo ao ensaio, foi incubada uma placa com o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de amostra, submetida às mesmas condições (controle negativo). Para essa metodologia, o controle negativo é o próprio branco.

4.5- DETERMINAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS (Método de Semeadura em profundidade)

Foram transferidas alíquotas de 1mL de cada diluição (10^{-1} até 10^{-3} , em alguns caso a diluição foi até 10^{-6}) da amostra para 2 placas de Petri estéreis e adicionados 15-20 mL de ágar Sabouraud-dextrose, previamente fundido e resfriado a 44-50 °C. Após homogeneizar a mistura da amostra com o meio em movimentos rotatórios e solidificação em posição invertida foram incubadas a 20-25 ° C de 5 a 7 dias.

4.5.1 Contagem de Colônias de bolores e leveduras

Foi realizada a contagem do número de colônias nas placas de ágar Sabouraud-dextrose, que apresentaram até 100 colônias de bolores e leveduras. E o cálculo foi feito utilizando a seguinte

fórmula:

$$N = \frac{(\sum Pi)}{(\sum Vi)} D$$

Onde:

N = numero de UFC/1 g ou 1 mL

D =Fator da diluição utilizada

Pi = Somatório do número de colônias observadas em cada placa

Vi = Somatório do volume de teste em cada placa

4.5.2 Controle do Ensaio

Com a finalidade de garantir os resultados, paralelamente ao ensaio, foi envazada uma placa com o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de amostra e submetida às mesmas condições (controle negativo). Para essa metodologia, o controle negativo é o próprio branco. O resultado do ensaio foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro da amostra.

4.6 - DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS BILE TOLERANTES – Método: Semeadura em superfície

A partir da diluição 1:10 em caldo caseína-soja, do qual foi retirado 1mL e adicionado em 90 mL de caldo MacConkey e incubado a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ após período de incubação foi transferida uma alíquota de 1 mL para tubos contendo 9 mL de caldo Mossel para enterobactérias de modo a obter diluições contendo 0,1; 0,01, 0,001g (ou 0,1;0,01 e 0,001mL) conforme o caso. Após incubação dos tubos de caldo Mossel a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas, os tubos que apresentaram crescimento foram semeados na superfície de placas contendo Agar Violeta Vermelho Neutro Bile com Glicose (VRBG) e incubadas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. O desenvolvimento de colônias Gram-negativas vermelhas ou avermelhadas nas três diluições indicaram resultado positivo. Exemplo de placas positivas podem ser vistas na Figura 15.

Figura 15. Placas de determinação de bactérias Gram-negativas bile tolerantes



0,1

0,01

0,001

Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blog.spot.com

4.6.1 Interpretação dos Resultados

O desenvolvimento de colônias Gram-negativas vermelhas ou avermelhadas indica resultado positivo;

Caso contrário, indica resultado negativo.

Os resultados positivos e os negativos foram registrados e determinou-se o número mais provável de bactérias por grama ou mililitro segundo Quadro 2 apresentado abaixo:

Quadro 2: Determinação do número mais provável de bactérias por grama

0,1 g ou 0,1 mL	0,01g ou 0,01mL	0,001g ou 0,001mL	Número provável de bactérias por grama, ou mililitro do produto
+	+	+	+++ > 10 ³
+	+	-	++- < 10 ³ e > 10 ²
+	-	-	+-- < 10 ² e > 10
-	-	-	--- < 10

Fonte: POP/INCQS 65.3210.010

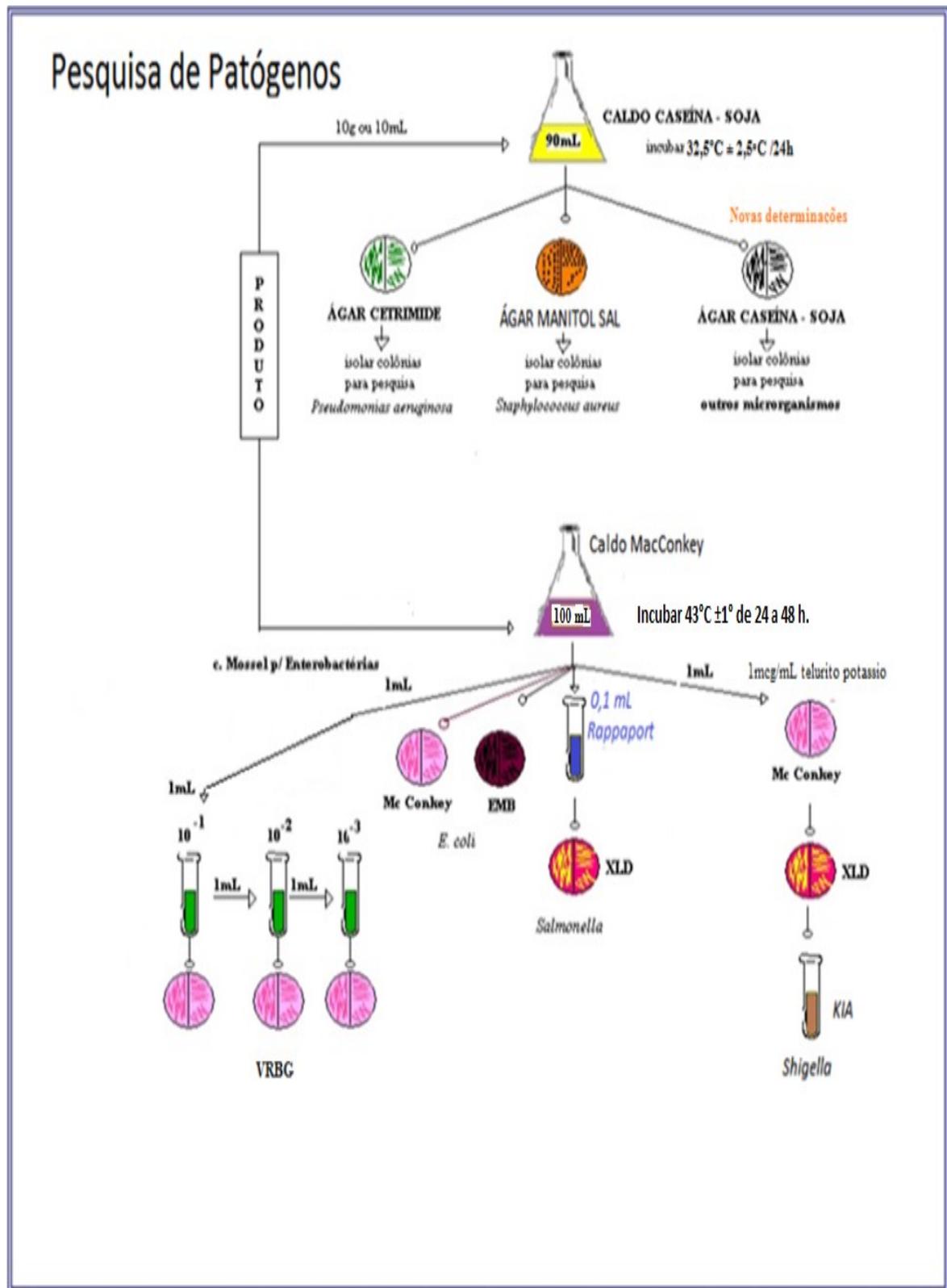
4.6.2 Controle do Ensaio

Com a finalidade de garantir os resultados, em paralelo ao ensaio, foi incubada uma placa com o meio de cultura VRBG, porém, sem a adição da amostra e submetida às mesmas condições (controle negativo). Para essa metodologia, o controle negativo foi o próprio branco.

4.7 DETERMINAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

Dez gramas de amostra foram adicionadas a 90 mL de caldo caseína soja e incubadas a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 48 horas. Após incubação da Pesquisa em Caldo Caseína soja, foram semeadas uma alçada em agar Cetrimide para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, uma alçada em agar Sal manitol para pesquisa de *Staphylococcus aureus* e uma alçada em agar Caseína Soja para o isolamento de colônias e pesquisa de outros patógenos presentes na amostra, as placas foram incubadas a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 24 horas, onde após isso era possível a leitura. Para a pesquisa de *Escherichia coli* foi pipetada 1 mL da pesquisa e colocada em Caldo MacConkey e incubada a $43\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 24 a 48 horas. Após a incubação do Caldo MacConkey foi semeada uma placa de agar MacConkey e uma placa de EMB para confirmação da pesquisa de *Escherichia coli*, também foi pipetada 0,1 mL do caldo MacConkey para um tubo contendo 10 mL de Caldo Rapaport Vassiliardis para a pesquisa de *Salmonella* sp. e foi semeada uma placa de agar MacConkey e a partir dela uma placa de XLD para a pesquisa de *Shigella* sp. A seguir na figura 16 é mostrado esquema de pesquisa de patógenos.

Figura 16. Esquema da Pesquisa de patógenos



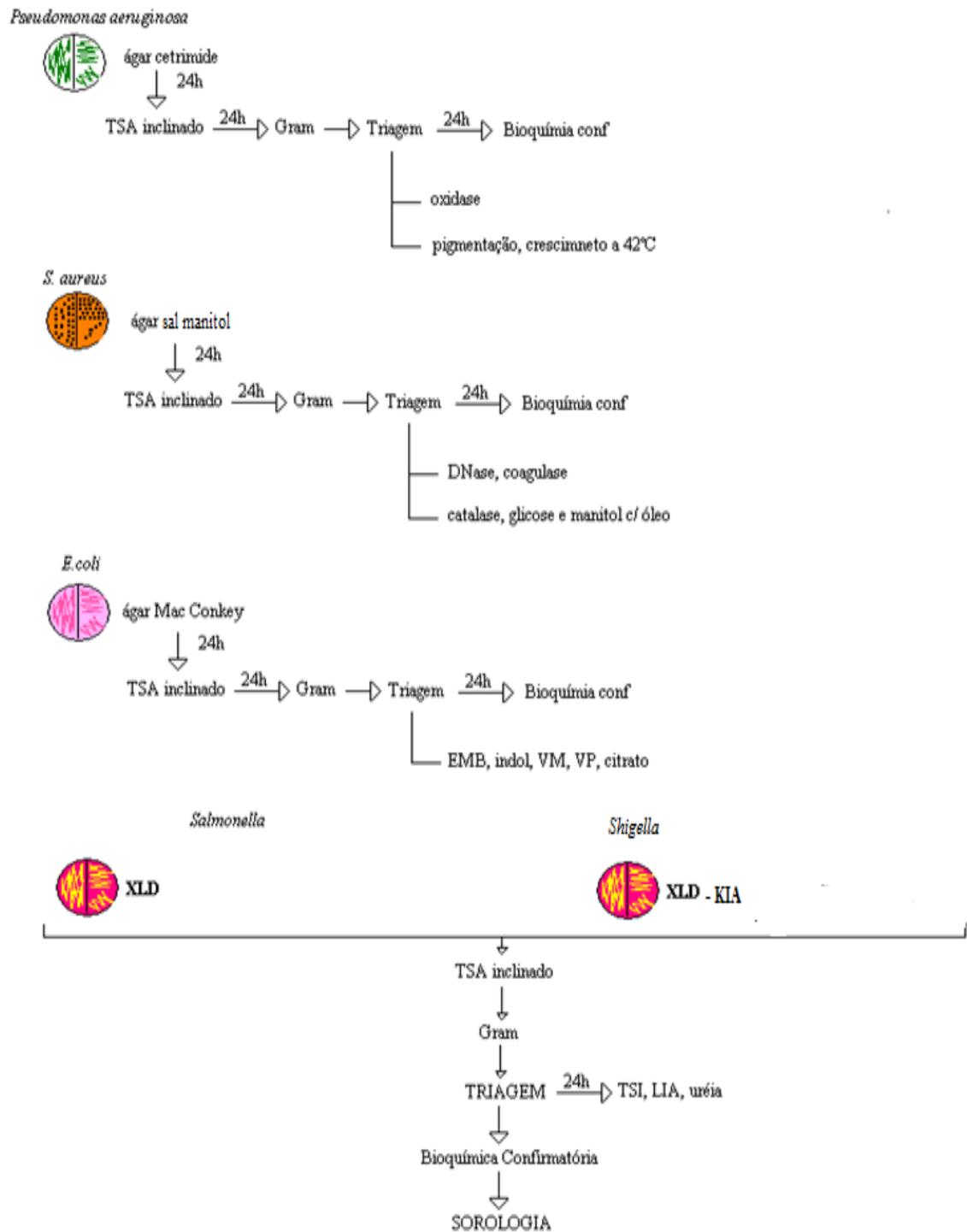
Fonte: Própria do autor

4.8 – ISOLAMENTO DE COLÔNIAS DISTINTAS PARA PESQUISA EM MEIO ESPECÍFICO

A partir do crescimento em agar caseína soja, as colônias obtidas foram semeadas e incubadas em meios de cultura e temperaturas específicas para cada crescimento. A seguir na figura 17 é mostrado esquema para o isolamento das colônias distintas e pesquisa confirmatória de cada microrganismo.

Figura 17. Esquema de Isolamento de colônias distintas para pesquisa específica

ISOLAMENTO DE COLÔNIAS DISTINTAS PARA PESQUISA ESPECÍFICA



Fonte: Própria do autor (JAB)

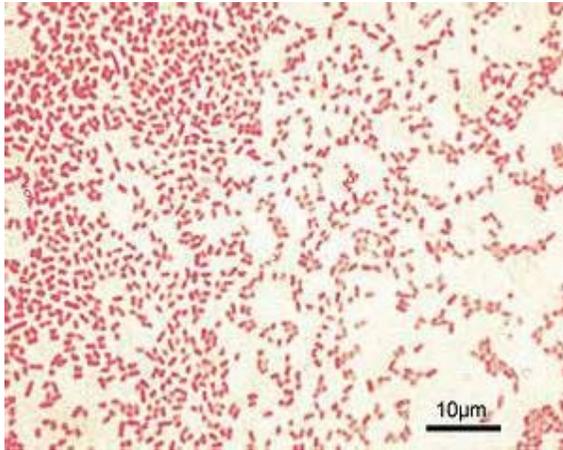
4.8.1 Determinação de *Pseudomonas aeruginosa*

A partir do crescimento em meio agar caseína foi retirada uma alçada da cultura, semeada por esgotamento na superfície de placa contendo ágar cetrimide. Paralelamente foi inoculado um controle positivo e um negativo; incubados a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 72 horas. Após período de incubação cada colônia com aspecto morfológico diferente foi transferida para ágar tripticaseína soja inclinado e incubadas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24 horas. Após o período de incubação esse crescimento foi submetido a Coloração de Gram, e as provas de Citocromo oxidase, oxidação/fermentação da glicose, Detecção de fluoresceína, Detecção de piocianina, Crescimento a $42 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilização do citrato de Simmons e teste da mobilidade (Figura 17).

4.8.1.1 Coloração pelo método de Gram:

- Sobre uma lâmina limpa e desengordurada, foi depositado o esfregaço do material em estudo e deixado secar a temperatura ambiente. Para fixação do material na lâmina foi utilizado o bico de Bunsen por três a quatro vezes. Em seguida, a lâmina foi colocada sobre um suporte para coloração sendo a superfície coberta com solução de cristal violeta por 1 minuto, seguida de lavagem do esfregaço em água destilada. Em seguida, cobriu-se o esfregaço com solução de lugol, (solução iodo de Gram), que ficou em repouso durante 1 minuto e depois foi lavado com água destilada. Para descorar a preparação foi usada a solução de álcool-acetona (60%-40%). Então, cobriu-se a superfície da lâmina com solução de fucsina ou solução de safranina que ficou em repouso durante 30 segundos e lavada com água destilada. Após secagem da lâmina a temperatura ambiente a mesma foi examinada ao microscópio (Figura 18).

Figura 18. Coloração pelo método de Gram de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que se apresentam como bastonetes Gram negativos.



Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.1.2 Detecção de Citocromo oxidase

Esta prova determina a capacidade de um micro-organismo em produzir a enzima oxidase (Figura 19).

Foi transferida a colônia com alça bacteriológica de platina para uma tira de papel de filtro Whatman, impregnada com solução de N,N dimetil-p-fenilenodiamino:

-teste positivo: desenvolvimento de coloração rosa a púrpura em 10 a 30 segundos;

-teste negativo: ausência de coloração.

Figura 19. Prova da oxidase para confirmação de Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*



A maioria das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* são positivas para este ensaio

Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.1.3 Detecção de fluoresceína

Uma colônia isolada do meio Cetrimide foi transferida para tubo contendo ágar para detecção de fluoresceína e incubado a 30 a 35 °C durante 18 - 24 horas. A fluorescência do ágar sob luz ultravioleta foi examinada no comprimento de onda de 254 nm (Figura 20).

Figura 20. Prova de Detecção da fluoresceína das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*



A maioria das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produz fluoresceína.

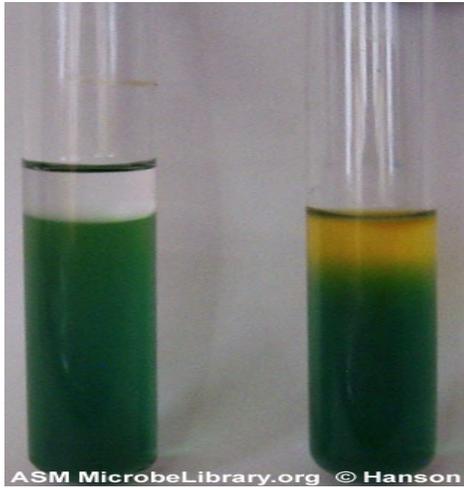
Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.1.4 Oxidação/fermentação da glicose

Este teste possibilita determinar a capacidade de um micro-organismo para oxidação e ou fermentação do carboidrato.

Com agulha bacteriológica, uma colônia isolada do meio Cetrimide foi inoculada em dois tubos contendo o meio OF de glicose. Um tubo foi fechado com 0,5 mL de óleo mineral (anaerobiose) e o outro sem óleo (aerobiose) foram incubados a $32,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ durante 48 ± 3 horas. Paralelamente foram inoculados 2 tubos contendo o meio com *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00230 (ATCC 9027) como controle (positivo) e o outro com *Acinetobacter baumannii* INCQS (ATCC) como controle (negativo) (Figura 21).

Figura 21. Resultados de oxidação e fermentação de glicose para Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*



Interpretação: Anaerobiose- meio permanece de cor verde (não fermentador)

Aerobiose- meio amarelo (oxidadação)

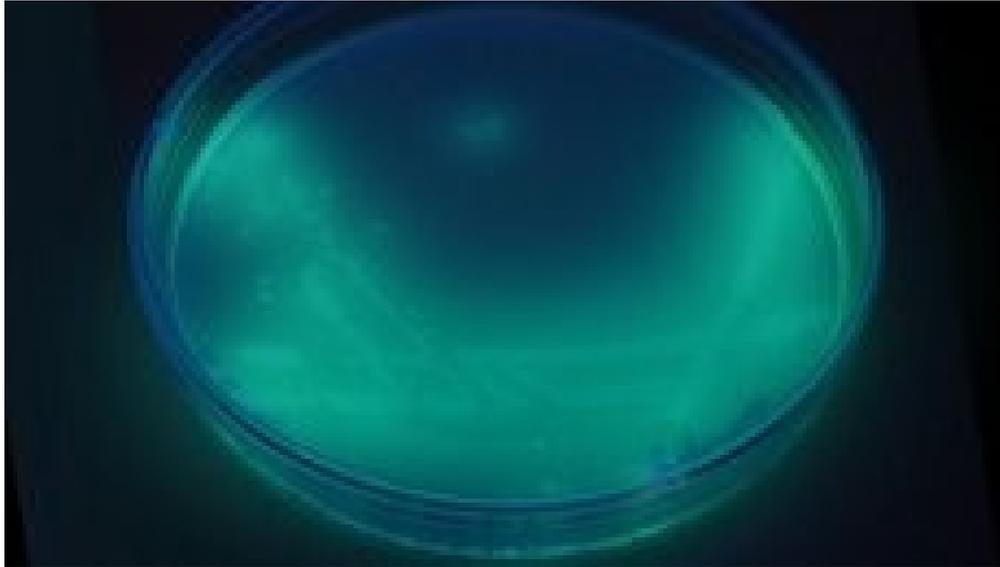
Cepas de *P. aeruginosa* não utilizam a glicose anaerobicamente durante seu metabolismo, porém aerobicamente podem oxidar a glicose.

Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.1.5 Detecção de piocianina

Tranferiu-se cerca de 1 mL de clorofórmio para a superfície de uma placa de ágar cetrímide contendo a cultura de (24 horas) suspeita de *Pseudomonas aeruginosa*, para extração de pigmento. Paralelamente foram inoculados 2 placas de ágar cetrímide uma com cultura de *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00230 (ATCC 9027) controle (positivo) e a outra com a cultura de *Escherichia coli* INCQS 00219 (ATCC 8739) como controle (negativo). Após a extração imediatamente foi observado o desenvolvimento de cor azul significando a presença de piocianina (Figura 22). A piocianina é um fator de virulência que catalisa a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio.

Figura 22. Resultado positivo para detecção de piocianina



A coloração azul indica presença de piocianina; ausência de cor indica ausência de piocianina
A maioria das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* é positiva para esta prova.

Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.1.6 Crescimento a $42 \pm 1^\circ\text{C}$

Foi transferida uma alçada das culturas para tubo contendo caldo infusão de cérebro e coração. Paralelamente foram inoculados 2 tubos contendo o meio com *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00230 (ATCC 9027) controle positivo e *Staphylococcus aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538) como controle negativo. Incubados os tubos a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho termostático durante 48 ± 3 horas. Após o período de incubação as colônias positivas para este ensaio turvaram o meio. As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam crescimento a 42°C . Havendo turvação têm-se resultado positivo, o meio sem alteração indica resultado negativo.

4.8.2 Determinação de *Burkholderia cepacia*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas stutzeri* .

Após o período de incubação os crescimentos não característicos de *Pseudomonas aeruginosa*, foram submetidos a coloração de Gram e a provas bioquímicas complementares (Figuras 23 e 24), segundo POP INCQS/FIOCRUZ 65.3210.008 e VERSALOVIC, 2011.

Figura 23. Provas Bioquímicas complementares para bactérias não fermentadoras de glicose

PROVAS	AMOSTRA	CONT.POSITIVO	CONT.NEGATIVO
Manitol		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>B.cereus</i> Lote: Criotubo:
Lactose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>M.morganii</i> Lote: Criotubo:
Sacarose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>M.morganii</i> Lote: Criotubo:
Maltose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>B.diminuta</i> Lote: Criotubo:
Trealose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>S.epidermidis</i> Lote: Criotubo:
Frutose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>B.diminuta</i> Lote: Criotubo:
Galactose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>B.diminuta</i> Lote: Criotubo:
Manose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>B.diminuta</i> Lote: Criotubo:
Ramminose		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>B.diminuta</i> Lote: Criotubo:
Esculina		<i>S. maltophilia</i> Lote: Criotubo	<i>P. aeruginosa</i> Lote: Criotubo
Cresc. 6% nacl		<i>A. xylooxidans</i> Lote: Criotubo	<i>B. diminuta</i> Lote: Criotubo
Cresc. 6.5% nacl		<i>p. stuzeri</i> Lote: Criotubo	<i>P. aeruginosa</i> Lote: Criotubo

POP 65.3210.008 – Anexo F – fl.5 – Rev. 11
CLASSIFICAÇÃO: 542

Fonte: Anexo F – fl. 5 do POP 653210008: Pesquisa de patógenos em produtos não estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação e água para diálise

Figura 24. Provas Bioquímicas complementares para bactérias não fermentadoras de glicose

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		 INCQS	
PROVAS BIOQUÍMICAS COMPLEMENTARES (CONTINUAÇÃO) Não Fermentador da Glicose			
PROVAS	AMOSTRA	CONT.POSITIVO	CONT.NEGATIVO
Cetrimide		<i>F. aeruginosa</i> Lote: Criotubo	<i>S. aureus</i> Lote: Criotubo
Ureia		<i>S. aureus</i> Lote: Criotubo	<i>E. coli</i> Lote: Criotubo
Nitrato		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:	<i>S. epidermidis</i> Lote: Criotubo:
Cresc. 42±1°C		<i>F. aeruginosa</i> Lote: Criotubo	<i>S. aureus</i> Lote: Criotubo
Lisina		<i>S. maltophilia</i> Lote: Criotubo	<i>E. agglomerans</i> Lote: Criotubo
Arginina		<i>F. aeruginosa</i> Lote: Criotubo	<i>S. aureus</i> Lote: Criotubo
Ornitina		<i>F. mirabilis</i> Lote: Criotubo	<i>E. agglomerans</i> Lote: Criotubo
DNase		<i>S. aureus</i> Lote: Criotubo	<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:
Amido		<i>B. subtilis</i> Lote: Criotubo	<i>F. aeruginosa</i> Lote: Criotubo:
Gelatina		<i>S. maltophilia</i> Lote: Criotubo	<i>F. aeruginosa</i> Lote: Criotubo:
VM		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo	<i>p. aeruginosa</i> Lote: Criotubo:
VP		<i>E. cloacae</i> Lote: Criotubo	<i>E. coli</i> Lote: Criotubo:
Citrato de Simmons		<i>E. coli</i> Lote: Criotubo	<i>F. aeruginosa</i> Lote: Criotubo:
Agar Tween 80		<i>S. maltophilia</i> Lote: Criotubo	<i>Pseudomonas sp.</i> Lote: Criotubo:
Esculina		<i>S. maltophilia</i> Lote: Criotubo	<i>F. aeruginosa</i> Lote: Criotubo:
Resultado:			
POP 65.3210.008 – Anexo F – fl.6 – Rev. 11 CLASSIFICAÇÃO: 542			

Fonte: Anexo F – fl. 6 do POP 653210008: Pesquisa de patógenos em produtos não estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação e água para diálise

4.8.3 Determinação de *Staphylococcus aureus*

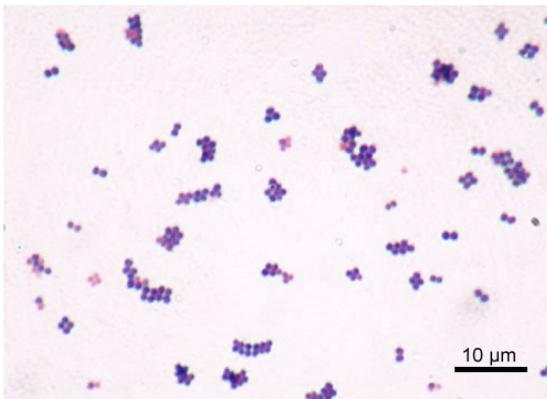
A partir do material enriquecido em caldo caseína-soja, foi transferida uma alçada para superfície de placa contendo ágar sal manitol e paralelamente foram inoculados um controle positivo (*S. aureus*) e um negativo (*S. epidermidis*) e incubados a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. Após o período de incubação foi verificado o desenvolvimento de colônias típicas (amarelas ou brancas rodeadas por uma zona amarela) (Figura 25). As colônias foram repicadas em tubos contendo ágar tripticaseína de soja inclinado e incubadas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas. Após 24 horas de incubação foram submetidas aos ensaios: coloração de Gram – item 4.8.1.1 (Figura 26), desoxiribonuclease (DNase), coagulase, catalase e utilização anaeróbica da glicose.

Figura 25. Colônias de *Staphylococcus aureus* em placa de ágar Sal manitol.



Fonte: própria do autor

Figura 26. Colônias de *Staphylococcus aureus* em coloração de Gram



As cepas de *Staphylococcus aureus* apresentam-se como cocos Gram positivos isolados ou em agrupamentos semelhantes a cachos de uvas.

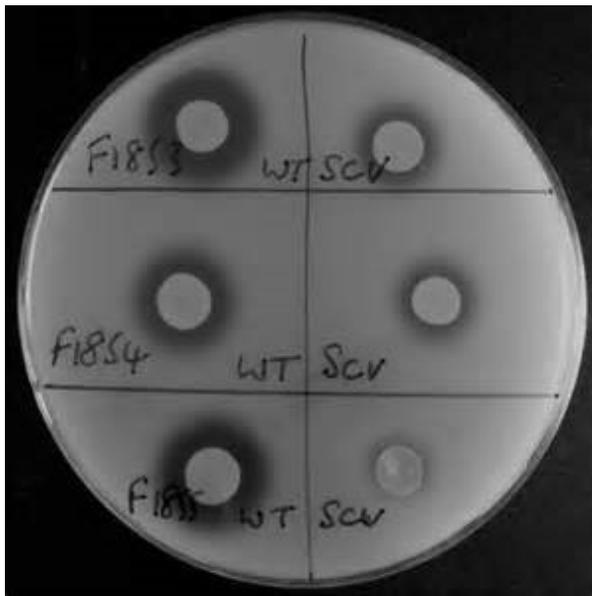
Fonte:biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.3.1 Prova da DNase

Esta prova determina a capacidade do micro-organismo produzir a enzima DNase, que tem como função catalisar a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do ácido desoxirribonucleico (ADN).

As culturas com características morfológicas de *S. aureus* foram repicadas em placas de Petri contendo ágar desoxirribonuclease e incubadas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24 horas. Após período de incubação foi adicionado solução de ácido clorídrico 1N para observação da formação de zona incolor ao redor do crescimento, indicando reação positiva (Figura 27).

Figura 27. Prova da DNase para *Staphylococcus aureus*



A maioria das cepas de *S. aureus* são positivas para este ensaio.

Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.3.2 Prova da coagulase

Esta prova determina a capacidade do micro-organismo produzir a enzima coagulase que tem a função de coagular o plasma sanguíneo através de um mecanismo similar ao da coagulação normal.

As culturas com características morfotintoriais de *S. aureus* foram repicadas em tubos contendo caldo infusão de cérebro e coração, incubados a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24 horas. Após o período de incubação foram transferidos 0,3 mL da cultura em caldo infusão de cérebro e coração para tubo 13x100 mm contendo igual volume de plasma de coelho com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), homogêinizados e incubados em banho termostático a 45-50°C. Na Figura 28 observa-se o resultado da prova da Coagulase.

A prova é positiva para *S. aureus* na presença de coágulo rígido que não se desloca quando da inversão do tubo e negativa na ausência de coágulo após 24 horas de incubação.

Figura 28. Controles positivo e negativo para prova da coagulase



As cepas de *S. aureus* são positivas para esta prova..

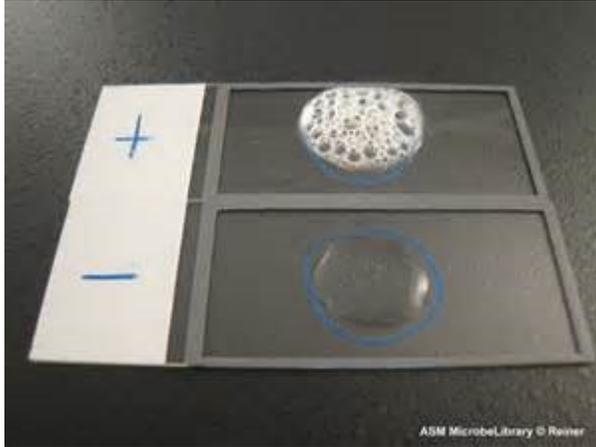
Fonte:biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.3.3 Prova da Catalase

Esta prova determina a capacidade do micro-organismo produzir a enzima catalase para degradar o peróxido de hidrogênio.

As culturas incubadas em estufa de 18 a 24 horas em ágar tripticaseína de soja inclinado foram transferidas para lâmina de vidro limpa e desengordurada, com o auxílio de uma alça de níquel- cromo. Paralelamente foram transferidos um controle positivo e um negativo. Adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 30%. Observou-se formação de bolhas de gás em ambas as amostras, assim como no controle positivo (Figuras 29 e 30).

Figura 29. Controle positivo e negativo para prova da catalase



Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

Figura 30. Prova da catalase positiva para *Staphylococcus aureus*



A prova positiva apresenta formação de bolhas de gás (oxigênio livre) já na prova negativa há ausência de formação de bolhas de gás. As cepas de *Staphylococcus aureus* são positivas para este ensaio.

Fonte: o próprio autor

4.8.3.4 Prova da utilização anaeróbica da glicose

Esta prova determina a capacidade do micro-organismo de utilizar a glicose anaerobicamente como substrato para produção de energia.

As culturas com características morfológicas de *S. aureus* foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo para fermentação de glicose e adicionados 0,3 mL de óleo mineral estéril. Incubadas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 horas, todas as culturas suspeitas de *Staphylococcus aureus* deram resultado positivo para este teste, alterando a cor do meio de verde para amarelo (Figura 31).

Figura 31. Prova da utilização anaeróbica da glicose positiva



Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.4 Determinação de *Bacillus cereus*

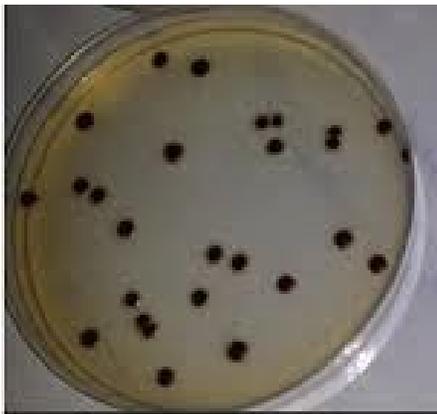
A partir do material enriquecido em caldo caseína-soja, foi transferida uma alçada para placa contendo ágar caseína soja e semeada por esgotamento; paralelamente foram inoculados um controle positivo e um negativo e incubados a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. Após período de incubação foi verificado o desenvolvimento de colônias típicas que foram semeadas em ágar caseína soja inclinado e submetidas aos seguintes ensaios: catalase; mobilidade; corpo paraesporal; Voges-Proskauer; pH entre 6,0 e 7,0; D-glicose; L-arabinose; D-xilose; D-manitol;

decomposição da caseína; decomposição do amido; liquefação da gelatina; quebra dos cristais de tirosina; citrato de Koser; desaminação da fenilalanina; produção de nitrato; indol; lecitinase; lisozima; crescimento em caldo nutriente com 2%,5%,7% e 10% NaCl e crescimento a 50 e 55 °C (VERSALOVIC et al, 2011).

4.8.5 Determinação de *Candida albicans*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus parasiticus*

A partir do enriquecimento em caldo caseína-soja foi transferidas uma alçada para placa contendo ágar caseína-soja, outra para placa de ágar Sabouraud Dextrose e outra para placa de Agar Nickerson. As colônias de coloração marrom/preta (Figura 32) em Agar Nickerson e colônias brancas (Figura 33) em agar Sabouraud dextrose foram semeadas por esgotamento e incubadas a 32,5 °C \pm 2,5 °C durante 5 - 7 dias para confirmar a presença de *C. albicans*.

Figura 32. Colônias de *C. albicans* (pretas) em agar Nickerson



Fonte: própria do autor.

Figura 33. Colônias de *C. albicans* em Agar Sabourad positivo (colônias brancas)



Fonte: Própria do autor

Após período de incubação foram verificadas características morfológicas das culturas pela observação macroscópica (Figura 34) em corante azul de algodão lactofenol, colônias grandes com crescimento radial, micélio aéreo de coloração inicialmente branca, tornando-se verde oliva que foram submetidas as observações micro e macromorfológicas indicando fungos filamentosos *Aspergillus flavus* (Figura 35) e *Aspergillus parasiticus* (Figura 36).

Figura 34. Características morfológicas de colônias de *Aspergillus flavus* em corante azul de algodão lactofenol



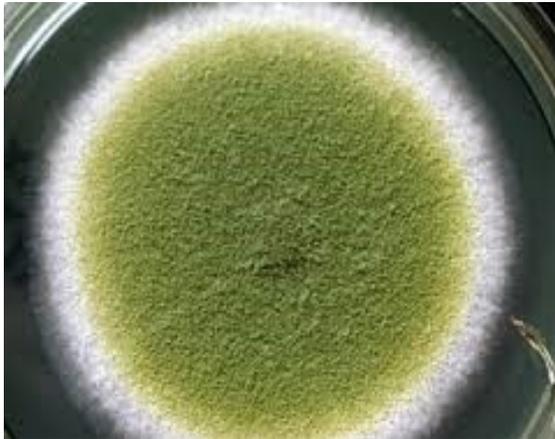
Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

Figura 35. Fotomicroscopia de *Aspergillus* sp.



Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

Figura 36. Características macromorfológicas de colônias de Agar Sabourad com presença de *Aspergillus parasiticus*.

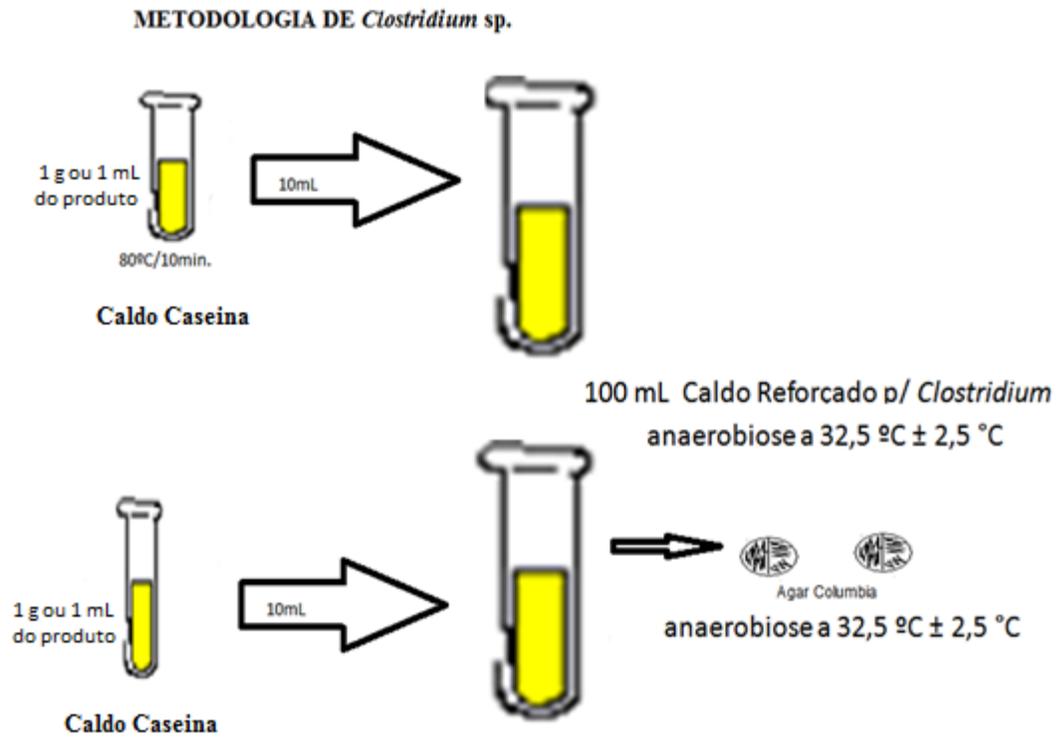


Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.6 Determinação de *Clostridium sp.*

Em dois tubos contendo 9 mL de caldo caseína cada foram adicionados 1 g ou 1mL do produto a ser examinado, totalizando 10 mL em cada tubo. Um dos tubos foi aquecido a 80 °C durante 10 minutos e imediatamente esfriado. Cada porção de 10 mL homogeneizada foi inoculada em frasco contendo 100 mL de caldo Reforçado para *Clostridium* e incubadas em anaerobiose a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 48 horas (Figura 37). Após o período de incubação, foi transferida uma alça de cada frasco para placas contendo agar Columbia, que foi incubada em anaerobiose a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 48 horas (Figura 38). O crescimento de colônias catalase negativas, com micromorfologia de bacilo Gram-positivo (com ou sem endósporos) indica presença de *Clostridium sp.* como mostrado na figura 39.

Figura 37. Esquema da metodologia para pesquisa de *Clostridium sp.*



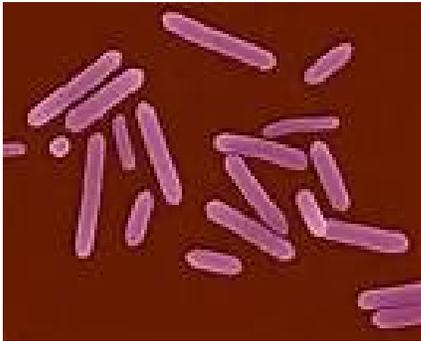
Fonte: Própria do autor

Figura 38. Característica macromorfológica de colônias de *Clostridium sp.* em agar Columbia



Fonte: Própria do autor

Figura 39. Macromorfologia de Bastonetes Gram positivos visualizados através da coloração de Gram.



Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.6.1 Endósporos

Tem como função primária, garantir a sobrevivência da bactéria por períodos de estresse ambiental. São resistentes à radiação ultravioleta e gama, lisozima, altas temperaturas e desinfetantes químicos. Endósporos (Figura 40) são comumente encontrados no solo e na água, onde sobrevivem por longos períodos. Sua localização celular pode ser terminal, subterminal e central (VERSALOVIC et al, 2011).

Figura 40. Endospóros visualizados em coloração de Gram



Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.7 Determinação de *Salmonella*

A partir do material enriquecido em caldo MacConkey (diluição 1:10) foi transferido 0,1 mL do conteúdo para tubo contendo 10 mL de caldo Enriquecimento Salmonella Rappaport Vassiliadis que em seguida foi incubado a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas (Figura 41). Após o período de incubação foram realizadas subculturas em placa contendo agar xilose lisina

desoxicolato (XLD) e incubadas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 48 horas (Figura 42). O crescimento de colônias bem desenvolvidas, vermelhas com ou sem centro negro indicou a presença provável de *Salmonella* que foi confirmada pelos testes: coloração de Gram; utilização de açúcares, produção de gás e produção de gás sulfídrico (H_2S) em meio ácido sulfídrico, indol e motilidade (SIM) (Figura 43); pela descarboxilação da lisina, arginina e ornitina; pela prova da urease positiva (+); mobilidade e sorologia positiva (+) (Figura 44).

Figura 41. Tubos contendo caldo de enriquecimento para *Salmonella* Rappaport Vassiliadis



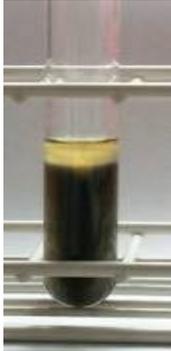
Fonte: Própria do autor

Figura 42. Colônias de *Salmonella* em agar XLD.



Fonte: Própria do autor

Figura 43. Produção de H₂S no meio de SIM.



Fonte: Própria do autor

Figura 44. Sorologia para *Salmonella sp.*

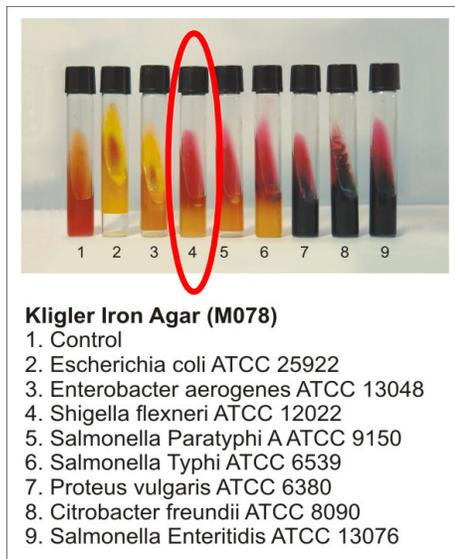


Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.8 Determinação de *Shigella* spp.

A partir do crescimento de colônias convexas e incolores em ágar MacConkey suplementado com 1mg/mL de telurito de potássio as colônias foram semeadas em placa contendo ágar XLD e incubadas a 35-37 °C durante 18-24 horas. Após período de incubação, verificou-se o desenvolvimento de colônias típicas (XLD-cor vermelha). As colônias com tais características foram transferidas para o crescimento no meio ágar ferro Kligler (KIA) e incubadas durante a noite (Figura 45). Após período de incubação, observou-se tubos suspeitos para *Shigella* da seguinte maneira: extremidade ácida (amarelo) e uma inclinação (vermelha) alcalina (ANVISA, 2010).

Figura 45. *Shigella* spp no meio de KIA



Fonte: biomedicinaunipacuberlandia.blogspot.com

4.8.9 Determinação de *Escherichi coli*, *Enterobacter cloacae*; *Serratia marcescens*; *Klebsiella sp.*

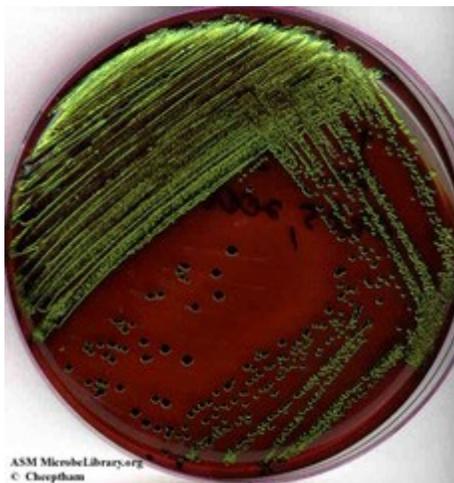
Adicionou-se 1mL da amostra enriquecida em caldo caseína-soja em frasco contendo 100mL de caldo MacConkey que foi incubado a 43 ± 1 °C por 24 a 48horas. Após período de incubação,foi semeada placa contendo ágar MacConkey e incubada a $32,5 \pm 2,5$ °C por 18 a 72horas (Figura 46). Observou-se o crescimento de colônias vermelhas, não mucosas, com micromorfologia característica de bacilos Gram-negativos, brilho metálico em ágar EMB, móvel, indol (positivo), indicando presença de *Escherichi coli* (Figura 47). As colônias com características diferentes, foram submetidas a provas complementares para identificação de *Enterobacter cloacae*; *Serratia marcescens*; *Klebsiella sp.* segundo POP INCQS/FIOCRUZ n°65.3210.008 e VERSALOVIC, 2011 como mostrado na Figura 23.

Figura 46. Macromorfologia de colônias de *E.coli* em Agar MacConkey



Fonte: ASM - <http://www.asm.org/>

Figura 47. Brilho metálico de colônias de *E.coli* em agar E.M.B



Fonte: ASM - <http://www.asm.org/>

4.9 Capacitação dos agricultores/produtores

A capacitação dos agricultores (Figura 48) ocorreu ao longo de cada oficina temática realizada em Curicica-RJ, onde foram apresentados o valor e a importância de se obter um produto com qualidade em todas as fases do cultivo. O risco que as plantas medicinais contaminadas podem representar para a saúde e, de que modo pode ser evitado. Com isso foi possível adotar as seguintes medidas preventivas e corretivas baseadas nas orientações de Corrêa; Scheffer(2013). Tais como:

- Visita ao local de coleta e acompanhar as etapas;
- Não fazer adubação com lodo de esgoto. O adubo aplicado não deve conter fezes humanas. Se for orgânico, de origem animal, deve estar completamente curtido(vermi) ou compostado, transformado em composto por minhocas antes da aplicação, para reduzir ao máximo a carga microbiana no produto.
- Resíduos de culturas e de outros vegetais também devem, preferencialmente, ser compostados para evitar a proliferação de doenças;
- O cultivo de plantas medicinais deve ser feito em áreas isentas de contaminação por metais pesados, resíduos de agrotóxicos ou qualquer outra substância química não natural, com a ausência de animais etc..;
- Atenção às etapas de colheita, beneficiamento e armazenamento;
- A água a ser irrigada é uma importante fonte de contaminação, principalmente microbiológica. Por esta razão deve-se analisar a água utilizada, certificando-se de que está dentro dos padrões de qualidade estabelecidos em relação aos contaminantes;
- Durante a manipulação do material vegetal/produto, os agricultores/técnicos devem usar touca, luvas, avental e máscara tanto para evitar a contaminação do produto quanto para evitar o contato dos mesmos com material vegetal/produto tóxico ou potencialmente alergênico (que provoca irritação da pele e das vias respiratórias), como é o caso de plantas que liberam “poeira”;
- Estufa de secagem e trituradores devem ser monitorados (limpeza, desinfecção);
- O material submetido à secagem não deve exceder a capacidade máxima da estufa para não comprometer esta etapa do processo;

- Pessoas que sabidamente sofrem de doença infecciosa transmissível, devem estar proibidas de acessar às áreas onde pode haver contato com o material vegetal/produto;
- Pessoas com cortes, feridas abertas, inflamações e infecções de pele devem ser mantidas longe das áreas de beneficiamento de plantas;
- Limpeza geral do Setor de Beneficiamento, com a participação dos técnicos do laboratório e dos agricultores que participam das oficinas de produção do sabonete;
- Higiene adequada das mãos;
- Utilização e troca de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) sempre que necessário nas oficinas de produção;
- Utilização de luva na coleta do material vegetal;
- Retirada de materiais pessoais que possam acarretar em contaminação externa na hora da produção;
- Limpeza das embalagens com solução clorada;
- Limpeza de todo o material utilizado na produção a cada lote;
- Realização da seleção do material vegetal no mesmo dia da coleta.

Figura 48. Oficina de capacitação de agricultores em Curicica utilizando EPI, e lavagem das embalagens.



Fonte: Fotografia obtida no Projeto de Fitoterápicos (Profito) de Far-manguihos/FIOCRUZ.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O total de amostras adquiridas foi de 288 provenientes de 5 agricultores diferentes, sendo 144 amostras de *Curcuma longa* e 144 amostras de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) no período de 2012 a 2015. Foram identificadas 49 espécies diferentes de micro-organismos, sendo que 25 espécies foram das amostras de *C. longa* e 24 das amostras de *S. terebinthifolius* (aroeira). Todas as 288 amostras apresentaram resultados negativos para o teste de atividade inibitória.

5.1 Resultados das análises microbiológicas nas amostras de *Curcuma longa*:

A Tabela 5 apresenta as contagens de micro-organismos presentes nas amostras de *C. longa* dos três diferentes agricultores, de Vargem Grande (VM), de Pau da fome (PF) e de Queimados (Q), no período de 2012 a 2015. As amostras de VG/M e de PF/J foram obtidas de 4 lotes diferentes com 4 amostras cada, no período de 2012 a 2015, enquanto de Q/D foram obtidas apenas 4 amostras de 1 lote no ano de 2013. Os Gráficos 1 a 9 mostram a distribuição dos microrganismos presentes nas amostras de *C. longa* obtidas dos 3 diferentes agricultores nas suas 4 diferentes fases de cultivo e processamento.

5.2 Capacitação dos agricultores

De 2012 a 2015 foram elaborados relatórios anuais com a participação dos envolvidos, para apresentação dos resultados e conseqüentemente, recomendações aos agricultores que se deram através de discussões ao longo de cada oficina realizada.

A descoberta de pontos críticos, reuniões e estabelecimento de boas práticas em todas as fases do processo, com tomada de medidas preventivas e corretivas, resultou na melhoria da qualidade dos produtos. O não cumprimento das boas práticas de colheita, produção, transporte e armazenamento foi visto como principal causador de contaminação adicional (OMS). A ampliação do conhecimento microbiológico nas propriedades dos agricultores foi fundamental para promover as boas práticas no cultivo e produção.

Tabela 5: Determinação do número total de bactérias aeróbias, Fungos e leveduras, Bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas de 3 agricultores de localidades diferentes no Estado do Rio de Janeiro

Localidade/ Agricultor	Lote:	Ano	FASES	Bactérias Aeróbias Totais (UFC/g)	Fungos e Leveduras (UFC/g)	Bactérias Gram negativas bile tolerantes (UFC/g)
VG/M	A	2012	1	$3,1 \times 10^9$	$1,0 \times 10^6$	10^6
VG/M	A	2012	2	$2,5 \times 10^8$	$2,6 \times 10^5$	10^6
VG/M	A	2012	3	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^5$	10^6
VG/M	A	2012	4	$1,6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	10^6
VG/M	A ₁	2013	1	$1,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$	10^5
VG/M	A1	2013	2	$2,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^5$	10^5
VG/M	A1	2013	3	$1,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^3$	10^5
VG/M	A1	2013	4	$1,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^3$	10^4
VG/M	A2	2014	1	$3,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	10^3
VG/M	A2	2014	2	$2,3 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	10^3
VG/M	A2	2014	3	$2,1 \times 10^3$	10^2	10^4
VG/M	A2	2014	4	$3,1 \times 10^3$	10^2	10^4
VG/M	A3	2015	1	$1,0 \times 10^2$	<10	10^3
VG/M	A3	2015	2	$1,1 \times 10^2$	<10	10^2
VG/M	A3	2015	3	$1,6 \times 10^3$	<10	10^2
VG/M	A3	2015	4	$3,0 \times 10^2$	<10	10^2
PF/J	B	2012	1	$1,9 \times 10^4$	<10	10^2
PF/J	B	2012	2	$1,0 \times 10^3$	<10	10^2
PF/J	B	2012	3	$1,0 \times 10^3$	<10	10^2

PF/J	B	2012	4	$1,3 \times 10^3$	<10	10^2
PF/J	B1	2013	1	$1,1 \times 10^2$	<10	10^2
PF/J	B1	2013	2	$1,5 \times 10^1$	<10	10^2
PF/J	B1	2013	3	$2,1 \times 10^1$	<10	10^2
PF/J	B1	2013	4	$2,1 \times 10^1$	<10	10^2
PF/J	B2	2014	1	$1,4 \times 10^2$	<10	10^1
PF/J	B2	2014	2	$1,0 \times 10^2$	<10	10^1
PF/J	B2	2014	3	$1,6 \times 10^1$	<10	10^1
PF/J	B2	2014	4	$1,6 \times 10^1$	<10	10^1
PF/J	B3	2015	1	$1,1 \times 10^1$	<10	10^1
PF/J	B3	2015	2	$3,0 \times 10^1$	<10	10^1
PF/J	B3	2015	2	$1,0 \times 10^1$	<10	10^1
PF/J	B3	2015	4	$2,5 \times 10^1$	<10	10^1
Q/D	C	2013	1	$1,6 \times 10^9$	$2,1 \times 10^7$	10^8
Q/D	C	2013	2	$5,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^7$	10^8
Q/D	C	2013	3	$6,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^5$	10^8
Q/D	C	2013	4	$1,1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^6$	10^8

VG/M = Vargem Grande/Agricultor M

PF/J= Pau da Fome/ Agricultor J

Q/D= Queimados/ Agricultor D

UFC/g= Unidade Formadora de colônia por grama

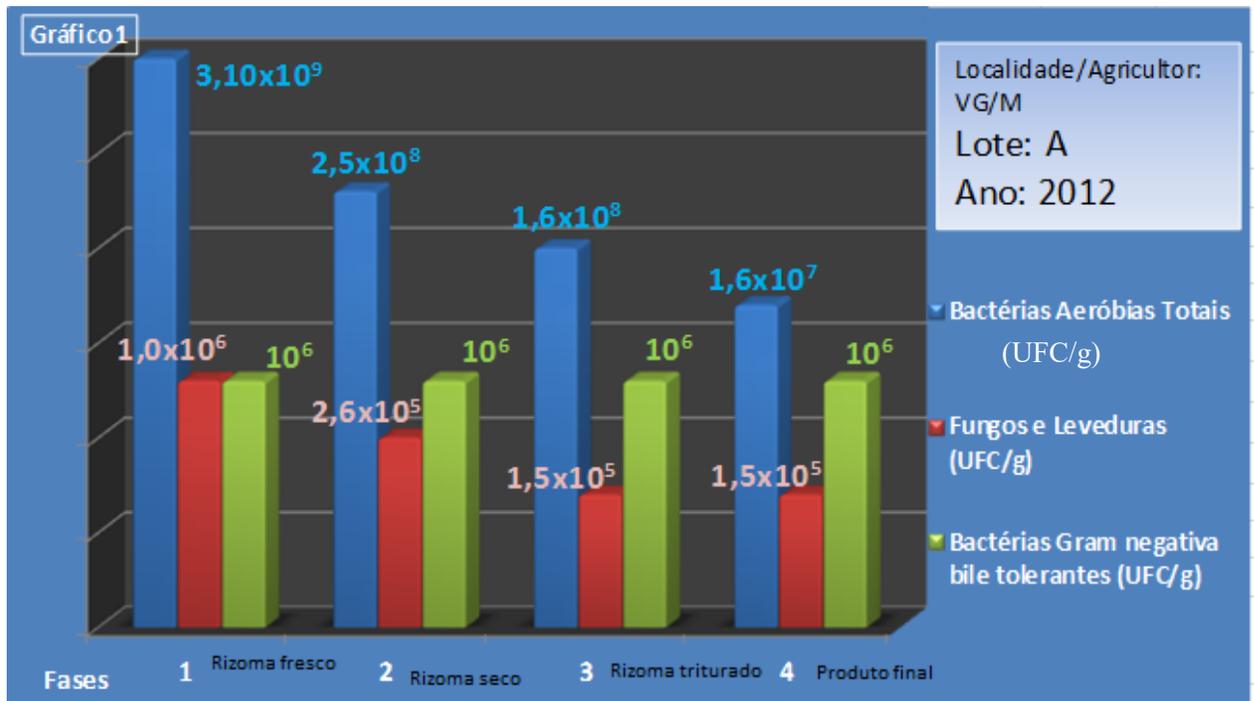
Fase 1=Rizoma fresco

Fase 2= Rizoma seco

Fase 3= Rizoma triturado

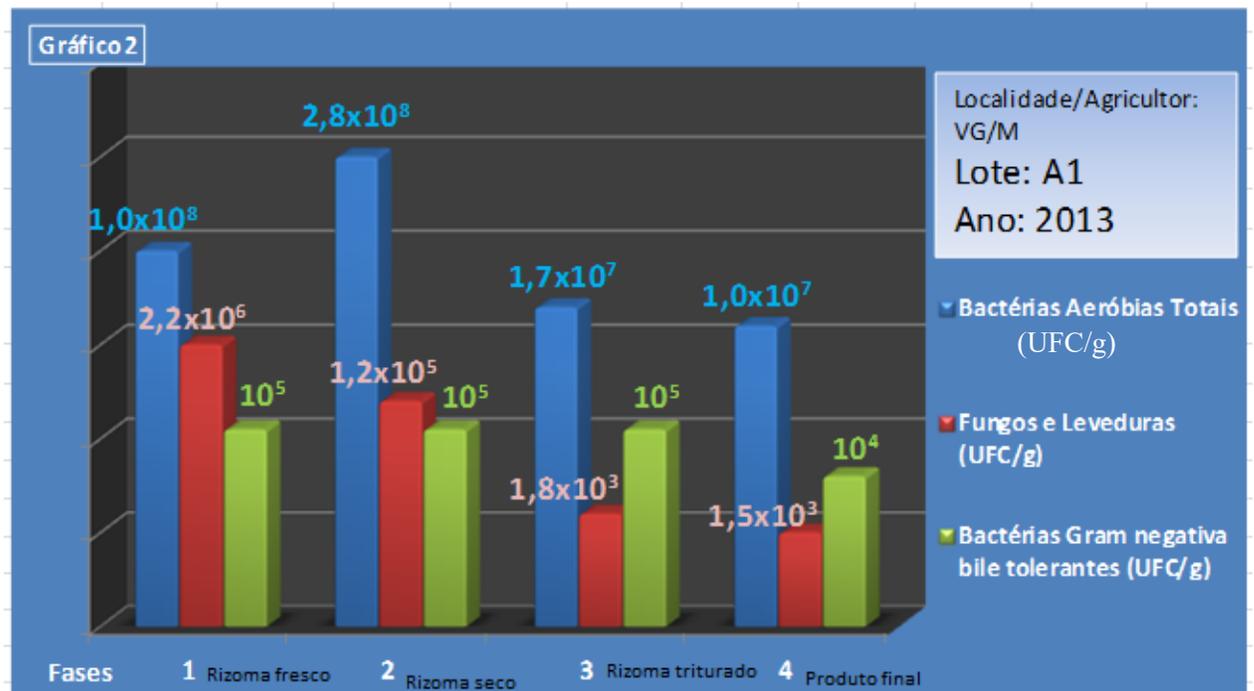
Fase 4= Produto final

Gráfico 1. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, de bolores e leveduras nas amostras de *Curcuma longa* obtidas no agricultor M de Vargem Grande (VG) no ano de 2012.



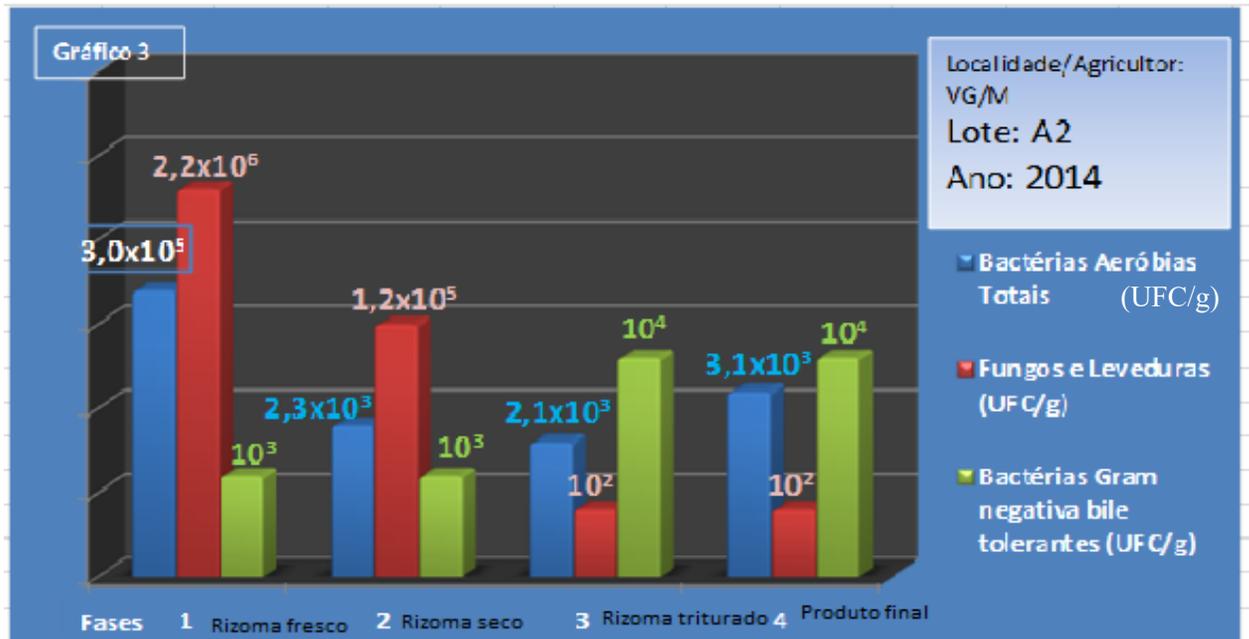
Neste gráfico observa-se que os resultados em todas as fases de processamento estão insatisfatórios, ou seja, em desacordo com os limites preconizados pela OMS e pela Farmacopéia Brasileira apresentados no Quadro 1 e na Tabela 1 (WHO, 2011; ANVISA, 2010) desde a matéria prima até produto final devido ao elevado números de bactérias aeróbias, bactérias bile tolerantes, bolores e leveduras e presença expressiva de microrganismos altamente patogênicos contidos na Tabela 6.

Gráfico 2. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor M de Vargem Grande no ano de 2013.



Este gráfico demonstra que em relação ao ano anterior, não foi observado mudanças quanto ao número de bactérias aeróbias e bactérias bile tolerantes e presença de patógenos, apenas uma leve diminuição no número de bolores e leveduras no material triturado (2) e no produto final (3). Nesse caso ainda fora dos parâmetros da OMS e da Farmacopéia Brasileira, foram identificados micro-organismos indesejáveis como mostrado na Tabela 6.

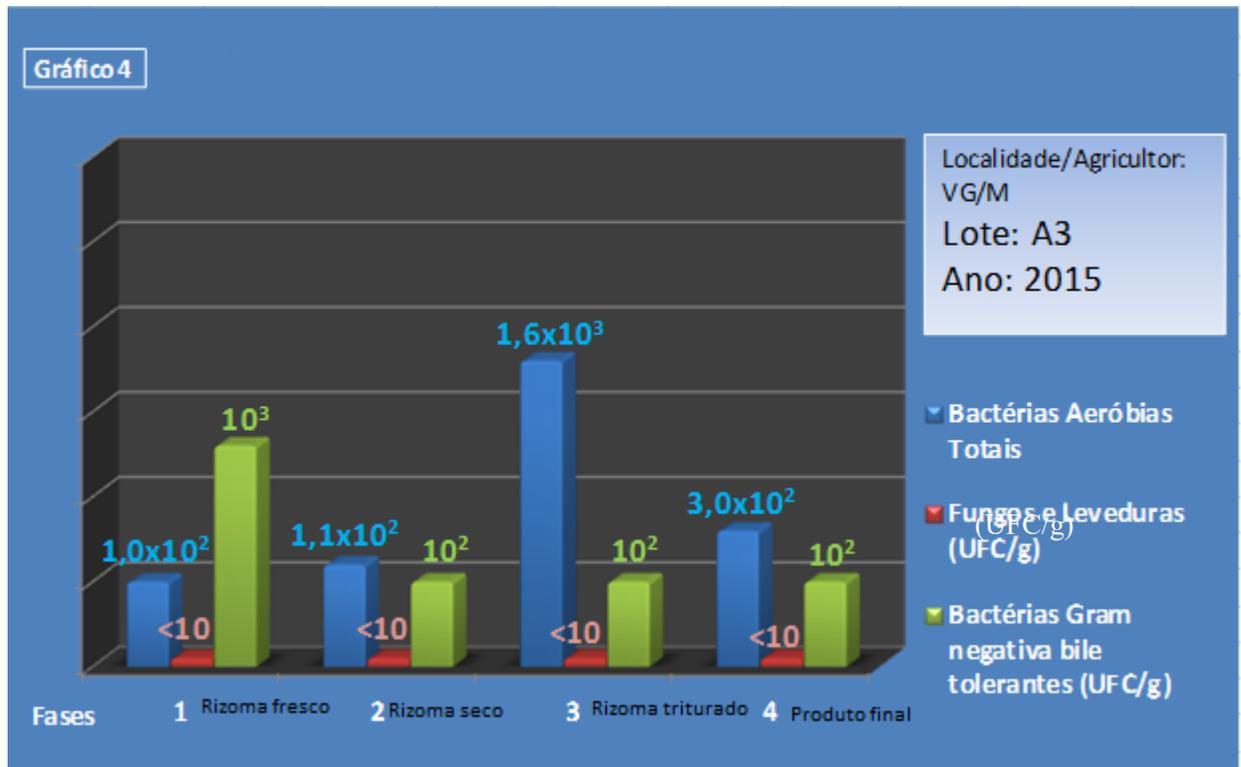
Gráfico 3. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor M de Vargem Grande (VG), RJ no ano de 2014.



Obsevou-se uma diminuição, no número de bactérias aeróbias, bactérias bile tolerantes, bolores e leveduras em todas as fases, mas ainda há presença de patógenos como *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e microrganismos indesejáveis* *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella oxytoca* e *Aspergillus parasiticus*.

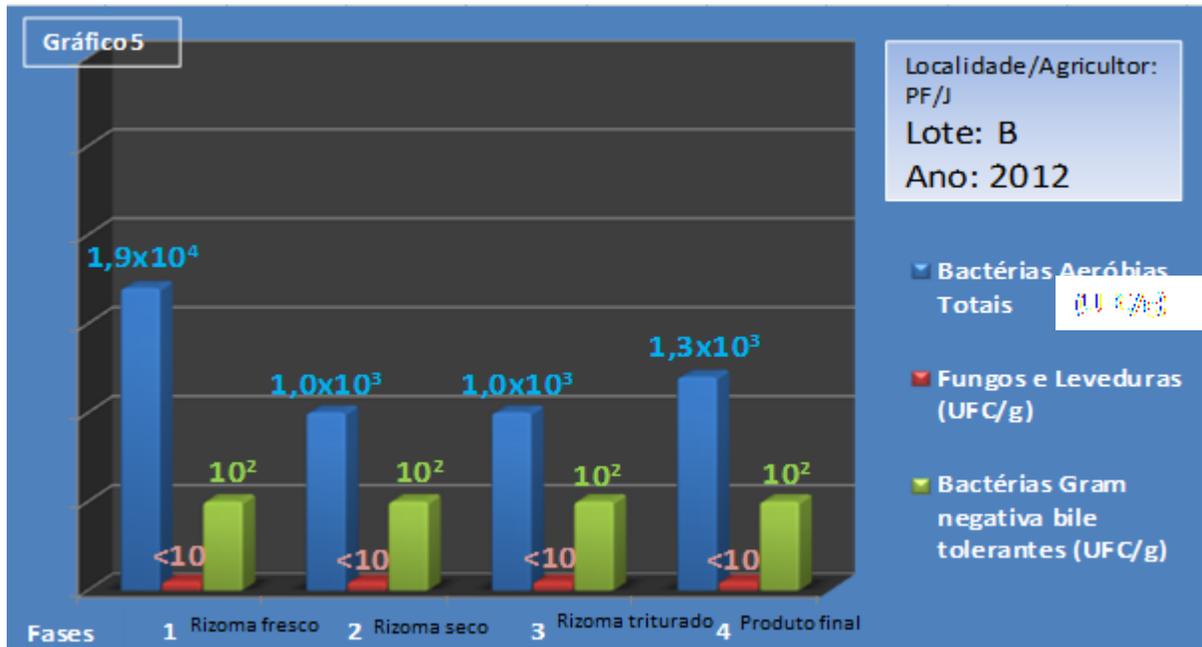
De acordo com a Farmacopéia Brasileira (ANVISA, 2010) são *indesejáveis os microrganismos que acima do limite permitido (2×10^3 UFC/g ou mL) podem se tornar patogênicos por isso indesejáveis na via oral e tópica.

Gráfico 4. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor M de Vargem Grande (VG), RJ no ano de 2015.



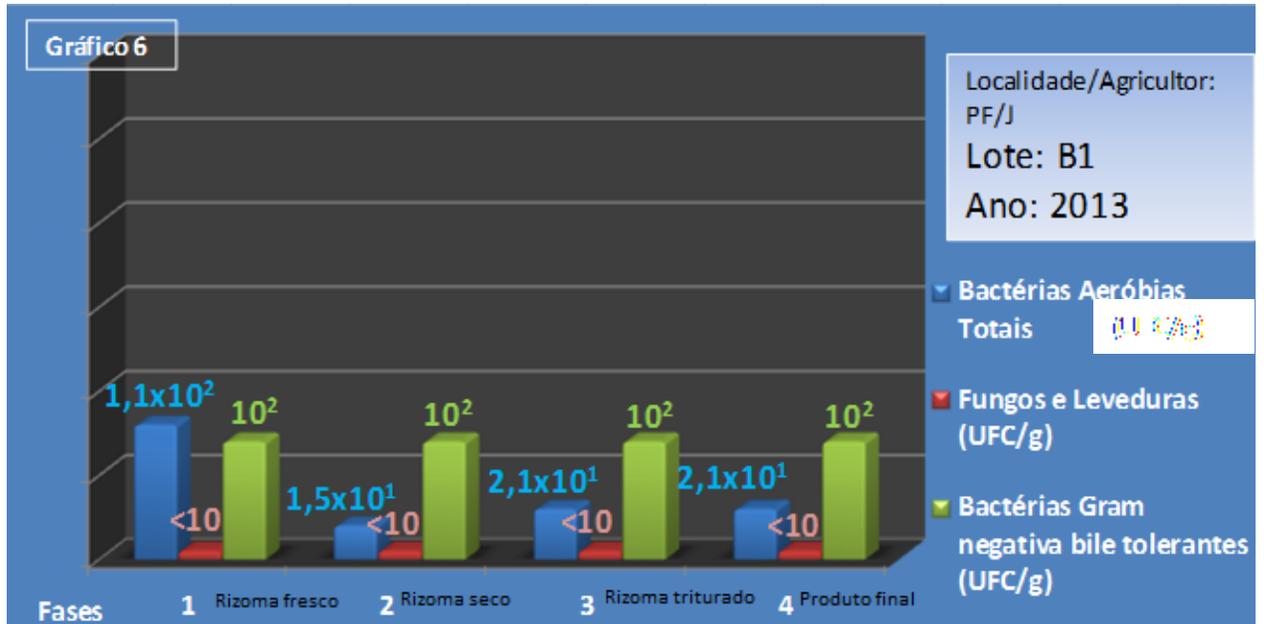
Os resultados apresentados no Gráfico 4, em 2015, demonstraram que o agricultor M conseguiu atingir um patamar de qualidade microbiológica em todas as fases, em termos quantitativos e qualitativos de acordo com o estabelecido pela OMS e Farmacopéia Brasileira (WHO, 2011; ANVISA, 2010). Demonstrou-se que é possível melhorar a qualidade desde a matéria prima até o produto final.

Gráfico 5. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, de bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor J de Pau da Fome (PF), RJ no ano de 2012.



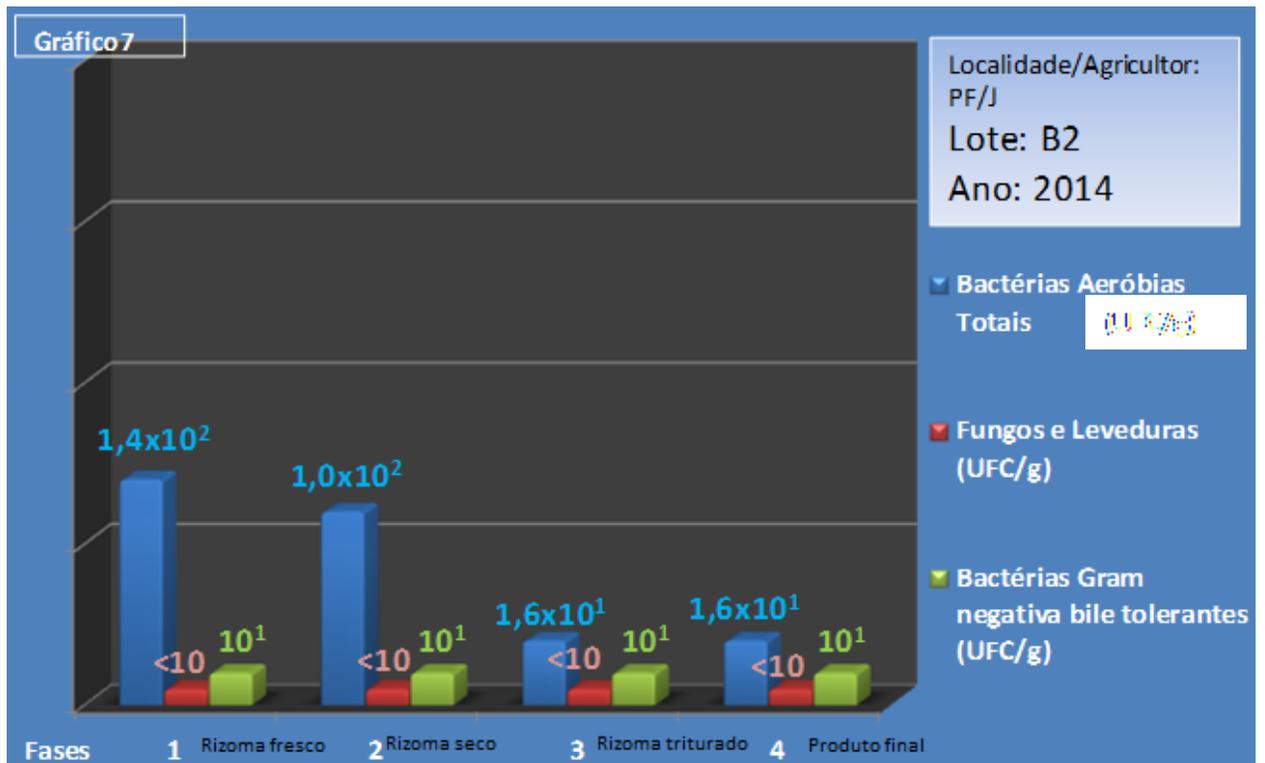
Observou-se que os resultados apresentados no Gráfico 5 encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela OMS e pela Farmacopéia Brasileira em todas as fases de processo de *C. longa* (WHO, 2011; ANVISA, 2010).

Gráfico 6. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor J de Pau da Fome (PF). RJ no ano de 2013.



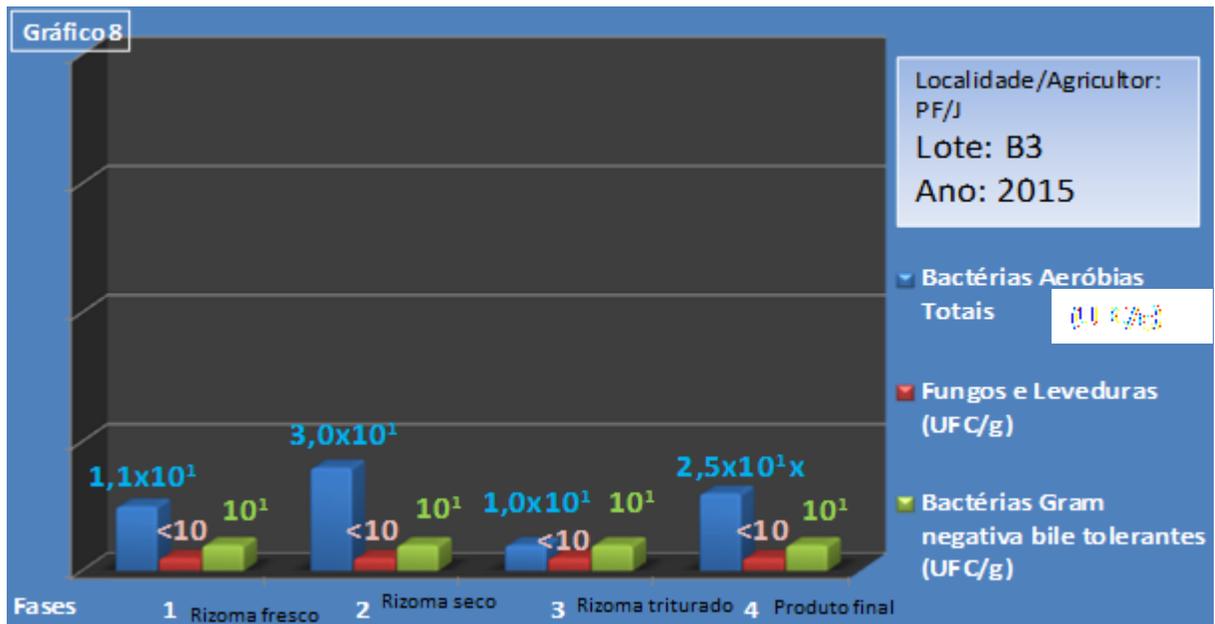
Os resultados apresentados no Gráfico 6 para o agricultor J de Pau da Fome (PF) foram satisfatórios, portanto dentro dos parâmetros estabelecidos pela OMS e Farmacopéia Brasileira em todas as fases, em termos quantitativos e qualitativos, tornando-se o padrão de referência de qualidade para fins comparativos (WHO, 2011; ANVISA, 2010).

Gráfico 7. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor J de Pau da fome, RJ no ano de 2014.



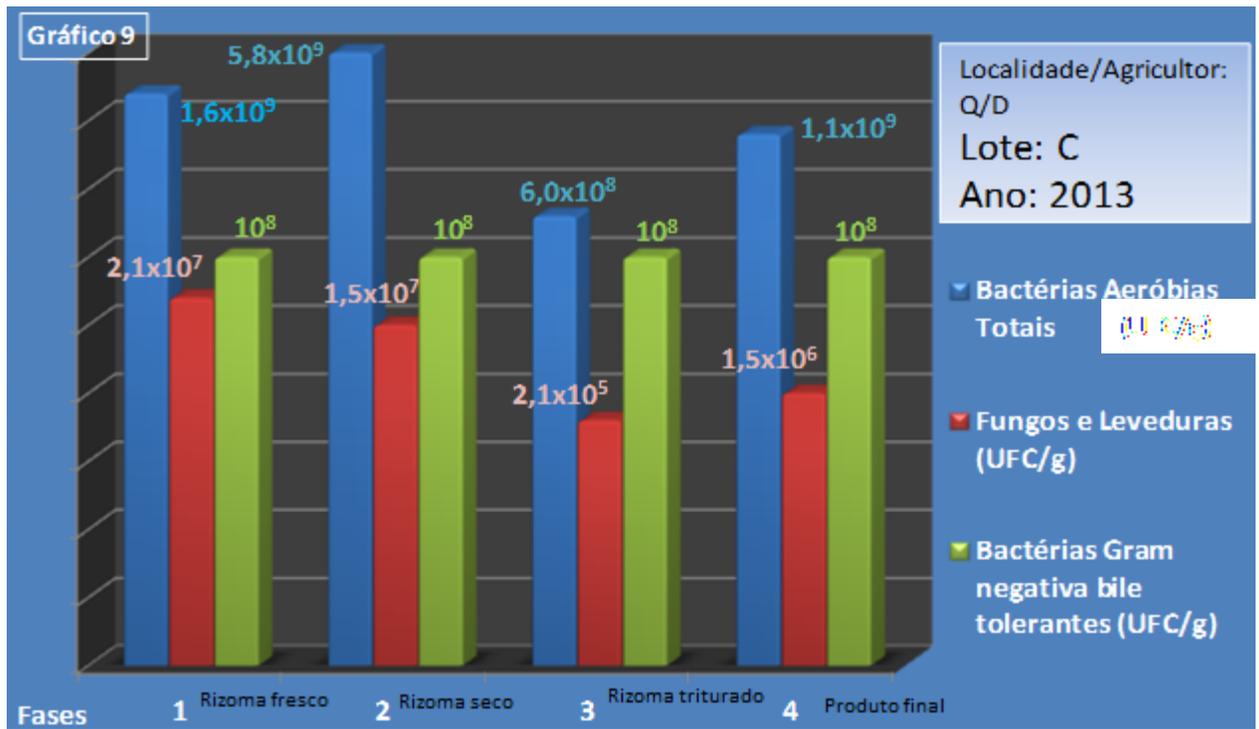
No Gráfico 7, observou-se que o agricultor J de Pau da Fome continua mantendo o padrão de qualidade microbiológica satisfatório, demonstrando que é possível manter a qualidade desde a matéria prima de *C. longa* até o produto final.

Gráfico 8. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor J de Pau da Fome (PF), RJ no ano de 2015.



Os resultados apresentados no Gráfico 8 demonstram que o agricultor J de Pau da Fome permanece com o mesmo padrão em todas as fases. Mediante o presente resultado, foi solicitado que relatasse sua experiência aos demais, uma vez que desde o início do trabalho (2012) ele se manteve como padrão de referência cumprindo em todas as fases do produto a qualidade preconizada pela OMS e Farmacopéia Brasileira, ou seja, dentro dos limites pré-estabelecidos de contaminação microbiológica, desde a matéria prima até o produto final (WHO, 2011; ANVISA, 2010) havendo presença apenas dos microorganismos comuns ao ambiente.

Gráfico 9. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de *Curcuma longa* obtidas do agricultor D de Queimados(Q) , RJ no ano de 2013.



Nos resultados apresentados no Gráfico 9 foi possível observar um elevado número de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e de bactérias bile tolerantes e a presença expressiva de patógenos insatisfatórios, portanto, em desacordo com os parâmetros da OMS e Farmacopéia Brasileira.

Em reunião para apresentação dos resultados o agricultor Q/D /2013 lote C, ficou preocupado com seus resultados, demonstrando interesse na melhoria da qualidade de suas condições de cultivo. Ressaltou que tinha um problema sério na água que usava no cultivo e quanto a presença de muitos animais nas suas plantações. Enfim, um tempo depois fomos informados que ele optou por sair do Programa.

A Tabela 6 mostra todos os microrganismos identificados em cada amostra de *Curcuma longa*.

Tabela 6. Micro-organismos identificados em cada amostra de *Curcuma longa* obtidas dos 3 agricultores participantes VG/M, PF/J e Q/D nos anos de 2012 a 2015.

Fases	Micro-organismos
VG/M/ 2012/ A 1. Rizoma fresco	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella sp.</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
2. Rizoma seco	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , e <i>Aspergillus parasiticus</i>
3. Rizoma triturado	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Shigella sonnei</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
4. produto final(pó)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
VG/M/ 2013/ A1 1. Rizoma fresco	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Serratia marcescens</i>
2. Rizoma seco	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Serratia marcescens</i>
3. Rizoma triturado	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Shigella sonnei</i> e <i>Serratia marcescens</i>
4. produto final(pó)*	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Shigella sonnei</i> .
VG/M 2014/ A2	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Enterobacter</i>

1.Rizoma fresco	<i>cloacae, Aspergillus parasi e Serratia marcescens, Cronobacter sakazakii, Klebsiella oxytoca e Aspergillus parasiticus</i>
2.Rizoma seco	<i>Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus, Hafnia alvei e Enterobacter agglomerans</i>
3.Rizoma triturado	<i>Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Shigella e Aspergillus parasiticus</i>
4.Produto final(pó)	<i>Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Shigella e Aspergillus parasiticus</i>
VG/M/2015/ A3	<i>Bacillus subtilis e Cedacea davisae</i>
1.Rizoma fresco	
2.Rizoma seco	<i>Bacillus subtilis, Enterobacter aerogenes, Raoultella planticola</i>
3.Rizoma triturado	<i>Bacillus cereus e Raoultella planticola</i>
4.Produto fina(pó)	<i>Serratia marcescens, Cedacea davisae</i>
PF/J/ 2012/B	<i>Cedacea davisae, Bacillus subtilis e Bacillus megaterium</i>
1.Rizoma fresco	
2.Rizoma seco	<i>Bacillus circulans, Bacillus sutibtilis, cedacea davisae</i>
3.Rizoma triturado	<i>Bacillus circulans, Bacillus sutibtilis, cedacea davisae</i>
4.Produto final(pó)	<i>Bacillus subtilis, Bacillus cereus e Bacillus megaterium</i>
PF/J/B1/2013	<i>Bacillus subtilis</i>
1.Rizoma fresco	
2.Rizoma seco	<i>Bacillus circulans e Bacillus subtilis</i>
3.Rizoma triturado	<i>Bacillus subtilis</i>
4.Produto fina(pó)	<i>Bacillus subtilis</i>
PF/J/B2/2014	<i>Bacillus subtilis</i>
1.Rizoma fresco	
2.Rizoma seco	<i>Bacillus circulans</i>
3.Rizoma triturado	<i>Bacillus subtilis</i>

4. Produto fina(pó)	<i>Staphylococcus epidermidis e Bacillus subtilis</i>
PF/J/B3/2015	
1. Rizoma fresco	<i>Bacillus subtilis</i>
2. Rizoma triturado	<i>Bacillus subtilis</i>
3. Produto fina(pó)*	<i>Bacillus cereus , Bacillus subtilis</i>
Q/D/C/2013	
1. Rizoma fresco	<i>Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Cronobacter sakazakii, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Enterobacter gergoviae, Bacillus cereus, Stenotrophomonas maltophilia, Salmonella, Shigella sonnei, Pseudomonas aeruginosa , Aspergillus parasiticus e Aspergillus flavus.</i>
2. Rizoma seco	<i>Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Cronobacter sakazakii, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Enterobacter gergoviae, Klebsiella oxyoca, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Shigella sonnei e Aspergillus parasiticus</i>
3. Rizoma triturado	<i>Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Cronobacter sakazakii, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Enterobacter gergoviae, Pseudomonas stutzeri, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Shigella sonnei e Aspergillus parasiticus</i>
4. produto final(pó)	<i>Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Cronobacter sakazakii, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Enterobacter gergoviae, Salmonella sp., Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Shigella sonnei Candida albicans e Aspergillus parasiticus</i>

5.3 Resultados das análises microbiológicas nas amostras de *Schinus terebinthifolius*:

A Tabela 7 apresenta as contagens de micro-organismos presentes nas amostras de *S. terebinthifolius* dos 4 diferentes agricultores no período de 2013 a 2015. Os Gráficos 10 a 21 mostram a distribuição dos microrganismos presentes nas amostras obtidas dos 4 agricultores de *Schinus terebinthifolius* nas suas 3 fases de cultivo e processamento.

Tabela 7. Contagens de bactérias Aeróbias, de bactérias Gram negativa bile tolerantes, bolores e Leveduras das amostras de *Schinus terebinthifolius* obtidas dos 4 agricultores de localidades diferentes no Estado do rio de Janeiro no período de 2013 a 2015.

Localidade/ Agricultor:	Produto	Lote	Ano	Fase	Bactérias Aeróbias Totais (UFC/g)	Fungos e Leveduras (UFC/g)	Bactérias Gram negativa bile tolerantes (UFC/ g)
VG/M	1.folhas frescas	A1- 003DS	2013	1	$1,5 \times 10^5$	10^2	10^3
VG/M	2.extrato aquoso	A1	2013	2	$2,0 \times 10^9$	10^3	10^3
VG/M	3.sabonete líquido	A10013. 03	2013	3	$1,5 \times 10^6$	10^3	10^3
VG/M	1.folhas frescas	A2-003 DS	2014	1	$1,8 \times 10^4$	10^2	10^2
VG/M	2.extrato aquoso	A2	2014	2	$1,0 \times 10^6$	10^2	10^3
VG/M	3. sabonete líquido	A2	2014	3	$2,1 \times 10^4$	10^2	10^3
VG/M	1.folhas frescas	A3- 003DS	2015	1	$1,0 \times 10^3$	<10	10^1
VG/M	2.extrato aquoso	A3	2015	2	$1,0 \times 10^2$	<10	10^2
VG/M	3. sabonete líquido	A3	2015	3	$3,1 \times 10^1$	<10	10^2
RP/E	1.folhas frescas	B1	2013	1	$1,1 \times 10^5$	<10	10^2
RP/E	2.extrato aquoso	B1	2013	2	$1,0 \times 10^4$	<10	10^2
RP/E	3. sabonete líquido	B1	2013	3	$3,1 \times 10^2$	<10	10^2
RP/E	1.folhas frescas	B2	2014	1	$2,4 \times 10^2$	<10	10^1
RP/E	2.extrato aquoso	B2	2014	2	$1,0 \times 10^3$	<10	10^1

RP/E	3. sabonete líquido	B2	2014	3	$1,0 \times 10^2$	<10	10^2
RP/E	1.folhas frescas	B3	2015	1	$1,0 \times 10^3$	<10	10^1
RP/E	2.extrato aquoso	B3	2015	2	$1,0 \times 10^2$	<10	10^1
RP/E	3. sabonete líquido	B3	2015	3	<100	<10	10^1
PF/R	1.folhas frescas	CS0016	2013	1	$1,2 \times 10^4$	$1,5 \times 10^2$	10^2
PF/R	2.extrato aquoso	C	2013	2	$1,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	10^2
PF/R	3. sabonete líquido	C	2013	3	$2,5 \times 10^2$	<10	10^2
PF/R	1.folhas frescas	C1S0016 .1	2014	1	$2,5 \times 10^3$	<10	10^2
PF/R	2.extrato aquoso	C1	2014	2	$2,1 \times 10^2$	<10	<10
PF/R	3. sabonete líquido	C1	2014	3	$2,2 \times 10^1$	<10	<10
PF/R	1.folhas frescas	C2	2015	1	$3,1 \times 10^2$	<10	<10
PF/R	2.extrato aquoso	C2	2015	2	$1,0 \times 10^2$	<10	<10
PF/R	3. sabonete líquido	C2	2015	3	<10	<10	<10
C/FIO	1.folhas frescas	D ₁	2013	1	$1,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	10^3
C/FIO	2.extrato aquoso	D ₁	2013	2	$2,1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^5$	10^5
C/FIO	3. sabonete líquido	D ₁	2013	3	$1,0 \times 10^4$	<10	10^5
C/FIO	1.folhas frescas	D ₂	2014	1	$4,1 \times 10^3$	<10	10^2
C/FIO	2.extrato aquoso	D ₂	2014	2	$2,3 \times 10^4$	<10	10^4
C/FIO	3. sabonete líquido	D ₂	2014	3	$7,1 \times 10^3$	<10	10^4
C/FIO	1.folhas frescas	D ₃	2015	1	$1,3 \times 10^4$	<10	10^2
C/FIO	2.extrato aquoso	D ₃	2015	1	$1,6 \times 10^2$	<10	10^2
C/FIO	3. sabonete líquido	D ₃	2015	2	<10	<10	10^2

VG/M= Vargem Grande/ Agricultor M

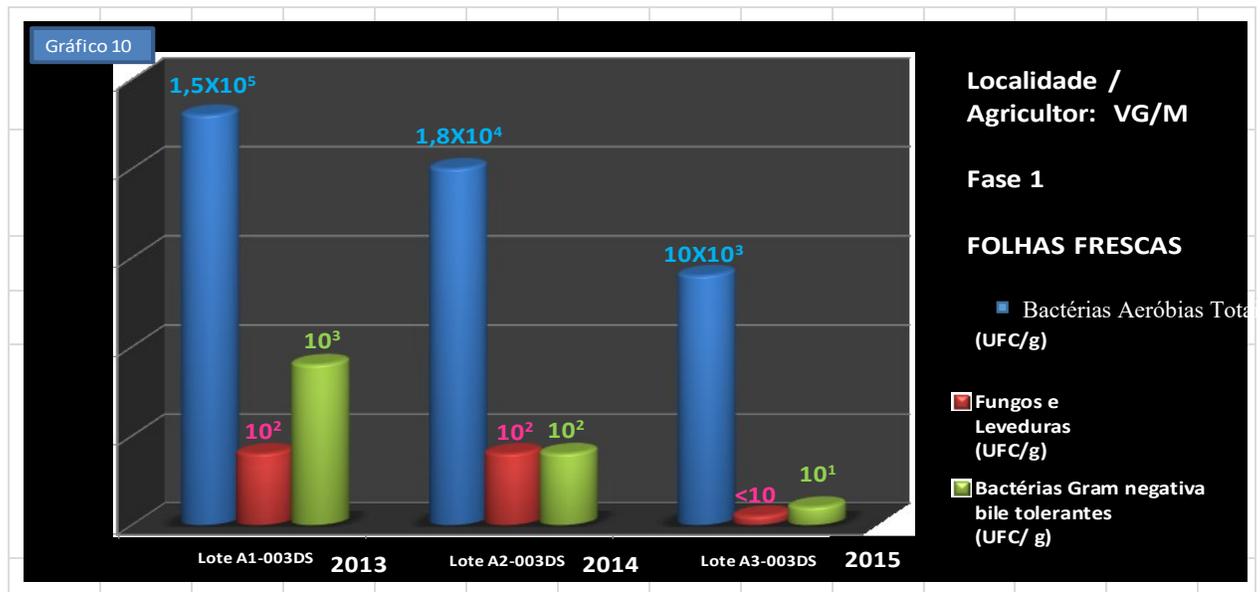
RP/E= Rio da Prata/ Agricultor E

PF/R= Pau da Fome/ Agricultor R

C/FIO = Curicica/ Campus da FIOCRUZ/NGBS

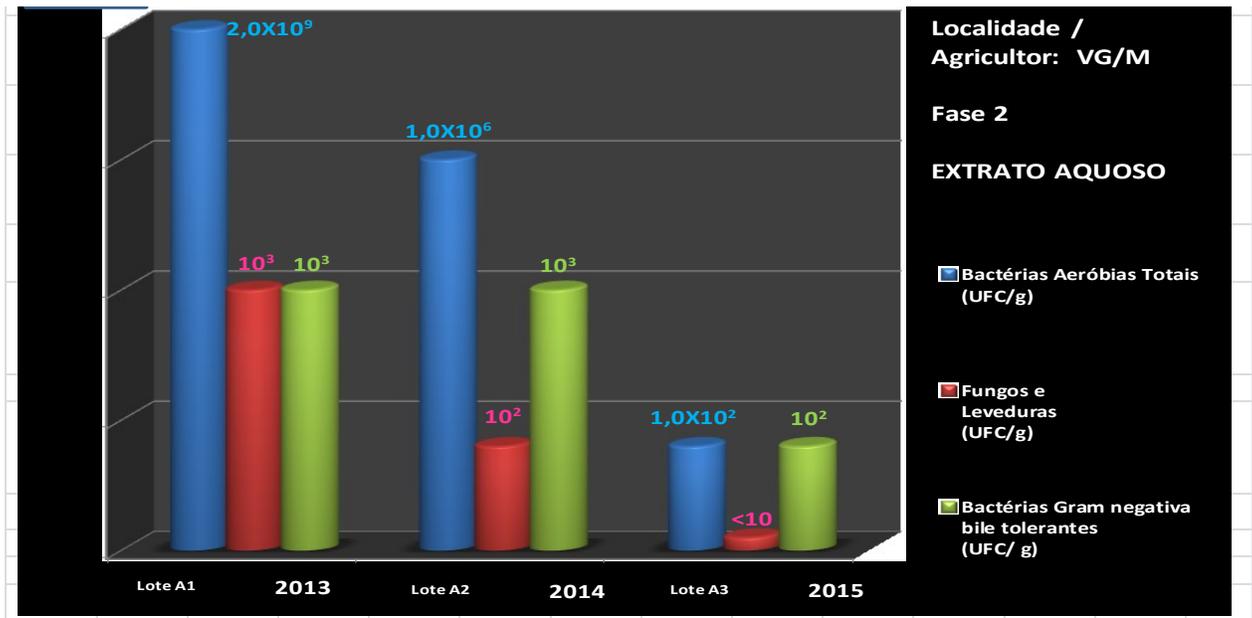
UFC/g= Unidade Formadora de Colônia por grama

Gráfico 10. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor M de Vargem Grande (VG), RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



No Gráfico 10 observou-se que todas as amostras de folhas frescas de *S. terebinthifolius* nos três anos consecutivos 2013 a 2015, foram satisfatórias quanto a qualidade microbiológica de acordo com a OMS e a Farmacopéia Brasileira (WHO, 2011; ANVISA, 2010).

Gráfico 11. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor M de Vargem Grande (VG) nos anos de 2013, 2014 e 2015.



No Gráfico 11 observou-se uma elevadíssima contaminação na fase de extrato aquoso, nas amostras de *Schinus terebinthifolius* no ano de 2013, onde todas as amostras estão insatisfatórias em relação aos limites preconizados para bactérias aeróbias, bolores e leveduras, bactérias bile tolerantes e devido a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e os **indesejáveis**: *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pantoeae agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Sphingomonas paucimobilis* (Tabela 8), comprometendo o produto final (sabonete líquido).

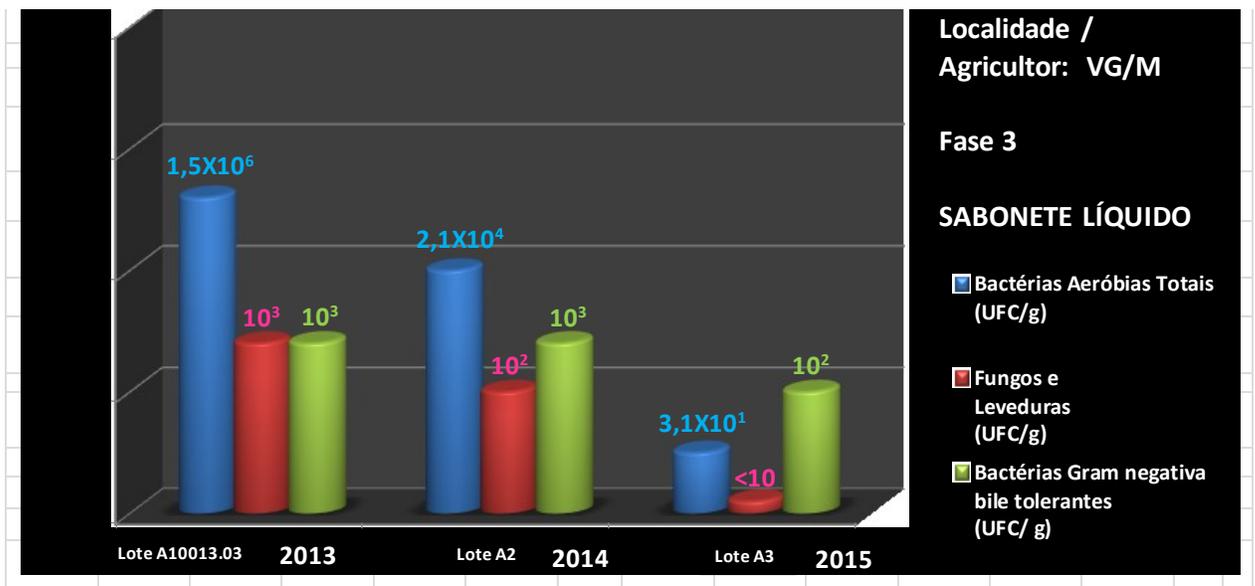
Estes microrganismos, certamente são provenientes da água e dos humano (VERSALOVIC et al, 2011).

Em reunião para mostrar os resultados, foi recomendado a análise da água e o monitoramento das boas práticas durante o processo.

A partir de 2014 observou-se uma profunda mudança na contagem de bactérias aeróbias, bactérias bile tolarentes, bolores e leveduras, nos extratos aquosos que passaram a ser satisfatórios.

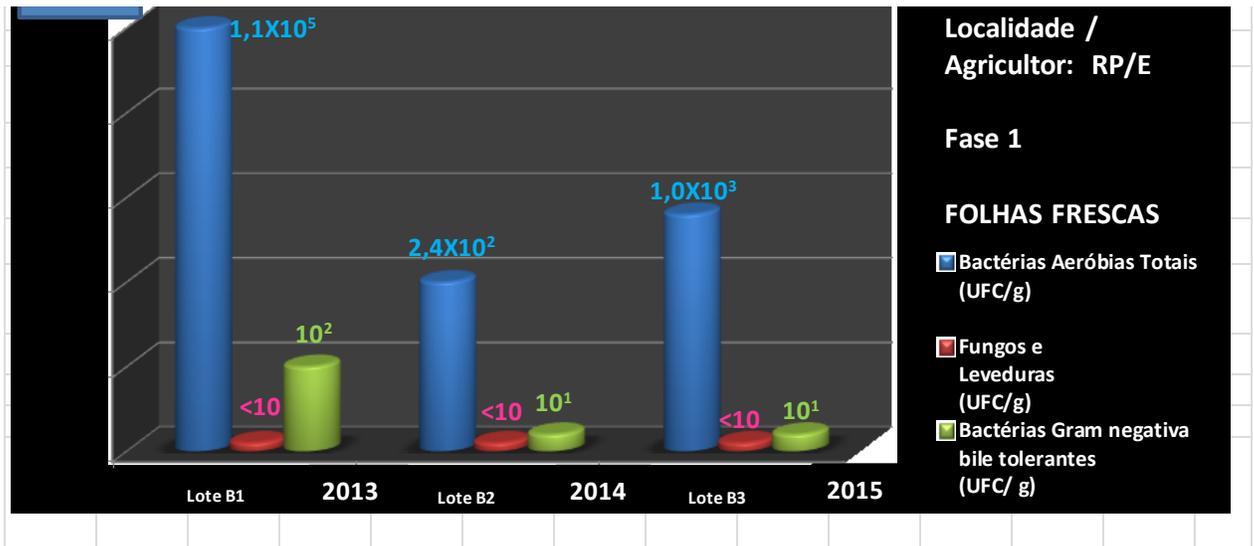
Em 2015 observou-se que todos os extratos estavam dentro dos padrões, portanto os resultados foram satisfatórios.

Gráfico 12. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de sabonete de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor M de Vargem Grande (VG), RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



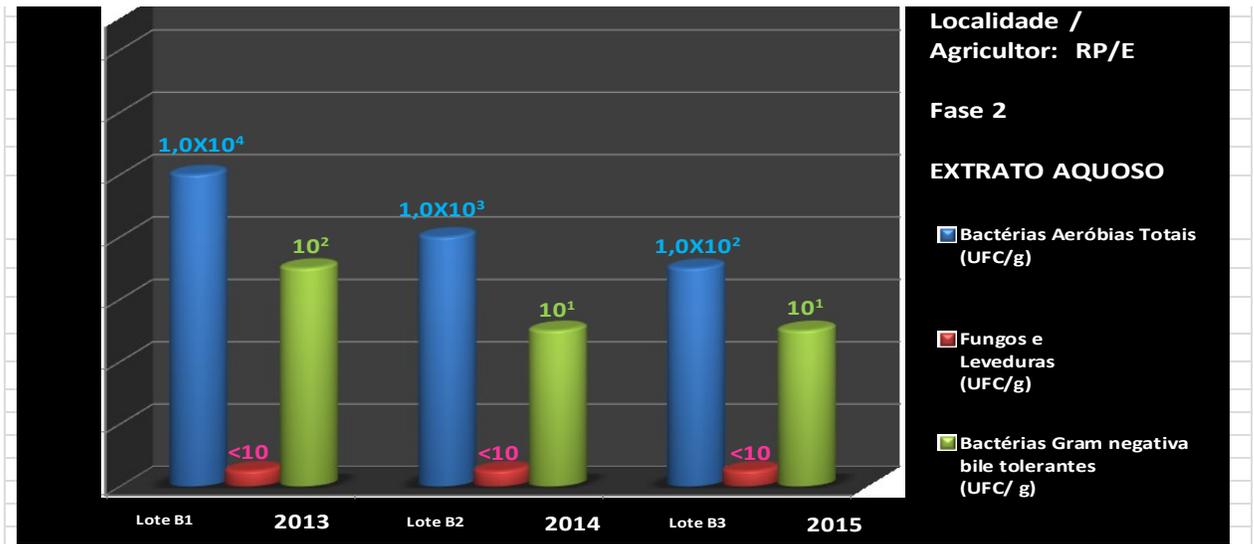
No Gráfico 12 os resultados do produto final (sabonete) no período de 2013 encontravam-se fora do preconizado. Após reunião para apresentar os resultados, em 2014 foi observado uma melhora. Em 2015 o produto final encontrou-se próprio para o uso com as amostras dentro do estabelecido pela OMS e Farmacopéia Brasileira (WHO, 2011; ANVISA, 2010).

Gráfico 13. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor E de Rio da Prata (RP), RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



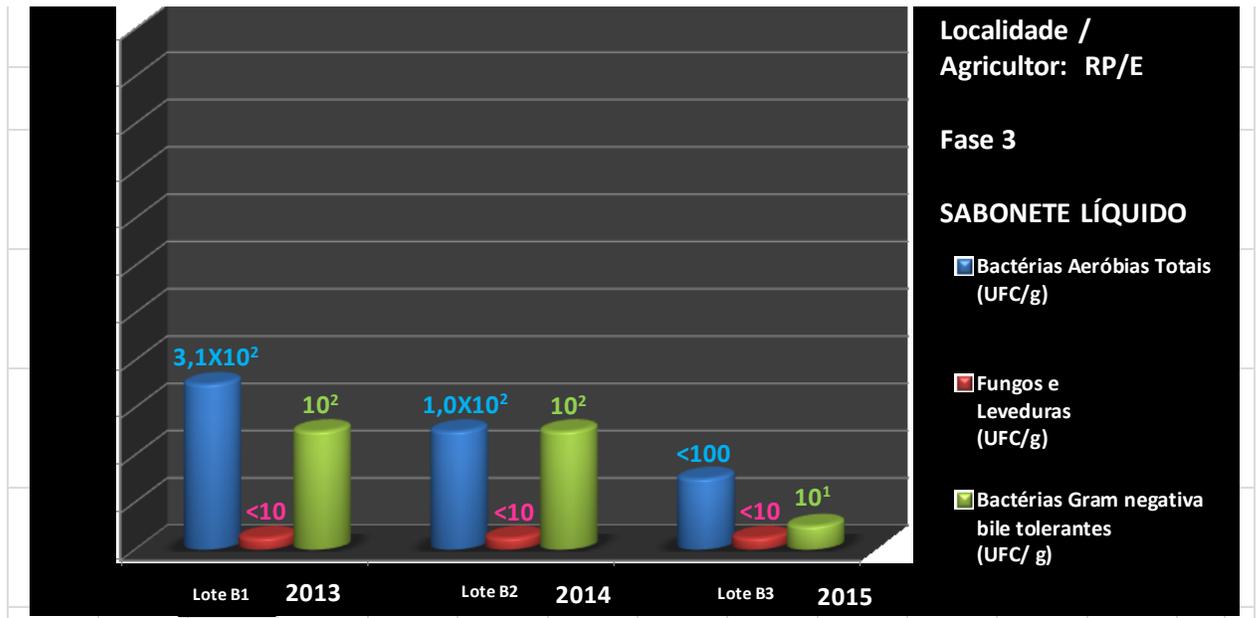
Os resultados apresentados pelo agricultor E de RP (Gráfico 13) nos anos 2013, 2014 e 2015 para as folhas frescas de *Schinus terebinthifolius*, demonstram que as amostras nos três anos estavam satisfatórias consequentemente cumprindo com os parâmetros da OMS e Farmacopeia Brasileira.

Gráfico 14. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor E de Rio da Prata nos anos de 2013, 2014 e 2015.



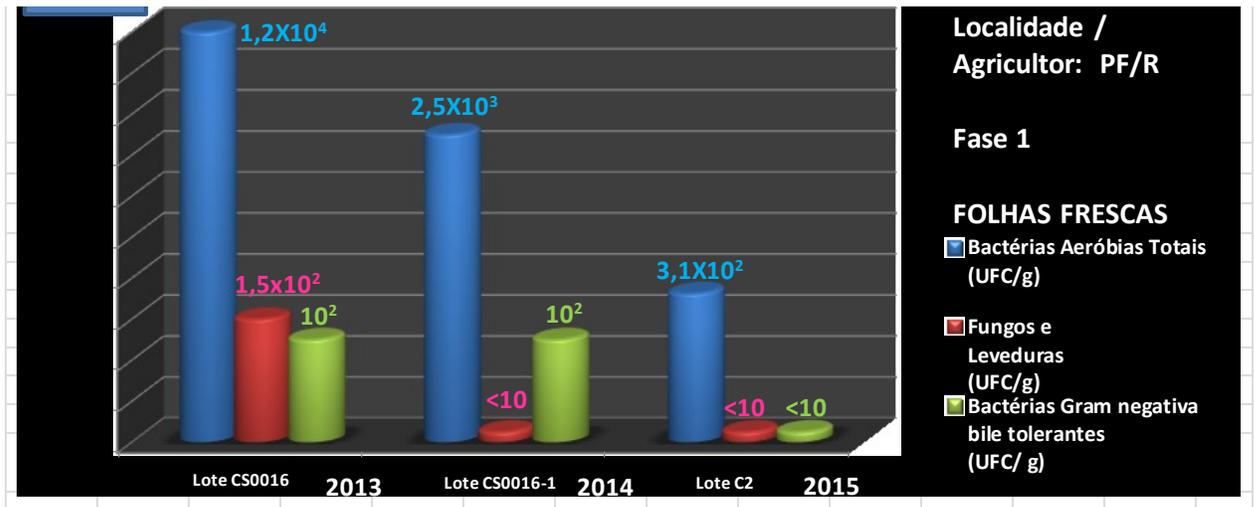
Os resultados apresentados pelo agricultor E de rio da Prata (Gráfico 14) nos anos 2013, 2014 e 2015 em relação ao extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* mostraram que as amostras nos três anos estavam satisfatórias, nas contagens e ausência de patógenos cumprindo assim, com os parâmetros da OMS e Farmacopéia Brasileira.

Gráfico 15 - Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de sabonete de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor E de rio da Prata (RP), RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



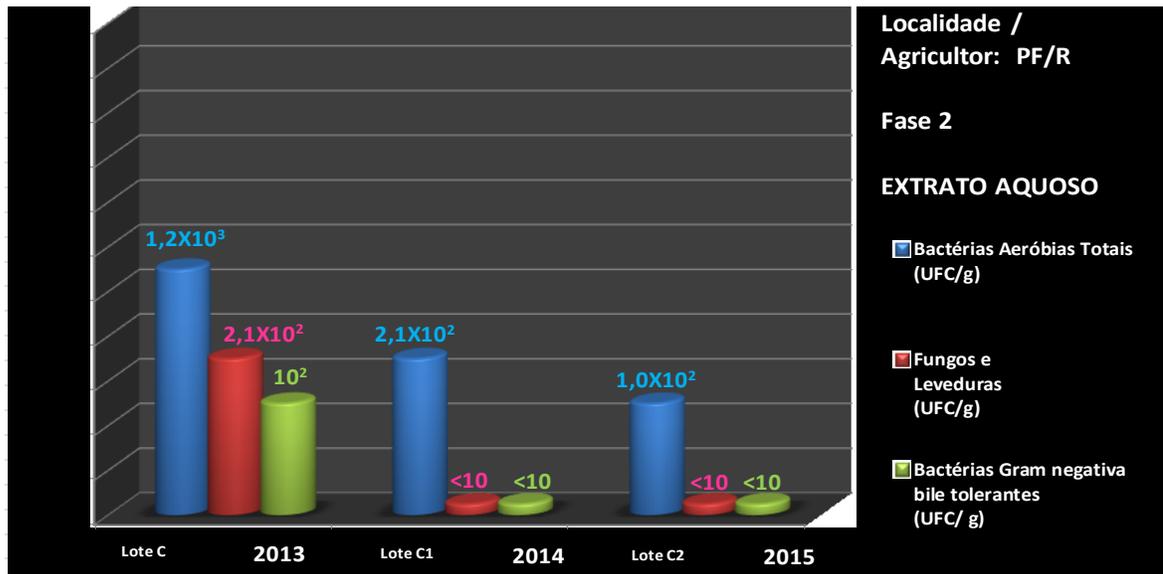
Os resultados do agricultor E de rio da Prata (Gráfico 15) nos três anos consecutivos mostraram que as amostras de sabonete líquido de *Schinus terebinthifolius* estão satisfatórias, nas contagens de microrganismos com ausência de patógenos cumprindo com o estabelecido pela OMS e Farmacopeia Brasileira, desde a matéria prima até o produto final.

Gráfico 16. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* obtidas de agricultor R de Pau da Fome, RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



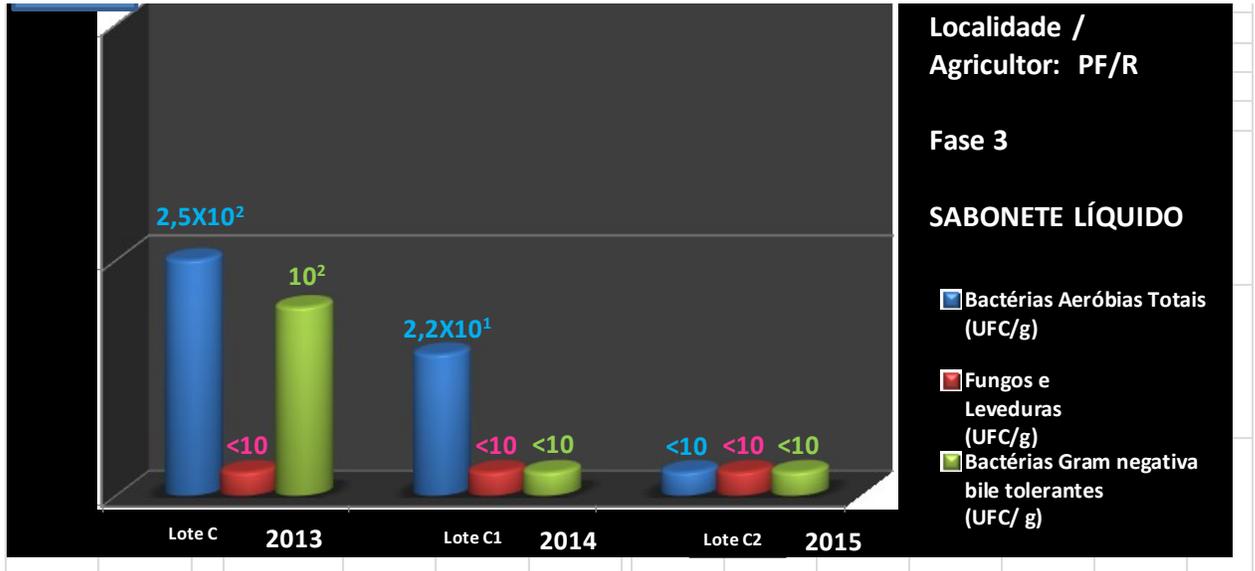
Observou-se no Gráfico 16 que as amostras de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor encontram-se dentro dos padrões de qualidade microbiológica preconizados pela OMS e Farmacopéia Brasileira, por terem sido satisfatórias nas contagens de microrganismos e ausência de patógenos, como demonstrado na Tabela 8.

Gráfico 17. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor R de Pau da Fome (PF), RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



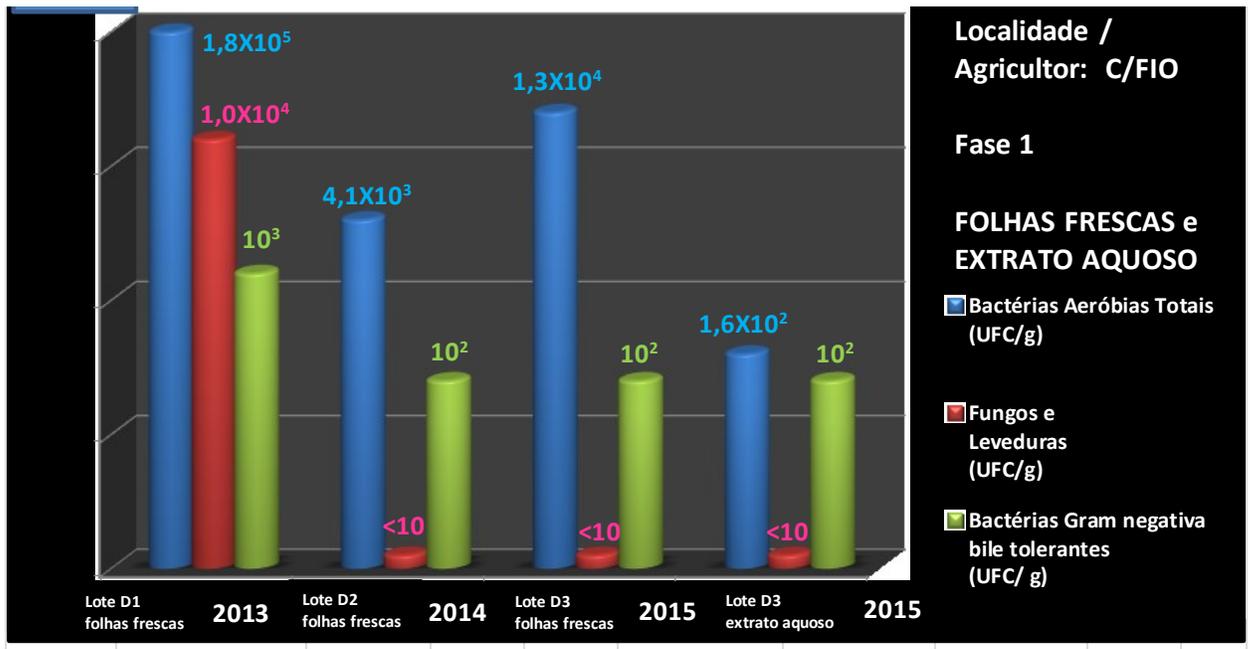
Os resultados apresentados no Gráfico 17 mostram que o extrato aquoso *Schinus terebinthifolius* encontram-se dentro dos padrões da OMS e Farmacopéia Brasileira, com todas as amostras satisfatórias nas contagens de microrganismos e ausência de patógenos.

Gráfico 18. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de sabonete de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor R de Pau da Fome, RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



Observa-se no Gráfico 18 que o produto sabonete líquido encontra-se dentro dos padrões da OMS e Far.Brasileira com todas as amostras satisfatórias nas contagens e ausência de patógenos. Portanto, satisfatório desde a matéria prima até o produto final.

Gráfico 19. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras das amostras de folhas frescas e extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor FIO de Curicica, RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



No Gráfico 19 observou-se que:

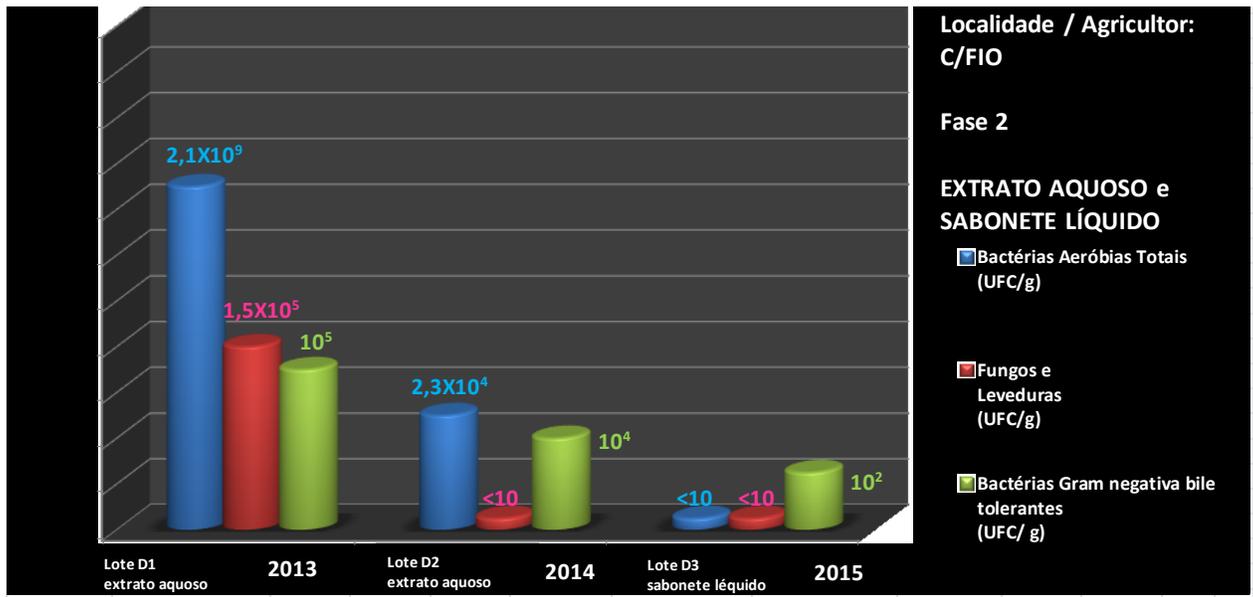
- O lote **D₁ folhas frescas 2013** - as contagens estão dentro dos padrões, porém com presença de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus megaterium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Pantoeae aglomerans* e *Cronobacter sakazakii*.

O lote **D₂ folhas frescas 2014** - observou-se melhora nas contagens e ausência de patógenos, portanto, cumprindo com o estabelecido pela OMS e Farm. Brasileira.

O lote **D₃ folhas frescas 2015** - mostra as contagens dentro dos padrões e ausência de patógenos, cumprindo com o estabelecido pela OMS e Farm. Brasileira.

O lote **D₃ extrato aquoso/2015** - também encontra-se dentro do permitido pela OMS e Farmacopéia Brasileira.

Gráfico 20. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de extrato aquoso e sabonete de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor FIO de Curicica, RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



Observou-se no Gráfico 20:

- O lote **D₁ extrato aquoso/2013** - o número elevado nas contagens e presença de patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pantoeae agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Brevundimonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens* e *Sphingomonas paucimobilis*. (Tabela 4 e Tabela 8), comprometeram o produto final.

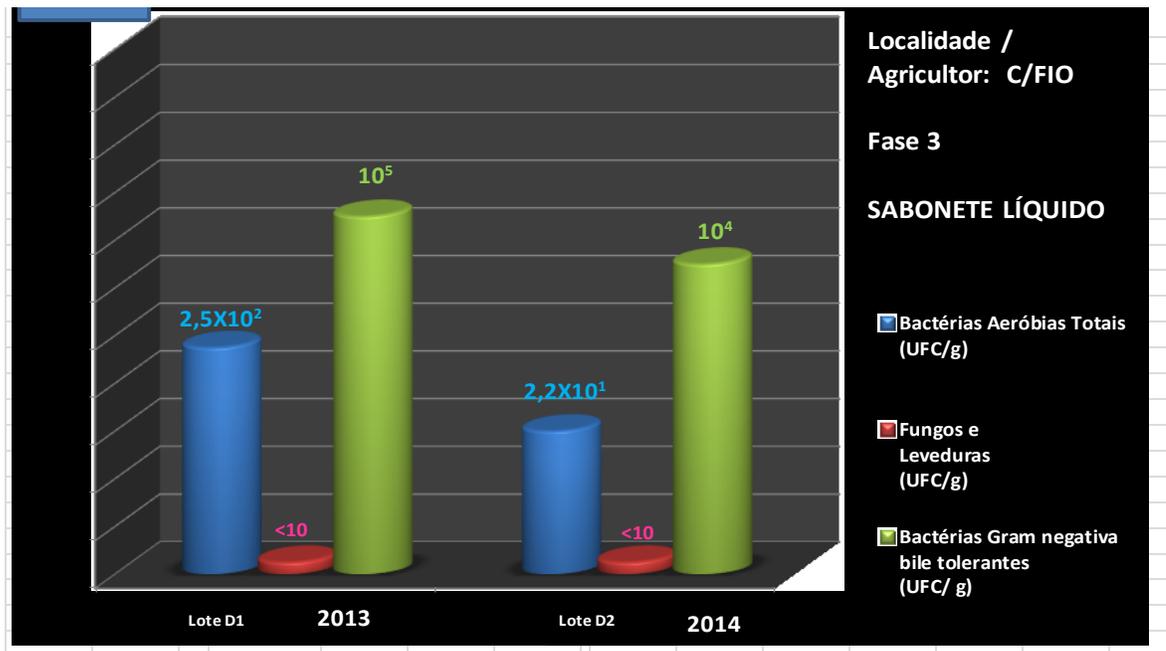
Foi recomendado o monitoramento das boas práticas no pré e pós cultivo, análise da água utilizada para produção do extrato e a verificação do destilador (provavelmente fontes de contaminação), devido a presença de micro-organismos indicadores de água contaminada.

- No lote **D₂ extrato aquoso/2014** - verificou-se a redução acentuada do número de bactérias, bolores e leveduras, mas ainda ocorreu presença de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Sphingomonas paucimobilis*.

- O lote **D₃ extrato aquoso/2015** - No Gráfico 19, encontra-se dentro do permitido pela OMS e Farmacopéia Brasileira.

- O lote **D₃ sabonete líquido/2015** – observou-se que o monitoramento da água e a troca do destilador foram importantes, pois os resultados melhoraram em todas as fases, colocando o produto em conformidade com os padrões estabelecidos pela OMS e Farmacopéia Brasileira. O que demonstrou que é possível melhorar o produto desde a matéria prima até o produto final (sabonete) adotando em todas as fases as boas práticas de cultivo e produção.

Gráfico 21. Resultados das contagens de bactérias aeróbias, de bactérias Gram negativas bile tolerantes, bolores e leveduras nas amostras de sabonete de *Schinus terebinthifolius* obtidas do agricultor FIO de Curicica, RJ nos anos de 2013, 2014 e 2015.



Observa-se no Gráfico 21 um contagem de bactérias aeróbias e bile tolerantes, no produto final (sabonete líquido) em 2013 e 2014, com presença de *Bacillus megaterium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Pantoeae agglomerans*, *Cronobacter sakazaki*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens* e *Sphingomonas paucimobilis*.

A Tabela 8 mostra os micro-organismos identificados de cada amostra de *Schinus terebinthifolius*.

Tabela 8. Micro-organismos identificados de cada amostras de *Schinus terebinthifolius* obtidos de 4 agricultores de 4 localidades, Vargem Grande (VG), Rio da Prata (RP), Pau da Fome (PF) e Curicica (C), nos anos de 2012 a 2015.

Fases	Micro-organismos
VG/M 003DS/2013 1.folhas frescas	A1- <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>
VG/M 2.extrato aquoso	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pantoeae agglomerans</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Sphingomonas paucimobilis</i>
VG/M 3. sabonete líquido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Escherichia coli</i>
VG/M DS/2014 1.folhas frescas	A2-003 <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pantoeae agglomerans</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
VG/M 2.extrato aquoso	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> ,
VG/M 3. sabonete líquido	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VG/M/ A₃/2015 1.folhas frescas	<i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> e <i>Bacillus subtilis</i>

VG/M 2. extrato aquoso	<i>Bacillus circulans, Bacillus cereus e Bacillus brevis</i>
VG/M 3. sabonete líquido	<i>Bacillus circulans e Bacillus brevis</i>
RP/E/2012 1.folhas frescas	<i>Bacillus subtilis, Pantoea agglomerans e Hafnia alvei</i>
2. extrato aquoso	<i>Bacillus subtilis,</i>
3. sabonete líquido	<i>Bacillus subtilis e Bacillus cereus</i>
RP/E/2013 1. folhas frescas	<i>Hafnia alvei e Bacillus circulans</i>
2. extrato aquoso	<i>Bacillus circulans</i>
3. sabonete líquido	<i>Bacillus circulans</i>
RP/E/2014 1. folhas frescas	<i>Bacillus circulans e Bacillus cereus</i>
2. extrato aquoso	<i>Bacillus circulans</i>
3. sabonete líquido	<i>Bacillus circulans</i>
RP/E/2015 1.folhas frescas	<i>Bacillus subtilis e Pantoea agglomerans</i>
2. extrato aquoso	<i>Bacillus cereus</i>
3. sabonete líquido	<i>Bacillus cereus</i>
PF/R/C/ 2013 1.folhas frescas	<i>Bacillus subtilis, Bacillus cereus e Hafnia alvei</i>
PF/R/C/2013 2.extrato aquoso	<i>Bacillus pumilus</i>
PF/R/2013 3. sabonete líquido	<i>Bacillus pumilus e Hafnia alvei</i>
PF/R/C/2014 1. folhas frescas	<i>Hafnia alvei e Bacillus circulans</i>
2. extrato aquoso	<i>Bacillus pumilus e Bacillus cereus</i>

3. sabonete líquido	<i>Bacillus pumilus</i>
PF/R/C/2015	<i>Bacillus subtilis, Bacillus cereus e Hafnia alvei</i>
1. folhas frescas	
2. extrato aquoso	<i>Bacillus subtilis, Bacillus cereus</i>
3. sabonete líquido	<i>Bacillus subtilis</i>
C/FIO/D₁/2013	<i>Bacillus megaterium, Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus,</i>
1.folhas frescas	<i>Pantoeae agglomerans, Cronobacter sakazaki e , Staphylococcus aureus</i>
2. extrato aquoso	<i>Bacillus megaterium, Pseudomonas stutzeri, Escherichia coli, Pantoeae agglomerans, Enterobactercloacae, Cronobacter sakazakii, Pseudomonas aeruginosa, Brevundimonas diminuta, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Sphingomonas paucimobilis</i>
3. sabonete líquido	<i>Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas aeruginosa, Brevundimonas diminuta, e Pseudomonas fluorescens</i>
C/FIO/D₁/2014	<i>Bacillus subtilis , Pantoea agglomerans, e Aspergillus parasiticus</i>
1.folhas frescas	
2. extrato aquoso	<i>Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens e Sphingomonas paucimobilis</i>
3. sabonete líquido	<i>Bacillus cereus e Staphylococcus aureus</i>
C/FIO/D₁/2015	<i>Bacillus cereus</i>
1.folhas frescas	
2. extrato aquoso	<i>Bacillus cereus</i>
3. sabonete líquido	<i>Bacillus cereus</i>

A escassez de referências, que monitorem microbiologicamente todas as fases do processo produtivo de fitoterápicos, não permitiu a comparação dos resultados obtidos neste estudo, que avalia desde a obtenção da matéria prima, as fases de manipulação e o produto final. A literatura é rica em apresentar estudos de contaminação microbiológica na matéria prima e no produto final, não justificando a origem do elevado nível de contaminação do

produto final (fitoterápicos). Vários trabalhos como exemplo: "Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos" (FARIA, 2012), observa-se a presença de micro-organismos no produto final (fitoterápicos). *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter planticola*, *Cedecea davisae*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, *Cronobacter sazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *Aspergillus Parasiticus*, outro estudo realizado na Arábia Saudita, a contaminação por *Bacillus cereus* foi extremamente significativa atingindo um percentual de 45% das amostras (ALWAKEEL, 2008). O *Bacillus cereus* estava presente em oito das amostras pesquisadas neste estudo. E em estudo avaliando a utilização de suplemento nutricional a bases de ervas contaminado por *Bacillus subtilis* estabeleceu-se uma relação com consumo e toxicidade em células hepáticas HepG2 (STICKEL, et. al.; 2009). A revisão da literatura identificou a presença de aflatoxinas em fitoterápicos em estudos realizados na Malásia e Tailândia. A aflatoxina pode ser produzida por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e sua presença no organismo humano pode ter efeito carcinogênico, teratogênico e mutagênico (ALI, et al; 2005, Tassaneeyaku et al; 2004), todos no produto final. Também em amostras de fitoterápicos analisadas no INCQS sob intervenção da vigilância sanitária, (análise fiscal), em torno de 95% estavam em desacordo com o estabelecido pela Farmacopeias, devido ao elevado nível de contaminação e presença de patógenos.

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

Nessa tese foram encontrados todos estes micro-organismos além de *Shigella sonnei* e *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus paraticus* dentre outros, em todas as fases do processo produtivo do sabonete líquido proveniente de *S. terebintipholius* e o pó da *Cúrcuma longa*.

Por isso esta tese se pautou na avaliação da origem da contaminação que ocorre desde a manipulação até o produto final (fitoterápico) em todas as fases, para determinar pontos críticos de possível origem da contaminação microbiológica e com isso melhorar a qualidade do produto.

Afim de diminuir e eliminar riscos à saúde, numa abordagem interdisciplinar para prevenir, garantir e proteger à população num acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos, fortalecendo os programas de fitoterapia com abastecimento de matérias primas de qualidade oriundas de agricultores capacitados, potencializando as opções terapêuticas da rede SUS.

5.4 Micro-organismos patogênicos encontrados neste estudo

A determinação do número total de bactérias aeróbias – contagem do número total de bactérias em produtos e matérias-primas não estéreis, é aplicado para se determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas farmacopeicas.

As bactérias Gram-negativas bile tolerantes compõem uma família das mais importantes conhecidas pelo homem, constituída por um grande grupo de bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas (com algumas exceções), nas quais estão incluídos importantes patógenos causadores de doenças de origem alimentar, como *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica* e bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*. A presença destas bactérias indica um potencial problema ou falha no processo (VERSALOVIC, 2011).

Espécies de *Salmonella* – bastonete Gram-negativo, flagelado, anaeróbio facultativo e intracelular, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. As bactérias desta espécie são tipicamente adquiridas por via oral, sendo geralmente isoladas de vegetais e frutas frescas . A manifestação clínica da infecção por salmonela (salmonelose) pode ser dividida em quatro doenças padrões: febre tifoide, gastroenterite, bacteremia e outras complicações de salmoneloses não tifoides. Além disso, o indivíduo infectado também pode se tornar um portador crônico, carregando o micro-organismo de forma assintomática, mas sendo uma fonte de transmissão (VERSALOVIC, 2011).

Escherichia coli – bastonete Gram-negativo, flagelado e anaeróbio facultativo, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É uma bactéria comensal que pode ser encontrada na

microbiota intestinal de uma variedade de animais, incluindo o homem. Entretanto, nem todas as cepas são inofensivas, sendo as patogênicas capazes de causar doenças debilitantes em tecidos intestinais e extra intestinais, como gastroenterite, intoxicação alimentar, infecções nos tratos urinários e respiratórios, às vezes podendo levar ao óbito . A *E. coli* faz parte da microbiota intestinal de vários animais, liberada nas fezes, sua presença usada como indicador de contaminação fecal (VERSALOVIC, 2011).

Staphylococcus aureus – coco Gram-positivo, imóvel e anaeróbio facultativo. Suas células são agrupadas em massas irregulares ou como cachos de uvas devido a sua divisão celular ocorrer em mais de um plano. É um micro-organismo versátil e oportunista, capaz de persistir e se multiplicar em uma variedade de ambientes e causar uma ampla variedade de doenças em humanos e animais. Comumente encontrado como comensal associado à pele, glândulas e membranas mucosas, principalmente nas mucosas nasais, o *S. aureus* é um dos principais responsáveis por infecções hospitalares e comunitárias, causando doenças superficiais e invasivas, muitas vezes apresentando consequências severas e podendo levar ao óbito. As infecções podem ocorrer em locais como pele, tecidos moles, trato respiratório inferior e sangue, levando à patologias como dermatites, mastite, abscessos, pneumonias, osteomielite, endocardite e bacteremia (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

Espécies de *Shigella* – bastonete Gram-negativo, imóvel e anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. O homem é seu único hospedeiro natural e a forma de transmissão predominante é pela rota oro-fecal. Esta bactéria causa doenças pela infecção do intestino e produção de toxinas, como diarreia aquosa, disenteria e inflamação do intestino. A infecção por *Shigella* também pode levar à complicações agudas e com risco de morte, como a síndrome metabólica, complicações intestinais (megacólon tóxico, prolapso retal, perfuração intestinal) e sepse (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

Citrobacter freundii, esta bactéria pode ser isolada de análises clínicas como agente patogênico - causadores de doença, podendo ser encontradas nas fezes dos humanos e animais (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

Enterobacter é uma bactéria patogênica causadora de infecções oportunistas, incluindo bacteremia, infecções respiratórias, de pele e tecidos moles, infecções do trato urinário, endocardite, infecções intra-abdominais, artrite séptica, osteomielite e infecções oculares.

Algumas cepas podem se tornar muito resistentes a tratamento como resultado da sua presença em ambientes hospitalares (JORGENSEN; PFALLER, 2015).

Pseudomonas aeruginosa – bastonete Gram-negativo, flagelado e aeróbio. É um micro-organismo versátil e encontrado em diferentes ambientes, incluindo solo, água, animais e plantas. É considerado mais um patógeno secundário ou oportunista do que causador de infecções primárias em pacientes saudáveis, apesar disso, é um micro-organismo de importância clínica, visto que é um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares em pacientes debilitados ou imunodeficientes. A maior parte das cepas de *P. aeruginosa* envolvidas em infecções são de bactérias invasivas e produtoras de toxinas que podem causar doenças como pneumonia, queimaduras, feridas, infecções intestinais e urinárias, otite e ceratite (VERSALOVIC, 2011).

Candida albicans – Fungo presente na microbiota intestinal e genitourinária em 70% dos humanos. É um patógeno oportunista, causando normalmente infecções brandas ou assintomáticas em indivíduos saudáveis e infecções mais severas em indivíduos com sistema imunológico debilitado. Os exemplos mais comuns de infecção por *C. albicans* são a candidíase orofaríngea e a candidíase vulvovaginal. Adicionalmente às infecções em mucosas, o micro-organismo pode causar infecções sistêmicas e invasivas, que são infecções potencialmente letais, onde o fungo atravessa a barreira epitelial e atinge a corrente sanguínea (candidemia), podendo infectar quase todos os órgãos (VERSALOVIC, 2011).

Aspergillus flavus; *Aspergillus parasiticus* - esses fungos tem a capacidade de atacar unhas, olhos, cabelo e especialmente a pele, os quais são denominados de dermatófitos e queratinófitos, onde sua ação resulta em infecções na região como pé-de-atleta e dermatofitose e produzem micotoxinas. Seus esporos causam enfermidades alérgicas (VERSALOVIC, 2011).

Bacillus cereus anaeróbio facultativo, formador de esporos, produção de enterotoxina, uma das quais resistente ao calor e pH entre 2 e 11. Via oral – síndrome emética (vômitos) e diarreias causadas pelas toxinas hemolisina BL e Hbl e enterotoxinas não hemolíticas Nhe e citotoxina K CYtK. Via tópica - infecções crônicas da pele e ceratite (VERSALOVIC, 2011).

Stenotrophomonas maltophilia – patógeno emergente que apresenta resistência à maioria dos antimicrobianos, associações: bacteremia, septicemia, sinusite, endocardite, pneumonia, meningite, infecção ocular, mastoidite, infecções de feridas cirúrgicas, bursite, ectima gangrenosa e abscesso hepático (VERSALOVIC, 2011).

Burkholderia cepacia – muito atrativa na biorremediação de solos e águas contaminadas, dada a capacidade de algumas estirpes de metabolizarem vários herbicidas como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos(PAHs),ftalato,tricloroetileno,entre outros (VERSALOVIC, 2011).

Enterobacter cloacae é facultativamente anaeróbia sua morfologia é em forma de bastonete, Encontra-se amplamente distribuída em água, esgotos, solo, carne, ambientes hospitalares; na pele e trato intestinal do homem e outros animais comporta-se como comensal. Está associada a infecções do trato urinário, infecções do trato respiratório, sepse e bacteremia (JORGENSEN; PFALLER, 2015). Esta espécie de bactéria gram-negativa foi identificada em 9 amostras dos fitoterápicos.

Enterobacter gergoviae esta enterobacteria possui respiração aeróbica e é um micro-organismo móvel geralmente isolada em hospitais e associadas a infecções do trato urinário. No Brasil esta bactéria foi pesquisada e isolada em baratas provenientes de hospitais. Estudos comprovaram sua associação a surtos hospitalares (PRADO; et al, 2002).

Cronobacter sakazakii como as demais enterobacterias está presente em plantas, solo e intestinos de animais e humanos. Sua morbidade está relacionada a doenças do trato respiratório, fluido cérebro espinhal (MURRAY; et al, 2007).

Hafnia alvei é um bacilo gram negativo, relacionado com diarreia em humanos, porém seu mecanismo de virulência não se encontra bem definido. (MURRAY, et al, 2007; MURRAY, et al, 2007).

Klebsiella – leucocitose, trombocitopenia, coagulação intravascular desseminada(CID), que pode originar choque por hemorragias generalizadas, e eventual morte (VERSALOVIC, 2011).

Enterobacter sp., Serratia marcescens –trato intestinal de roedores e insetos,provocando onfalite. Onfalite consiste em infecção da cicatriz umbilical. A cicatriz umbilical é uma ferida adquirida, universal e singular, e oferece um bom ambiente para proliferação bacteriana.

Pseudomonas stutzeri -septicemia, osteomielite e artrite, endocardite, meningite, pneumonia e/ou empiema, ectima gangrenosa, ventriculite (VERSALOVIC, 2011).

6- CONCLUSÃO

As plantas naturalmente possuem um grande número de bactérias e fungos com predominância das bactérias formadoras de esporos, muitas vezes originários do solo ou derivados de estrume, no entanto a contaminação microbiana pode ocorrer também através da manipulação por pessoal infectado durante as fases de fabricação de um produto fitoterápico. O não cumprimento das BPF's no cultivo e produção podem causar contaminação adicional. Este estudo demonstrou que é possível melhorar a qualidade do produto através do constante monitoramento em todas as fases..

Após a descoberta de pontos críticos, reuniões e estabelecimento e cumprimento das boas práticas no cultivo e em todas as fases do processo, os resultados demonstraram que houve melhoria da qualidade dos produtos, segundo os limites microbiológicos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde e Farmacopéia Brasileira.

A inclusão da avaliação microbiológica, em todas as fases do processo é extremamente relevante, uma vez que pode garantir a diminuição da contaminação microbiológica no produto final. A eficácia do monitoramento é observada pelos resultados que demonstram que os produtos alcançaram a qualidade microbiológica preconizada pela OMS e Farmacopeia Brasileira.

Conclui-se que há a necessidade de uma visão mais abrangente no âmbito da Vigilância Sanitária com relação a qualidade das Plantas Medicinais e Fitoterápicos, principalmente os utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), subsidiando intervenções sobre os riscos sanitários e certificação de matérias primas, garantindo assim a qualidade desde a matéria prima até o produto final.

REFERÊNCIAS

1. ALVES, NDC. *et al.* Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinas do estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro p 745 – 753, suplemento 13, 2008.
2. Alwaeel SS. Microbial and heavy metals contamination of herbal medicines. **Res J Microbiol.** 2008;3(12):683-91.
3. AMARAL, FMM. do *et al* Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, n. supl., p. 27-30, 2003.
4. ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasília,2010.< Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf>.
5. BENNISH ML. Potentially lethal complications of shigellosis. **Rev Infect Dis.** 1991 Mar-Apr;13 Suppl 4:S319–24.
6. BORGGO, J *et al.* Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.1, p.12-17. 2010.
7. BRAGHINI, *et al.* Avaliação da qualidade de plantas medicinais comercializadas na cidade de Maringá – PR. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 2015
8. BRANDÃO MGL *et al.* Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais.Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 3, n 14, p. 613-616, 1998.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em dezembro de 2015.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 de abril de 2010a.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de

- Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 de abril de 2010b.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. p.152 (SUS). I. Título. II. Série. CDU 005.21.51. **Premio Nacional de Incentivo à Promoção do Uso Racional de Medicamentos 2009a**.
 13. BRASIL.Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 47, de 8 de setembro de 2009. Estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo,, Brasília, DF, 9 de setembro de 2009b.
 14. BRASIL. Comissão Interministerial nº 2.960 de 09 de dezembro de 2008b. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 10 de dezembro de 2008a.
 15. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 96, 17 de dezembro de 2008. Dispõe sobre a propaganda, publicidade, informação e outras práticas cujo objetivo seja a divulgação ou promoção comercial de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de dezembro de 2008b.
 16. BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília: 23 junho de 2006.
 17. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 138, de 09 de maio de 2003 (Republicada em 2004). Dispõe sobre o enquadramento na categoria de venda de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 06 de janeiro de 2004a
 18. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 18 de março de 2004b
 19. BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 338 de 06 de maio de 2004c: aprova a Política Nacional de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, n.º 96, Brasília: 20.05.04c, Seção 1, p. 52/53.
 20. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003a.
 21. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 333, de 19 de novembro de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de novembro de 2003b.
 22. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 210, de 4 de agosto 2003. Dispõe sobre rotulagem de medicamentos e outras

- providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de agosto 2003c.
23. BRASIL, **Lei nº 8.078 - de 11 de setembro de 1990**. Dispõe sobre a proteção do consumidor, e dá outras providências. TÍTULO I *Dos Direitos do Consumidor* Legislação correlata (atualizada até 31 de maio de 2010c): <http://www.codigodefesaconsumidor.com>.
 24. BRASIL. Lei nº. 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília: 27 janeiro de 1999a.
 25. BRASIL. Lei Federal 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília: 19 de setembro de 1990a.
 26. BRASIL. Resolução-RDC/ANVISA n.º 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 06 de outubro de 1999b
 27. BRASIL. Lei Federal 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos, e dá outras Providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília: 17 de dezembro de 1973.
 28. BROADHURST, CL. Balanced intakes of natural triglycerides for optimum nutrition: an evolutionary and phytochemical perspective. **Med Hypoth**;49:247-261,1997.
 29. BUGNO, A *et al.* Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 41, n. 4, p. 491-497, 2005.
 30. CARVALHO, ACB *et al.* Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T & C Amazônia**, Ano V, n. 1, p. 26-32, 2007
 31. CHUANG SE, *et al.* Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. **Fd Chem Toxicol**. 2000 38: 991-995.
 32. CONTAGEM de Viáveis Totais em Produtos Farmacêuticos e Matérias-primas de Uso em sua Fabricação. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. (65.3210.010).
 33. CORRÊA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. **Boas práticas agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Curitiba: EMATER, 2013. 52 p. il. color. (Série Informação Técnica, 88).
 34. COSTA, EA. **Políticas de Vigilância Sanitária: Balanços e Perspectivas**. I Conferência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001
 35. Enayatifard R, Asgaritad H, Kezemi-Sanib. Microbial quality of some herbal solid dosage forms. **African J Biotechnol**. 2008;9:1701-5
 36. FARIA *et al.* Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 2012, vol.71, n.3, pp. 549-556. ISSN 0073-9855.
 37. FARIAS, MR *et al.* O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de farmácia**, Rio Grande do Sul. v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.
 38. FENG, P.; *et al.* Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: **Bacteriological analytical manual Online**, Charper 4. [S.l.]; FDA, 2002.
 39. FERREIRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. 1 ed. São Paulo. Ateneu, 2006.

40. FREITAS, A. Estrutura de Mercado do seguimento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. **Ministério da Saúde**. Brasília, 15 p, 2007.
41. FISCHER, DCH. **Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida**. São Paulo: USP, 1992, p.161 Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Professor Takako Saito. São Paulo.
42. FURNANETO, L *et al.* Qualidade Microbiológica de Drogas Vegetais Comercializadas nas Ruas da Cidade de Londrina/PR e de seus Infusos. **Saúde em Revista**, Piracicaba, v. 5, n. 10, p.49-52, 2003.
43. GUERRA, AMNdeM *et al.* Medicamentos provenientes de farmácias fitoterapêuticas usados em municípios da região oeste do estado do Rio Grande do Norte. **Revista verde**, Mossoró, v. 2, n. 2, p. 150-157, 2007.
44. HEINZMANN, BM *et al.* Potencial Das Plantas Nativas Brasileiras Para O Desenvolvimento De Fitomedicamentos Tendo Como Exemplo Lippia Alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde**. Santa Maria, v. 33, n. 1, p43-48, 2007.
45. ICMAP/ISHS/SAIPA: Buenos Aires. O 032. [II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, Mendoza (Argentina), 10-15 nov. 1997.
46. JORGENSEN, JH.; PFALLER, MA. (Ed.), **Manual of clinical microbiology**. 11 ed. Washington D.C., American Society of Microbiology. 2015.
47. KAWAMORI, TI *et al.* Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res*. 1999 Feb 1;59(3):597-601.
48. KISO, Y *et al.* Antihepatotoxic principles of Curcuma longa rhizomes. **Planta Med**. 1983 Nov;49(3):185-7.
49. KLEIN, T *et al.* Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2009;30(3):241-248.
50. LENZI, M.; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis - SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 198-201, 2004.
51. LIM, CS *et al.* Candida and invasive candidiasis: back to basics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2012 Jan;31(1):21–31.
52. LUCENA, PLH *et al.* Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 46-51, 2006.
53. Kosolec I, Cvek J, Tomic S. Contamination of medicinal herbs and herbal products. **Arch Ind Hyg Toxicol**. 2009;60:485-501
54. MARTORELLI, SBF *et al.* **Extrato hidroalcoólico de Schinus terebinthifolius Raddi (aroeira) 30% em orabase**. *Int. J. Dent*. 10, 80-90, 2011.
55. MELO, JG de *et al.* Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta bot. bras.**São Paulo, v. 21 n. 1 p. 27-36, 2007.
56. MELO, JG de *et al.* Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.) **Revista Brasileira. Farmacognosia**. João Pessoa, v. 14, n.2, p.111-120, 2004.
57. MURRAY, PR *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 9th edition; Washington D.C.: American Society of Microbiology, 2256 p., 2007.

58. PAIXÃO, FG *et al.* Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Higiene Alimentar. São Paulo** v.18, p. 55-57, 2004.
59. PEREIRA, AS; STRINGHETA, PC. Considerações sobre a cultura e processamento do açafraão. **Hortic. Bras. [online]. 1998, vol.16, n.2, pp.102-105.**
60. PESQUISA de patógenos em produtos não estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação e água para diálise. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. (65.3210.008)
61. PINTO, AC *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, supl.1, p.45-61, 2002.
62. ROA, S.D *et al.* Effect of curcumin on serum and livercholesterol levels in the rat. **Journal of Nutrition** 100,1307–1316, 1970.
63. ROCHA, FAGda *et al.* Diagnóstico da qualidade sanitária de plantas medicinais comercializadas no município de currais novos, RN. **HOLOS**, Ribeirão Preto. v. 12, ano 26, 2010.
64. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**. 2010;81:462-71
65. SCHEFFER, M.C. **Experiencia de integración de industria y productores en laproducción y comercialización de plantas medicinales.** In: ICMAP/ISHS/SAIPA. Resúmenes. 1997
66. SELVAM R, *et al.* The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*) **J Ethnopharmacol.**;47:59–67, 1995.
67. SILVA, JdeS *et al.* **Secagem e secadores.** In: SILVA, Juarez de Souza (ed). Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. 2.ed. – Viçosa: Ed. Aprenda Fácil. Cap. 5. P. 109-146. 2008.
68. SOARES, DGdeS *et al.* Avaliação Clínica e Microbiológica do Tratamento da Estomatite Protética com Tintura de Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira). **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, vol. 10, núm. 3, pp. 365-370. 2010.
69. SRIMAL, RC. **Turmeric: a brief review of medicinal properties.** Fitoterapia LXVIII, 483-493. 1997.
70. STICKEL *et al.* Emotion Detection: Application of the Valence Arousal Space for Rapid Biological Usability Testing to Enhance Universal Access. In C. Stephanidis (ed.), Universal Access in Human-Computer Interaction. Addressing Diversity (Vol. 5614, pp. 615-24). New York, NY: Springer.
71. STONER, GD; MUKHTAR, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. **J Cell Biochem** 59: 169 –180, 1995.
72. Tassaneeyakul W, Razzazi-Fazeli E, SupatraPJ. Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. **Mycopathol.** 2004;158:239-44.
73. TOMAZZONI, MI *et al.* Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto contexto – enfermagem**. Florianópolis, v. 15, n. 1, 2006 .
74. TOBIAS, ML *et al.* Controle de Qualidade Microbiológica de Drogas Vegetais de Farmácias de Manipulação de Maringá. (Paraná – Brasil) **Revista Eletrônica de Farmácia**.v. IV, n. 1, p. 95-103, 2007.
75. VERIFICAÇÃO da Capacidade Inibitória de Produtos Não Estéreis do Departamento de Microbiologia. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ (65.3210.009).
76. VERSALOVIC, J *et al.* **Manual of clinical microbiology.** 10 ed. Washington D.C., American Society for Microbiology, 2011.

77. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.** Geneva, 2007. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s14878e/s14878e.pdf>> Acesso em: 28 agosto 2015.
78. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good manufacturing practices [GMP] for herbal medicines.** Geneva, 2007; 72 p.
79. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **For assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.** Geneva, 2011; 105 p.
80. YUNES, RA *et al.* Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova.** 2001, vol. 24, p. 147-152.
81. ZARONI, M *et al.* Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná **Revista Brasileira. Farmacognosia.** João Pessoa, v. 14, n. 1,p.29-39, 2004.

APÊNDICE A – MATERIAL, EQUIPAMENTOS, SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

1. Materiais e equipamentos:

Pipetas graduadas de 1,2, 5 e 10 mL
 Erlenmeyer de 250mL
 Placas de Petri
 Tubos de ensaio 16 x 150 mm ou similar
 Tubos de ensaio 18 x 180 mm ou similar
 Alça de inoculação
 Espátulas e pinças
 Capela de fluxo laminar
 Banho termostático
 Estufas bacteriológicas

2. Soluções e meios de cultura

2.1 - Solução tampão de cloreto de sódio-peptona, pH 7,0

Fosfato de potássio monobásico3,6 g
 Fosfato dissódico dihidratado7,2 g
 Cloreto de sódio..... 4,3 g
 Peptona (carne ou caseína)..... 1,0 g
 Água purificada1000 mL
 Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.2 - Tampão fosfato pH 7,2 – Solução estoque

Fosfato de potássio monobásico.....	34,0 g
Hidróxido de sódio 4% Adicionar aproximadamente	175 mL
Água purificada	1000 mL

Dissolver o fosfato de potássio monobásico em 500 mL de água, acertar o pH para $7,2 \pm 0,2$ com hidróxido de sódio 4%. Completar o volume com água, esterilizar e conservar sob refrigeração. Quando da utilização diluir a solução estoque com água na proporção de 1 para 800 (v/v) e esterilizar.

2.3 - Diluente Universal

Fosfato de potássio monobásico.....	3,6 g
Fosfato dissódico dihidratado.....	7,2 g
Cloreto de sódio	4,3 g
Peptona de carne ou de caseína.....	1,0 g
Lecitina de gema de ovo.....	3,0 g
L-histidina	1,0 g
Polissorbato 80.....	30,0 g
Água purificada	1000 mL

Pesar e dissolver os ingredientes na água destilada agitando constantemente. Aquecer se necessário. Ajustar o pH para $6,8 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.4 - Caldo neutralizante DEY-ENGLEY

Caseína enzimática hidrolisada.....	5,0 g
Púrpura bromocresol.....	20,0 mg
Extrato de Levedura	2,50 g
Tiosulfato de sódio.....	6,00 g
Tioglicolato de sódio	1,0 g
Bissulfito de sódio.....	2,50 g
Polissorbato 80	5,00 g

Dextrose.....	10,0 g
Lecitina.....	7,0 g
Água.....	1000 mL

Pesar e dissolver os ingredientes na água destilada agitando constantemente. Aquecer se necessário. Ajustar o pH para $7,6 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.5 – Agar ferro Kliger (KIA)

Peptona	15 g
Agar.....	15 g
Lactose	10 g
Peptona protéica	5 g
Cloreto de sódio	5 g
Extrato de levedura	3 g
Extrato de carne	3 g
Dextrose	1 g
Tiosulfato de sódio	0,30 g
Sulfato ferroso	0,20 g
Vermelho fenol	0,024 g

Esterilizar o meio em autoclave a 121°C durante 15 min. Com Ciclo Validado. Esfriar em posição inclinada.

2.6 Agar eosina azul de metileno (EMB)

Digestão péptica de tecido animal	10 g
Fosfato dipotássico	2 g
Lactose	10 g
Eosina – Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agar	15 g

pH $7,1 \pm 0,2$. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Arrefecer até $45 - 50^{\circ}\text{C}$ e misturar bem o meio, a fim de oxidar o azul de metileno (ou seja, restaurar a sua cor azul) e a suspensão do precipitado, o qual é uma parte essencial do meio.

2.7 Caldo caseína-soja

Peptona de caseína pancreática	17,0 g
Farinha de soja obtida por digestão papaínica	3,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico.....	2,5 g
Glicose monohidratada.....	2,5 g
Água purificada.....	1000 mL

pH $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.8 Agar caseína-soja

Peptona de caseína pancreática.....	15,0 g
Farinha de soja obtida por digestão papaínica	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Agar	15,0 g
Água purificada	1000 mL

pH $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.9 Ágar Violeta Vermelho Neutro Glicose

Extrato de levedura	3,0 g
Peptona de gelatina pancreática.....	7,0 g
Sais Biliares.....	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Glicose monohidratada.....	10,0 g
Agar	15,0 g
Vermelho neutro.....	30,0 mg

Cristal violeta.....	2,0 mg
Água purificada	1000 mL

pH $7,4 \pm 0,2$. Aquecer até ebulição. Não esterilizar em autoclave.

2.10 Caldo de Enriquecimento para Enterobactérias Mossel

Hidrolisado de pancreático de gelatina	10,0 g
Glicose monohidratada.....	5,0 g
Bile de boi desidratada	20,0 g
Fosfato de potássico monobásico.....	2,0 g
Fosfato dissódico dihidratado.....	8,0 g
Verde brilhante	15,0 mg
Água purificada	1000 mL

pH $7,2 \pm 0,2$. Aquecer a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Esfriar imediatamente.

2.11 Caldo MacConkey

Hidrolisado de pancreático de gelatina.....	20,0 g
Lactose monoidratada	10,0 g
Bile de boi desidratada.....	5,0 g
Púrpura de bromocresol	10,0 mg
Água purificada	1000 mL

pH $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.12 Ágar MacConkey

Hidrolisado de pancreático de gelatina.....	17,0 g
Peptona (carne ou caseína).....	3,0 g
Lactose monohidratada	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Bile de boi desidratada	1,5 g
Vermelho neutro	30,0 mg
Cristal violeta	1,0 mg
Agar	13,5 g

Água purificada1000 mL
 pH $7,1 \pm 0,2$. Ferver 1 minuto com constante agitação.
 Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.13 Ágar xilose, xisina, desoxicolato

Xilose3,5 g
 L-Lisina..... 5,0 g
 Lactose monohidratada5 g
 Sacarose..... 7,5 g
 Cloreto de sódio5,0 g
 Extrato de levedura..... 3,0 g
 Vermelho fenol..... 80,0 mg
 Agar 13,5 g
 Desoxicolato de sódio..... 2,5 g
 Citrato de amônio férrico.....0,8 g
 Tiosulfato de sódio..... 6,8 g
 Água purificada1000 mL
 Ajustar de forma que após aquecimento seja pH $7,4 \pm 0,2$.
 Aquecer até a ebulição.Não esterilizar em autoclave.

2.14 Caldo Enriquecimento Salmonella Rappaport Vassiliadis

Peptona de soja4,5 g
 Cloreto de magnésio hexahidratado..... 29,0 g
 Cloreto de sódio8,0 g
 Fosfato de potássio dibásico0,4 g
 Fosfato de potássio monobásico..... 0,6 g
 Verde malaquita36,0 mg
 Água purificada 1000 mL
 pH $5,2 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave em temperatura que não exceda a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.15 Ágar Cetrimide

Hidrolisado de pancreático de gelatina	20,0 g
Cloreto de magnésio	1,4 g
Sulfato de potássio	10,0 g
Cetrimida	0,3 g
Agar	13,6 g
Água purificada	1000 mL
Glicerol	10,0 mL

Ferver 1 minuto com constante agitação. Ajustar o pH de forma que seja $7,2 \pm 0,2$.

Esterilização em autoclave usando ciclo validado.

2.16 Agar Sal Manitol

Hidrolisado de pancreático de caseína	5,0 g
Peptona péptica de tecido animal	5,0 g
Extrato de carne	1,0 g
D-manitol	10,0 g
Cloreto de sódio	75,0 g
Agar	15,0 g
Vermelho fenol	25,0 mg
Água purificada	1000 mL

Ferver 1 minuto com constante agitação. Ajustar o pH de forma que seja $7,4 \pm 0,2$.

Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.17 Ágar Batata-dextrose

Infusão de batata	200,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Agar	15,0 g
Água purificada.....	1000 mL

Suspender 39 g em 1000 mL de água. pH $5,6 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado. Se pretende pH 3,5, adicionar aproximadamente 14 mL de solução estéril de ácido tartárico 10% (p/v) ao meio aquecido a 45-50 °C.

2.18 Ágar Sabouraud-dextrose 4%

Dextrose	40,0 g
Peptonas	10,0 g
Agar.....	15,0 g
Água purificada	1000 mL

pH $5,6 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.19 Caldo Sabouraud-dextrose

Dextrose	20,0 g
Peptonas	10,0 g
Água purificada	1000 mL

pH $5,6 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.20 Ágar Seletivo para Candida segundo Nickerson

Extrato de levedura	1,0 g
Peptona farinha de soja.....	2,0 g
Glicina	10,0 g
Glicose	10,0 g
Indicador bismuto-sulfito	2,0 g
Agar	15,0 g
Água purificada	1000 mL

Dissolver 40 g em 1000. mL de água. pH $6,5 \pm 0,2$. Esterilizar sob vapor fluente.

2.21 Meio Reforçado para Clostridium

Extrato de carne	10,0 g
Peptona	10,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Amido solúvel.....	1,0 g
Glicose monoidratado	5,0 g
Cloridrato de cisteína.....	0,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g

Acetato de sódio	3,0 g
Agar.....	0,5 g
Água purificada	1000 mL

Deixar intumescer o Agar e dissolver aquecendo à ebulição, agitando constantemente. Se necessário ajustar o pH de forma que seja $6,8 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

2.22 Ágar Columbia

Hidrolisado de pancreático de caseína	10,0 g
Peptona de carne digestão.....	5,0 g
Digesto pancreático de coração	3,0 g
Extrato de levedura.....	5,0 g
Amido de milho.....	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar, de acordo com o poder gelificante.....	10,0 - 15,0 g
Água purificada	1000 mL

Deixar intumescer o ágar e dissolver aquecendo até ebulição, agitando constantemente. Se necessário ajustar o pH de forma que seja $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado. Esfriar para 45 a 50 °C e adicionar, se necessário, sulfato de gentamicina correspondente a 20 mg de gentamicina base, verter em placas de Petri.

3. Soluções - reagentes:

3.1 Reagente de Kovacs:

P-Dimetilaminobenzaldeído	5 g
Álcool amílico (normal)	75 mL
Ácido clorídrico (concentrado)	25 mL

Dissolver o p-dimetilaminobenzaldeído em álcool amílico normal.

Adicionar o ácido clorídrico vagarosamente. Estocar a 4°C.

3.2 Reagente de Ehrlich

P Dimetilaminobenzaldeído	5 g
Etanol,95%	95 mL
Ácido clorídrico (concentrado)	25 mL

3.3 Reagente para o teste de oxidase

N,N - Dimetil - p - fenilenodiamina	1 g
Água purificada	100 mL

Este reagente pode ser usado no período de até 7 dias se for estocado em frasco escuro sob refrigeração.

3.4 Reagente para o teste de vermelho de metila

Vermelho de metila	0,10 g
Etanol 95%	300 mL
Água purificada.....	500 mL

Dissolver o vermelho de metila em 300 mL de etanol. Completar o volume para 500 mL com água purificada.

3.5 Reagentes para o teste de Voges-Proskauer

- Solução 1

Alfa-naftol	5 g
Álcool (absoluto)	100 mL

- Solução 2

Hidróxido de potássio	40 g
Água purificada.....	100 mL

3.6 Corante Azul Algodão Lactofenol

Fenol	20,00 mL
Ácido láctico	20,0 mL
Glicerol	40,0 mL
Água purificada	20,0 mL
Azul algodão	0,05 g

3.7 Reagentes para Nitrato (GREISS-ILOSVOY)

Reagente A : α -Naftilamina 0,5% ou Dimetil-L-Naftilamina a 0,6%

α -Naftilamina.....	5,0g
(ou N,N-Dimetil-L-Naftilamina).....	6,0g
Àcido acético (5N) 30%.....	1000mL

Dissolver o reagente em um volume menor que 1000 mL de ácido acético 5N, aquecendo levemente.

Transferir a solução para frasco volumétrico de 1000 mL e acrescentar solução de ácido acético 5N até completar 1000 mL.

Filtrar a solução através de algodão absorvente lavado.

Estocar em frasco fechado e escuro.

Reagente B : Ácido Sulfanílico a 0,8%

Ácido sulfanílico.....8g
 Ácido acético (5N) 30%.....1000mL

Dissolver o ácido sulfanílico em um volume menor que 1000 mL de ácido acético 5N.

Transferir a solução para frasco volumétrico de 1000 mL e acrescentar solução de ácido acético 5N até completar 1000 mL.

Estocar em frasco fechado e escuro.

3.8 Solução salina 0,85% - pH 7.2

Cloreto de Sódio 8,5 g
 Água purificada 1000 mL
 pH 7,0 ± 0,2