

AVALIAÇÃO FÚNGICA E DETERMINAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM AMOSTRAS DE *CASSIA ANGUSTIFOLIA* COMERCIALIZADAS EM MINEIROS-GO

Fungal evaluation and determination of Staphylococcus aureus in samples of Cassia angustifolia marketed in Mineiros-GO

Ariane Martini Wurster*, Flávia Garcia Dorigon** & Fabio Bahls Machado**

*Discente do Curso de Farmácia, Faculdade Mineirense - FAMA, Mineiros, GO, Brasil.

**Docente do Curso de Farmácia, Faculdade Mineirense - FAMA, Mineiros, GO, Brasil

RESUMO

No Brasil os fitoterápicos movimentam milhões de dólares por ano, possuem como princípio ativo, extratos vegetais. A população tem procurado a fitoterapia na tentativa de obter hábitos de vida mais saudáveis, não deixando de existir, à preocupação em relação à qualidade deste produto. A planta utilizada neste estudo foi a *Cassia angustifolia*, conhecida como sene, tendo como indicação principal o tratamento da constipação intestinal. De acordo com a resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004, a pesquisa de contaminantes em fitoterápicos deve estar de acordo com a Farmacopeia Brasileira. Com o objetivo de avaliar a contagem global de fungos e determinação de *Staphylococcus aureus* de amostras de *Cassia angustifolia*, de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira de 2010. Desta forma realizou-se uma pesquisa na cidade de Mineiros-GO, verificando a presença de fungos bem como de *Staphylococcus aureus* nas folhas de *Cassia angustifolia* comercializadas em suas embalagens originais. Foram encontradas três amostras de fabricantes diferentes, as quais foram submetidas aos testes microbiológicos. Os resultados confirmaram a ausência de *Staphylococcus aureus*, e de crescimento fúngico. Diante das análises pode-se afirmar que os fabricantes das amostras analisadas estão cumprindo com o controle de qualidade de fungos e de *Staphylococcus aureus* do produto testado.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Sene, Constipação intestinal, Controle microbiológico.

ABSTRACT

In Brazil the herbal move millions of dollars a year, have as a principle active plant extracts. The population has sought phytotherapy in trying to get more healthy lifestyle, do not cease to exist, the concern about the quality of this product. The plant used in this study was the *Cassia angustifolia*, known as senna, having as main indication the treatment of constipation. According to Resolution RDC No. 48 of March 16, 2004, the survey of contaminants in herbal medicines should be in accordance with the Brazilian Pharmacopoeia. In order to assess the overall count of fungi and determination of *Staphylococcus aureus* samples *Cassia angustifolia*, according to the specifications of the Brazilian Pharmacopoeia 2010. Thus we carried out a survey in Mineiros - GO, verifying the presence of fungi and *Staphylococcus aureus* in *Cassia angustifolia* leaves sold in their original containers. We found three samples of different manufacturers, which were subjected to microbiological tests. The results confirmed the absence of *Staphylococcus aureus* and fungal growth. Given the analyzes it can be stated that the manufacturers of the samples are complying with the quality control of fungi and *Staphylococcus aureus* product tested.

Keywords: Herbal medicines, Sene, Constipation, Microbiological control.

INTRODUÇÃO

A sociedade tem buscado a fitoterapia como recurso terapêutico, na tentativa de obter hábitos de vida mais saudáveis. Não deixando de existir, à preocupação em relação a qualidade destes produtos, ficando atento com a qualidade da informação e formação de profissionais. A qualidade pode ser definida como um conjunto de atributos que se deseja para um determinado produto, ou seja, um conjunto de critérios que caracterizam tanto a matéria-prima quanto o produto final [1,2,3,4].

Cassia angustifolia é uma planta classificada como laxativa antranoide. Sua indicação principal é para o tratamento da constipação por inércia intestinal em situações em que se exigem facilidade de defecação. O uso contínuo ou sobredosagem pode resultar em diarreia com perda excessiva de potássio, albuminúria e hematúria [5,6].

Para se obter um produto fitoterápico exige que a produção esteja de acordo com os conceitos atuais de qualidade. A partir de estudos realizados, pode-se ressaltar a importância do controle de fitoterápicos. Foi realizado um estudo pela Universidade Estadual de Maringá, no Paraná, de produtos feitos com folhas de maracujá e de eucalipto entre outros, onde apontaram contaminação com microrganismos e insetos [2].

A falta de hábitos de higiene e limpeza do local podem contaminar o produto com fezes, insetos, fungos patogênicos e bactérias, entre elas *Salmonella spp.* coliformes totais, fecais e *Staphylococcus aureus*. Considera-se também o contato com o produto e a contaminação derivada de operadores significante. A contaminação durante o uso ou estocagem do produto também é considerada e difícil de se prever [7,8].

A resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004 [9], dentre suas disposições, estabelece que a pesquisa de contaminantes microbiológicos em fitoterápicos deve estar de acordo com especificações da Farmacopeia Brasileira.

Diante disso, este trabalho teve como propósito, verificar a presença de fungos e *Staphylococcus aureus* em amostras de folhas de *Cassia angustifolia* destinadas a fazer chás, em suas embalagens originais, comercializadas na cidade de Mineiros-GO, salientando desta forma sobre os cuidados e orientação necessária para manipulação de plantas medicinais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Realizou-se uma pesquisa na qual foram encontradas três amostras de *Cassia angustifolia* de fabricantes diferentes no comércio da cidade de Mineiros-GO. As quais foram representadas por amostra do fabricante A (Validade: Agosto/2014, Lote/026), fabricante B (Não foram fornecidos data de validade e lote) e fabricante C (Validade: Outubro/2014, Lote 1457G1-0139ECO).

Análise Microbiológica

As análises foram todas realizadas em triplicata no laboratório de microbiologia, nas dependências da Faculdade Mineirense –FAMA.

Os materiais utilizados foram separados e esterilizados de acordo com a necessidade de utilização. Verificados quanto à validade e estados de uso. Para esterilização foram necessários autoclave, estufa para secagem, papel crepado e fita para autoclave. Bancadas desinfetadas de acordo com os procedimentos padrões, utilizando etanol a 70%.

Os meios de cultura e provas de identificação foram preparados de acordo com a metodologia a seguir: primeiramente foi preparado o caldo de enriquecimento, Caldo de Caseína de Soja (Prodimol Biotecnologia®), logo após foram preparados os meios contendo Sal Manitol (Prodimol Biotecnologia®) nas placas. Para preparação dos meios, antes de adicioná-los ao erlenmeyer ou as placas, estes passaram por um processo de esterilização na autoclave 15 minutos a 120°C sobre pressão de 1,6 atm.

Determinação de contaminantes fúngicos

Pesou-se 1 g de cada amostra, maceradas em gral previamente esterilizado. Posteriormente, diluiu-se em 9 mL de tampão fosfato pH 7,0, e submeteu-se aos processos de agitação e filtração em gaze. Em seguida, pipetou-se 1 mL do filtrado e transferiu-se para um erlenmeyer contendo 9 mL de tampão fosfato pH 7,0, realizando 3 diluições decimais sucessivas [1].

Para preparação da solução tampão fosfato pH 7,0, dissolveu-se o fosfato de potássio monobásico (Vetec®) em 500 mL de água destilada, acertou-se o pH para 7,0 com hidróxido de

sódio (Vetec[®]) 4%, completou-se o volume com água. Esterilizado e conservado sob refrigeração de acordo com a Farmacopeia brasileira 5ª edição (2010) [10]. Transferiu-se 100 μ L de cada diluição para tubos de ensaio contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Prodimol Biotecnologia[®]) e incubadas a 25°C, por 5 dias [1].

Determinação de *Staphylococcus aureus*

Preparou-se a amostra usando diluição 1:10 de 1g do produto. Utilizou-se 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo Caseína de Soja (Prodimol Biotecnologia[®]). Homogeneizou-se e incubou-se 32,5°C durante 24 horas. Ao testar o dispositivo transdérmico filtrou-se 50 mL de Caldo de enriquecimento e transferiu-se a membrana para 100 mL de Caldo Caseína de Soja (Prodimol Biotecnologia[®]). Incubou-se a 32,5°C durante 24 horas. Para seleção e subcultura, agitou-se e transferiu-se uma alça para placa contendo Ágar Sal Manitol (Prodimol Biotecnologia[®]). Incubando a 32,5 °C durante 72 horas, critérios preconizados pela Farmacopeia brasileira 5ª edição (2010) [10].

De acordo com a Farmacopeia brasileira 5ª edição (2010) [10], para interpretação da análise, observa-se a presença ou não de crescimento de colônias amarelas ou brancas rodeada por uma zona amarela que indica a presença provável de *S. aureus*, em caso de confirmação, serão realizados testes de identificação microbiana.

Prova da Catalase

Para a realização da prova da catalase, as lâminas foram numeradas de 1 a 9, fez-se dois círculos, um para controle e outro para amostra. Colocou-se sobre a lâmina uma colônia da bactéria da amostra analisada, e em seguida adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (Farmax[®]). A presença ou ausência da atividade da catalase é um teste simples para subdividir vários gêneros. Quando uma gota de peróxido é colocada sobre a colônia da bactéria produtora de catalase, aparecem bolhas de oxigênio [11].

Prova da Coagulase

Em seguida, realizou-se a prova da coagulase, na qual numerou-se as lâminas de 1 a 9, traçou-se dois círculos com lápis de cera em uma lâmina de vidro para cada amostra em triplicata, colocou-se duas gotas de água destilada ou solução fisiológica estéreis dentro de cada círculo. Com

auxílio da alça de platina agregou-se a colônia em estudo, homogeneizando delicadamente em cada círculo. Adicionou-se uma gota de plasma para a prova da coagulase em um dos círculos. No outro círculo, adicionou-se uma gota de água destilada como controle. Homogeneizou-se com palito de madeira, inclinou-se a lâmina para frente e para trás. Onde foram observadas a presença ou não de aglutinação [12].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem global de fungos em triplicata demonstraram que, não houve presença de contaminantes nas amostras, conforme tabela 1, nas diluições testadas. Gerando um certo questionamento, mas de acordo com os fabricantes, seus produtos passam por um rígido controle de produção, com técnicas modernas, esterilização individual dos produtos, exclusivo sistema de colheita, secagem e embalagem.

Tabela 1: Resultados obtidos para análise fúngica de amostras de *Cassia angustifolia* comercializadas em suas embalagens originais

Amostras	Resultados
Amostra 1 - Fabricante A	Ausência de Fungos
Amostra 2 - Fabricante A	Ausência de Fungos
Amostra 3 - Fabricante A	Ausência de Fungos
Amostra 4 - Fabricante B	Ausência de Fungos
Amostra 5 - Fabricante B	Ausência de Fungos
Amostra 6 - Fabricante B	Ausência de Fungos
Amostra 7 - Fabricante C	Ausência de Fungos
Amostra 8 - Fabricante C	Ausência de Fungos
Amostra 9 - Fabricante C	Ausência de Fungos

De acordo com Barbosa e colaboradores (2010) [13], alto nível de contaminação fúngica pode estar diretamente ou indiretamente relacionado com as condições climáticas da região,

adubação, qualidade da água de irrigação e outros. Conforme Rocha e colaboradores (2012) [14], a presença de fungos foram constatadas em 100% das amostras analisadas, mas refletiam a inadequação das condições de higiene presentes nos comércios e nas plantas, por serem de feira livre. O que diferencia das amostras analisadas neste presente estudo, pois possuíam embalagens originais, fabricantes cadastrados na ANVISA, e inclusive uma delas apresentava na embalagem que o produto passou por processo de esterilização.

Realizou-se análise de determinação de *Staphylococcus aureus*, após 72 horas de incubação a 32,5°C em Ágar Sal Manitol observou-se o crescimento de colônias amarelas rodeada por uma zona amarela em todas as amostras, mas não podendo afirmar a real presença de *S. aureus*, necessitando assim das provas de identificação.

A coloração de Gram foi determinada, onde, as bactérias Gram positivas coram-se de roxo, e as bactérias Gram negativas coram-se de vermelho. As lâminas analisadas apresentaram a presença de bactérias Gram positivas, e em forma de bacilos, o que não é indicativo da presença de *Staphylococcus sp.*

Segundo Murray, Rosenthal & Pfaller (2009) [11] as células destes cocos Gram positivos do gênero *Staphylococcus* crescem com um perfil que se assemelha a cachos de uvas, no entanto podem aparecer como células únicas, pares ou em cadeias. São capazes de crescer em alta concentração de sal e a temperaturas que variam de 18° C a 40°C. As colônias de *Staphylococcus aureus* são douradas como resultado de pigmentos carotenoides formados durante o seu crescimento, única espécie encontrada em seres humanos que produz a enzima coagulase.

Diante da presença de bacilos gram positivos nas amostras, surgiram novos questionamentos. Foi feita uma análise da diferença do Ágar Sal Manitol e Ágar Sal Manitol gema de ovo polimixina, no qual encontrou-se uma pequena diferença na composição, apresentando apenas NaCl. De acordo com Prodimol Biotecnologia® e outros fabricantes, o Ágar Sal manitol tem como finalidade o isolamento de *Staphylococcus aureus*. Já o Ágar manitol gema de ovo polimixina da Himedia, é usado para identificação das espécies de *Bacillus* e *Staphylococcus* patogênicos.

Suspeitou-se a presença *Bacillus subtilis* nas amostras, o que motivou a realização de uma pesquisa sobre tal microrganismo. Devido a diferença mínima entre os meios de cultura, despertou-se o interesse sobre o bacilo em questão. *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram positiva, não patogênica, não colonizadora de tecidos, utilizada como modelo de estudo de bactérias gram positivas, bactéria habitante natural do solo que pode colonizar todos os órgãos vegetativos da

planta, sendo bom agente de biocontrole. Sua aplicação no solo traz benefícios diretos para a produção agrícola, desde a germinação de sementes até a produção de grãos [15,16,17].

Na prova da catalase realizada neste trabalho, todas as amostras apresentaram catalase positiva, pois apareceram bolhas de oxigênio na presença de peróxido de hidrogênio 3%. A formação de bolhas na prova da catalase indica ser a família *Micrococcaceae*, como por exemplo *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus*, *Stomatococcus*. E quando não há formação de bolhas indica ser a família *Streptococcaceae*, como *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Aerococcus spp.*, *Gemella spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus spp* [12].

Para uma identificação correta do microrganismo seria necessário a realização de outros testes específicos para bacilos gram positivos, o que não foi o propósito do trabalho.

A utilidade da prova da coagulase refere-se na separação de espécies de importância clínica, *S. aureus*- coagulase positiva, das demais espécies – coagulase negativa. Quando as células bacterianas são suspensas em plasma (fibrinogênio), formam-se cordões de fibrina entre elas, o que causa agrupamento sob forma de grumos visíveis [12].

Em relação à determinação de *Staphylococcus aureus*, não houve crescimento dos mesmos. No teste da coagulase as amostras apresentaram ausência do microrganismo, não aglutinando visivelmente. Os resultados se encontram abaixo na tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos para análise *S. aureus* de amostras de *Cassia angustifolia* comercializadas em suas embalagens originais

Amostra	Prova do manitol	Coloração de Gram	Prova da Catalase	Prova da Coagulase
1-Fabricante A	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
2-Fabricante A	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
3-Fabricante A	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
4-Fabricante B	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
5-Fabricante B	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
6-Fabricante B	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
7-Fabricante C	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
8-Fabricante C	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo
9-Fabricante C	positivo	Bacilo positivo	positivo	negativo

As provas realizadas proporcionaram a verificação de um outro microrganismo na coloração de Gram, confirmando com a prova da catalase, sendo indicativo de *Bacillus subtilis*, à qual seriam necessários outras provas de confirmação.

Segundo Furlaneto Marins & Endo (2003) [18], as amostras analisadas não apresentaram presença de *Staphylococcus aureus*, ressaltando que este microrganismo não é contaminante comum desse tipo de material devido à baixa atividade de água, embora outros autores detectaram 4,4% das amostras contaminadas por este microrganismo. Porém, a produção de enterotoxinas por *S.aureus* requer condições apropriadas, como elevada atividade de água, o que não ocorre de tal material.

CONCLUSÃO

Houve dificuldade na obtenção das amostras, pois, a venda de *C. angustifolia* é grande, porém vende-se mais a planta na forma de pó ou extrato.

Pode-se concluir que as amostras analisadas de *Cassia angustifolia* estão dentro dos padrões previstos de acordo a ausência de fungos. A análise de fungos nas determinadas diluições, foram satisfatórias, confirmando que as amostras obtidas estão dentro dos parâmetros farmacopeicos aceitos pela ANVISA.

Em relação à determinação de *Staphylococcus aureus*, o produto analisado esta dentro dos padrões previstos para análise.

REFERÊNCIAS

1. Rocha LO, Soares MMSR & Corrêa CL. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acustifolia* Delile (sene) e *Pneumusboldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. *Rev. Bras. Ciên. Farm.* 40(4): 1-10, 2004.
2. Souza FS & Maciel CCS. Produtos Fitoterápicos e a Necessidade de um Controle de Qualidade Microbiológico. *VF Imprensa.* 3(2): 1 - 9, 2010.

3. Gil ES. Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 512p.
4. Klein T, Longhini R, Bruschi ML & Mello JCP. Fitoterápicos um mercado promissor. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 30(3): 241-248, 2009.
5. Oliveira AL, Ribeiro CA, Jesus GS, Santana TTO, Costa JA & Brandão HN. Avaliação da qualidade de amostras de *Senna alexandrina* Miller comercializadas em três estabelecimentos de Feira de Santana, Bahia. *Revista Científica do Departamento de Química e Exatas.* 3(2): 2530, 2012.
6. Barnes J, Anderson LA & Phillipson JD. Fitoterápicos. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 720 p.
7. Salvador FC, Gracioli ADN, Burin AS & Faila N. Análise microbiológica e de impurezas encontradas na *Pimpinella anisum* L., comercializadas em lojas de produtos naturais de Apucarana-PR e região. *Saud. Pesq.* 4(2): 140 - 146, 2011.
8. Pinto TJ, Kaneko TM & Pinto AF. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 804p.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004.
10. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2010.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2009. 960 p.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. I Fórum Nacional de Educação Farmacêutica: O farmacêutico de que o Brasil necessita (Relatório Final). Brasília, DF, 2008.

13. Barbosa CKR, Costa JPR, Bonfim FPG, Almeida AC, Martins ER. Qualidade microbiológica de plantas medicinais cultivadas e comercializadas em Montes Claros, MG. *Biotemas*. 23(1): 77 - 81, 2010.
14. Rocha FA, Bezerra RMK, Souza JAB, Bezerra JRG, Pontes EDM & Araújo MFF. Quantificação da microbiota fúngica presente em plantas medicinais comercializadas em feira popular de Currais Novos-RN. *VII CONNEPI – Congresso Norte Nordeste de Pesquisas e Inovação*. Tocantins, Brasil, 2012.
15. Angnese MT, Della Giustina Júnior LHP, Pansera MR, Pagno RS, Mezzomo F, Zorgi E, Pereira COF & Ribeiro RTS. Efeito fungistático de *Bacillus* spp. sobre fungos fitopatogênicos. *Rev. Bras. Agroecol.* 4(2): 97-100, 2009.
16. Lana Filho R, Ferro HM & Pinho RSC. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *R. Trop. Ci. Agr. Biol.* 4(2): 12-20, 2010.
17. Lima FF, Nunes LAPL, Figueiredo MVB, Araújo FF, Lima LM & Araújo ASF. *Bacillus subtilis* adubação nitrogenada na produtividade do milho. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.* 6(3): 1-5, 2011.
18. Furlaneto L, Marins VD & Endo R. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e de seus infusos. *Saúde em Revista*. Londrina, 5(10): 49-52, 2003.