

“ Avaliação dos Níveis de Contaminação Microbiológica Ambiental das Diversas Áreas de Produção do Laboratório de Fitoterápicos do Programa de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Juiz de Fora”

**Melo, Jacqueline T. ¹; Cruzeiro, Ricardo L. A. ¹; Macedo, Jorge A. B. ²;
²Oliveira, Murilo G. ³; Teixeira, João B. P ⁴; Beraldo, Antônio F. C. A. ⁵ ;
Castro, Oscavo F. ⁶**

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia e Bioquímica, UFJF, Bolsista do Programa BIC/UFJF; ²Professor do Departamento de Alimentos e Toxicologia, UFJF (Orientador); ³ Professor do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, UFJF (Orientador); ⁴Professor do Departamento Farmacêutico, UFJF (Pesquisador Participante); ⁵Departamento de Estatística, UFJF (Professor Colaborador); ⁶Técnico Agrícola do Programa de Plantas Medicinais da UFJF.

RESUMO: Foi realizada em presença de cinco diferentes plantas medicinais a avaliação microbiológica dos diversos ambientes de produção de fitoterápicos, sala de seleção (SS), estufa de estabilização (ES) e sala de manipulação (MP). Foram quantificados microrganismos aeróbios/mesófilos e fungos através da exposição de placas de Petri contendo agar padrão para contagem (PCA) e agar batata dextrosado (BDA), respectivamente, em presença de hortelã (*Mentha sp*), guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), poejo (*Mentha pulegium*), capim-limão (*Cymbopogum citratus* (DC.) Stapf.) e camomila (*Matricaria chamomilla* L.). Constatou-se que a contaminação foi maior na MP em todas as plantas, exceto com a camomila. Porém houve diferença significativa ($\alpha = 5\%$) apenas em relação às contagens das placas de BDA. Esta diferença significativa indica a necessidade da utilização de desinfecção com produtos com ação fungicida contribuindo assim com o aumento a vida-de-prateleira dos fitoterápicos.

PALAVRAS-CHAVE: contaminação, fitoterápicos, desinfecção, fungos, bactérias.

ABSTRACT: It was realized in presence of five different plants a microbiological evaluation of several environment of fitoterapics' production, selection's room (SS), estabilization's stove (ES) and manipulation's room (MP). Were quantified aerobic/mesophilic microorganisms and fungi with plate -count agar (PCA) and dextrosado batata agar (BDA), respectively, in presence of hortelã (*Mentha sp*), guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), poejo (*Mentha pulegium*), capim-limão (*Cymbopogum citratus* (DC.) Stapf.) and camomila (*Matricaria chamomilla* L.). It was verified that the contamination was bigger on the manipulation's room in all the cases, except with the camomila. However it existed significance difference ($\alpha = 5\%$) only regarding count plates of BDA. Such fact excel the weight of disinfection's methods to increase the fitoterapics produceds' self-live.

KEY WORDS: contamination, fitoterapics, disinfection, fungi, bacteria.

I- INTRODUÇÃO

A cada dia difunde-se mais o uso de plantas medicinais; os motivos desse aumento de consumo vão desde o preço até mesmo a obtenção de menos efeitos colaterais. Com isso, a preocupação em relação à higiene também cresce. Neste sentido, o aspecto microbiológico merece imprescindível consideração, pois o exame de determinada planta fornece informações importantes sobre sua qualidade, higiene e sanificação em sua manipulação e, ao longo do processamento, adequação das técnicas utilizadas na preservação e a eficiência das operações de transporte e armazenamento do fitoterápico produzido. Nestas condições, em função da avaliação microbiológica da planta, será possível uma estimativa de sua vida útil ou de sua vida-de-prateleira (self-live), bem como, pela pesquisa de microrganismos patogênicos ou indicadores de contaminação fecal, será positivada ou não a existência de riscos à saúde pública advindos de seu consumo (Azevedo, et al., 1988).

Em relação aos ambientes das áreas de produção de fitoterápicos, a avaliação é necessária e deve ser bastante criteriosa, procurando, principalmente, reproduzir as condições rotineiras do processo. A população microbiana do ar não tem traços de especificidade; ela é composta de espécies presentes nos ecossistemas terrestres e aquáticos trazidas para a atmosfera junto com a poeira ou em gotas formadas durante a evaporação. O ar também pode conter patogênicos disseminados pela tosse ou presentes nos excrementos (inclusive no esterco utilizado como adubo). O ar acima das culturas vegetais atingidas por doenças contém os esporos e células de fitopatogênicos; uma parte desses fica suspensa no ar, outra adere a partículas de poeira formando juntas o aerossol microbiano; assim, esses microrganismos são disseminados pelos ventos e, quando os patogênicos estão presentes, existe o perigo de difusão de doenças (Azevedo, et al., 1991).

Outro fator a ser considerado é a microbiota normal das plantas, que, apesar de aparentemente não ser detectada pelo método aqui utilizado - o de "Sedimentação em Placa", pode também se difundir no ambiente pela manipulação da planta, principalmente se esta tiver aspecto piloso, como é o caso das flores do Guaco (*Mikania glomerata* Sprengel). A definição das espécies ou grupos de microrganismos presentes depende das características inerentes à planta, denominadas fatores intrínsecos, além das condições ambientais, os fatores extrínsecos (Azevedo, et al., 1988). Assim sendo, a população microbiana contida no ambiente, sob condições naturais, contém muitas espécies diferentes, não somente espécies de bactérias, mas também espécies de leveduras, bolores, algas, protozoários e até de vírus, sendo de interesse sob o aspecto da deterioração os três primeiros. Se torna importante identificar quantos e quais tipos de microrganismos estão presentes no ambiente (Chan, et al., 1996).

As plantas analisadas neste estudo quanto ao aspecto microbiológico fazem parte do "Programa de Plantas Medicinais" da Universidade Federal de Juiz de Fora, as quais são conhecidas popularmente pelos seguintes nomes: hortelã, guaco, poejo, capim-limão e camomila. A hortelã (*Mentha sp.*), o poejo (*Mentha pulegium*) e o capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) apresentam propriedades anti-sépticas (Panizza, 1997; Costa, 1994; Dias, 1926; Araújo e

Lucas, 1930; Bucley, 1930), a camomila (*Matricaria chamomilla* L.) possui um constituinte anti-inflamatório (Hortulus, 1998; Leibold, 1980) e o guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) é um broncodilatador e anti-séptico das vias respiratórias (Martins, et al., 1994; Hortulus, 1997).

Restringe-se aqui à análise quantitativa com a preocupação principal de alertar os responsáveis pela produção de fitoterápicos para a necessidade de elaboração de processos eficientes de sanificação dos laboratórios.

II- MATERIAL E MÉTODOS

II.1- Material

- Plantas medicinais do horto da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF: hortelã, guaco, poejo, capim-limão, camomila. Foram coletadas 3 amostras para análise microbiológica de cada planta.
- 102 Placas de Petri tamanho oficial: 9,1 cm de diâmetro e 65,038 cm² de área.
- Meios de Cultura: PCA (Agar Padrão para Contagem) e BDA (Agar Batata Dextrosado).
- Estufa para incubação.
- Geladeira - para conservação dos meios.

II.1.1- Preparo dos meios de cultura para avaliação microbiológica

II.1.1.1- Caracterização microbiológica

Quatro condições principais influenciam o meio físico de um microrganismo: temperatura, pH, atmosfera gasosa e pressão osmótica. O processo visa à obtenção de colônias de microrganismos mesófilos, que crescem melhor em temperaturas entre 25 e 40°C. As bactérias saprófitas e os fungos são exemplos de microrganismos que crescem no limite mínimo da variação de temperatura mesofílica. Os microrganismos parasitários de humanos e animais crescem no limite máximo dessa variação. Aqueles que são patogênicos para o homem crescem melhor em torno da temperatura corporal, ou seja, a 37°C (Chan, et al., 1996).

Os elementos químicos principais para o desenvolvimento das células microbianas incluem carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo (Chan, et al., 1996).

Os meios de cultura são escolhidos em virtude dos possíveis microrganismos a serem detectados nos ambientes das áreas de produção de fitoterápicos, levando-se em consideração suas exigências nutricionais, assim como suas características de cultivo.

O meio de cultura indicado com o intuito de crescimento de bactérias aeróbias mesófilas é o PCA (Agar Padrão para Contagem), um meio extremamente rico em nutrientes, o qual é colocado em placas de Petri estéreis; após exposição ao meio ambiente, as placas são encubadas em estufa a 35°C por 48 horas; a esse tempo é feita a contagem de colônias. Para o cultivo de fungos, em geral, é usado o BDA (Agar Batata Dextrosado), um meio com concentração maior de glicose, e apresenta um pH em torno de 5,6, mais baixo que o PCA, que tem pH em torno de 7,0. A alta concentração do açúcar e o pH relativamente baixo favorecem o crescimento de fungos, mas inibem o desenvolvimento da maioria das bactérias

(Chan, et al., 1996). As placas de Petri contendo BDA são deixadas para incubação à temperatura ambiente, ao redor de 25° C, por 72 horas, quando é feita a contagem de colônias.

Nesses meios podem crescer tanto microrganismos que levam à deterioração das plantas ou redução na vida-de-prateleira do fitoterápico quanto aqueles chamados indicadores, cujas presenças fornecerão informações sobre as condições higiênico-sanitárias vigentes nas áreas de produção (Azevedo, et al., 1988).

A visualização do crescimento de bolores é devida ao desenvolvimento do micélio fúngico, constituído de um aglomerado de hifas, com aspecto variável, seco a úmido e gelatinoso, compacto ou pouco denso, com aparência cotonosa; o micélio usualmente é incolor, embora em algumas espécies haja produção de pigmentos, conferindo-lhe uma tonalidade vermelha, amarela, castanha, cinza ou preta. Em muitos bolores, as diferentes colorações das colônias são decorrentes da maciça produção de esporos assexuais (conídios e esporangiosporos), resultando em colorações verde, verde-azulada, laranja, castanha, cinza ou preta, sendo características auxiliares na identificação de gêneros e espécies (Azevedo, et al., 1988). O aspecto das colônias de leveduras e bactérias é bastante semelhante, sendo portanto, facilmente confundidas, a não ser pela coloração diferenciada de algumas colônias de leveduras.

II.1.1.2- PCA - Agar Padrão para Contagem

Componentes:

Extrato de levedura (2,5 g), triptona (5 g), glicose (1 g), agar (15 g).

Preparação:

Suspender os componentes em 1 l de água destilada/ deionizada. Deixar em repouso por 15 minutos. Ferver até dissolução completa. Distribuir em tubos ou frascos apropriados, pH final: 7,0 ± 0,1.

II.1.1.3- BDA - Agar Batata Dextrosado

Componentes:

Infuso de batata (4 g), glicose (20 g), agar (15 g).

Preparação:

Dissolver os componentes em 1 l de água destilada. Hidratar por 10-15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente e ferver por 1 minuto. Esterilizar a 121° C por 15 minutos. Esfriar até 45-50° C. Distribuir por placa 15-20 mL (placa de Petri estéril). Se não for usado no mesmo dia, armazenar a 2-8° C em posição invertida. O meio preparado é válido por 6-8 semanas. O procedimento de uniformização pode incluir ajustes para encontrar o desempenho adequado, pH final: 5,6 ± 0,2 a 25° C.

II.2- Métodos

Utilizou-se a técnica de sedimentação, a qual consiste em expor a placa de Petri em determinado ambiente, durante 15 minutos. O crescimento de colônias

permite que seja feita a quantificação das mesmas e posterior identificação dos microrganismos presentes através de métodos específicos. Os meios de cultura utilizados, PCA e BDA, permitem o crescimento de bactérias aeróbias mesófilas e de fungos (bolores e leveduras) respectivamente. Sendo a placa contendo o PCA, após a coleta por sedimentação, colocada em incubação em estufa a 35° C por 48 horas, enquanto o BDA é deixado em incubação à temperatura ambiente (25°C) por 72 horas. Após o período de incubação é feita a contagem das colônias formadas em cada placa e o resultado é expresso em UFC/cm²/semana (Favero, et al., 1984; Giese, 1991; Andrade e Macêdo, 1996; Moreira da Silva, 1996).

Para expressar o resultado foram realizados alguns cálculos, segundo Moreira da Silva, 1996, em função do resultado ser expresso em UFC/cm²/semana:

Placa de petri oficial: 9,1 cm de diâmetro

Área da placa: 65,038 cm²

Número de minutos em uma semana: 10080 minutos

Nº DE COLÔNIAS / 65 cm² = Nº DE COLÔNIAS POR PLACA.

Nº DE COLÔNIAS / 65 cm²----- 15 minutos

X ----- 10080 minutos

$$X = \frac{(\text{Nº DE COLÔNIAS} / 65) \cdot 10080}{15} = \frac{\text{Nº DE COLÔNIAS} \cdot 155,077}{15}$$

$$X = \text{Nº DE COLÔNIAS} \cdot 10$$

Esta técnica foi utilizada durante 3 fases da produção de fitoterápicos: na sala de seleção (SS), na estufa de estabilização (ES) e na sala de manipulação (MP). Para cada coleta de uma das plantas foi feita a análise nessas áreas, colocando-se uma placa de PCA e uma de BDA.

Neste trabalho foram respeitados rigorosamente o período de plantio, a época e o horário de coleta de cada planta, sendo que não houve nenhum processo de limpeza das plantas após a coleta.

Outro aspecto a ressaltar é que, as condições nas quais foi executado o projeto se aproximaram o máximo possível da realidade do laboratório de plantas medicinais, não sendo alterada nenhuma rotina do setor de produção durante o período de pesquisa.

III- RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1- Resultados

QUADRO 1- Média dos resultados das contagens para aeróbios/ mesófilos e fungos (bolores e leveduras) nas diversas áreas de produção (média de três repetições)

| Loca I | | HORTELÃ | GUACO | POEJO | CAPIM- LIMÃO | CAMOMILA |
|-----------|-----|---------|-------|-------|-----------------|----------|
| SS | PCA | 0210 | 0127 | 0020 | 0023 | 0263 |
| | BDA | 0117 | 0303 | 0067 | 0067 | 0257 |
| ES | PCA | 0067 | 0023 | 0007 | 0060 | 0220 |
| | BDA | 0197 | 0070 | 0090 | 0043 | 0283 |
| MP | PCA | 1817 | 0157 | 2730 | 0147 | 0067 |
| | BDA | 1083 | 3867 | 3217 | 0603 | 0200 |

Unidade: UFC/ cm²/semana:

SS - Sala de Seleção

ES - Estufa de Estabilização

MP - Sala de Manipulação

PCA - Plate Count Agar (Agar Padrão para Contagem)

BDA - Batata Dextrose Agar (Agar Batata Dextrosado).

QUADRO 2- Resumo da análise de variância dos resultados obtidos nas contagens de microrganismo aeróbios mesófilos (média de três repetições)

| Fonte | SQ | gl | QM | F | alfa | F tab |
|--------|------------|----|-----------|------|------|-------|
| Trat | 2597804,13 | 2 | 1298902,1 | 2,45 | 0,05 | 4,459 |
| Blocos | 1794521,7 | 4 | 448630,4 | 0,84 | 0,05 | 3,838 |
| Erro | 4249547,9 | 8 | 531193,5 | | | |

* Significativo a 5% de probabilidade (P<0,05)

Trat = SS, ES, MP

Blocos = plantas

QUADRO 3- Resumo da análise de variância dos resultados obtidos nas contagens de fungos (média de três repetições)

| Fonte | SQ | gl | QM | F | alfa | F tab |
|--------|-----------|----|-----------|------|------|---------|
| Trat | 9017335,6 | 2 | 4508667,8 | 4,88 | 0,05 | 4,459 * |
| Blocos | 3489998,3 | 4 | 872499,6 | 0,94 | 0,05 | 3,838 |
| Erro | 7386527,7 | 8 | 923316,0 | | | |

* Significativo a 5% de probabilidade (P<0,05)

Trat = SS, ES, MP

Blocos = plantas

III.2- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela análise estatística, a nível de 5% de probabilidade, mostram que, tanto para os microrganismos aeróbios mesófilos como para fungos, não existem diferenças significativas, quando se comparam as contagens obtidas para as diversas plantas nas áreas da linha de produção de

fitoterápicos, ou seja, todas as plantas contribuem da mesma forma para os níveis da contaminação ambiental.

Quando se compara os níveis de contaminação ambiental entre as áreas da linha de produção (SS, ES, MP), independente da planta manipulada, os valores obtidos para microrganismos aeróbios mesófilos não apresentam diferença significativa; para contagens de fungos, os valores obtidos apresentam diferença significativa, a nível de 5% de probabilidade. Ressalta-se ainda, que a ES, tem área muito menor que SS e MP.

Já era esperado que as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, não apresentassem diferença significativa da SS para a MP, pois existe uma redução do "Aa" (atividade de água) na planta, ou seja, a disponibilidade de água na planta diminui da SS para a MP.

Outro resultado, que deve ser ressaltado, se relaciona com a camomila, pois se obteve na MP níveis menores de contaminação ambiental que na SS e ES, tanto para fungos como para microrganismos aeróbios mesófilos. Estes números são função da multiplicidade de princípios ativos presentes na camomila dos quais se destacam lactonas sesquiterpênicos e constituintes flavônicos, que ainda estavam sendo liberados para o meio ambiente (FIGURA 5).

Para complementar o presente trabalho e tendo em vista a crescente preocupação com a conservação de fitoterápicos por parte dos professores desta área na UFJF, há necessidade de se desenvolverem novos projetos visando a identificação dos microrganismos quantificados e a criação de métodos de higienização (retirada de resíduos e desinfecção) com produtos específicos para os ambientes de produção de fitoterápicos.

Outro aspecto importante, se deve à necessidade de realizar pesquisas envolvendo a manipulação concomitante de duas plantas dentro da linha de produção de fitoterápicos, para se avaliar a possibilidade de redução da microbiota ambiental, pela presença de princípios ativos diversos no ambiente.

Ressalta-se ainda a necessidade de utilização de EPI (equipamento de proteção individual) como a máscara, gorro, jaleco e luva em todas as etapas de manipulação das plantas.

IV- CONCLUSÃO

Em virtude dos resultados obtidos conclui-se que:

- O fluxo de pessoas no laboratório de Farmacodinâmica durante a presença das plantas, principalmente na SS e MP devem ser reduzidos, ou seja, o acesso a linha de produção de fitoterápico da UFJF deve ser restrito, com salas de uso específico.
- Previamente à manipulação de cada planta, as bancadas e ambiente devem sofrer um processo de higienização (retiradas de resíduos e desinfecção) com produtos específicos e de acordo com a microbiota característica da planta.
- Quanto à camomila se indica realizar um novo trabalho com a mesma metodologia utilizando-se a "mil folhas" (*Achillea millefolium*) que possui

REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS (Brazilian Journal of Medicinal Plants), V.2, n.2, Abril/2000, p.45-50.
www.aguaseaguas.ufjf.br / www.aguaseaguas.hpg.com.br j.macedo@terra.com.br
constituição química semelhante à da camomila, para uma avaliação da sua contribuição para a redução da microbiota ambiental.

V- Referências Bibliográficas

- ANDRADE, N.J., MACÊDO, J. A. B. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo, SP Varela, 1996. 182p.
- ARAÚJO, L., LUCAS, V. **Catálogo de Extratos Fluidos dos Laboratórios Silva Araújo**. Rio de Janeiro, RJ 1930. 185p.
- AZEVEDO, J.L., ROITMAN, I., TRAVASSOS, L.R. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo, SP; Editora Manole Ltda, 1988. v.1, 186p.
- AZEVEDO, J.L., ROITMAN, I., TRAVASSOS, L.R. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo, SP; Editora Manole Ltda, 1991. v.2, 126p.
- BUCLEY, J.P. **Matéria Médica, Farmacologia y Terapêutica Clínica Dental Moderna**. Barcelona; Editorial Labor, 1930. 577p.
- CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R., PELCZAR JÚNIOR, M.J. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. 2 ed. São Paulo, SP; Makron Books do Brasil, 1996. v.1, 524p.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4 ed. Lisboa; Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. 1031p.
- DIAS, R.A.S. **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. 1 ed. São Paulo, SP; 1926.
- FAVERO, M.S., GABIS, D.A., VESLEY, D. Environmental Monitoring Procedures. In: SPECK, M.L., **Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods**. Washington, D.C. APHA, 1984. 913p.
- GIESE, J.H. Sanitation: The Key to Safety and Public Health. **Food Technol.**, 1991. v.45, n.12. p. 74-80.
- HORTULUS, **Boletim Informativo do Programa de Plantas Medicinais da UFJF**, 1998. v.1, 1p.
- HORTULUS, **Boletim Informativo do Programa de Plantas Medicinais da UFJF**, 1998. v.2, 1p.
- LEIBOLD, G., **Guia das plantas medicinais**, Lisboa: Editorial Presença Ltda, 1980, 191p.

REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS (Brazilian Journal of Medicinal Plants),
V.2, n.2, Abril/2000, p.45-50.

www.aguaseaguas.ufjf.br / www.aguaseaguas.hpg.com.br j.macedo@terra.com.br

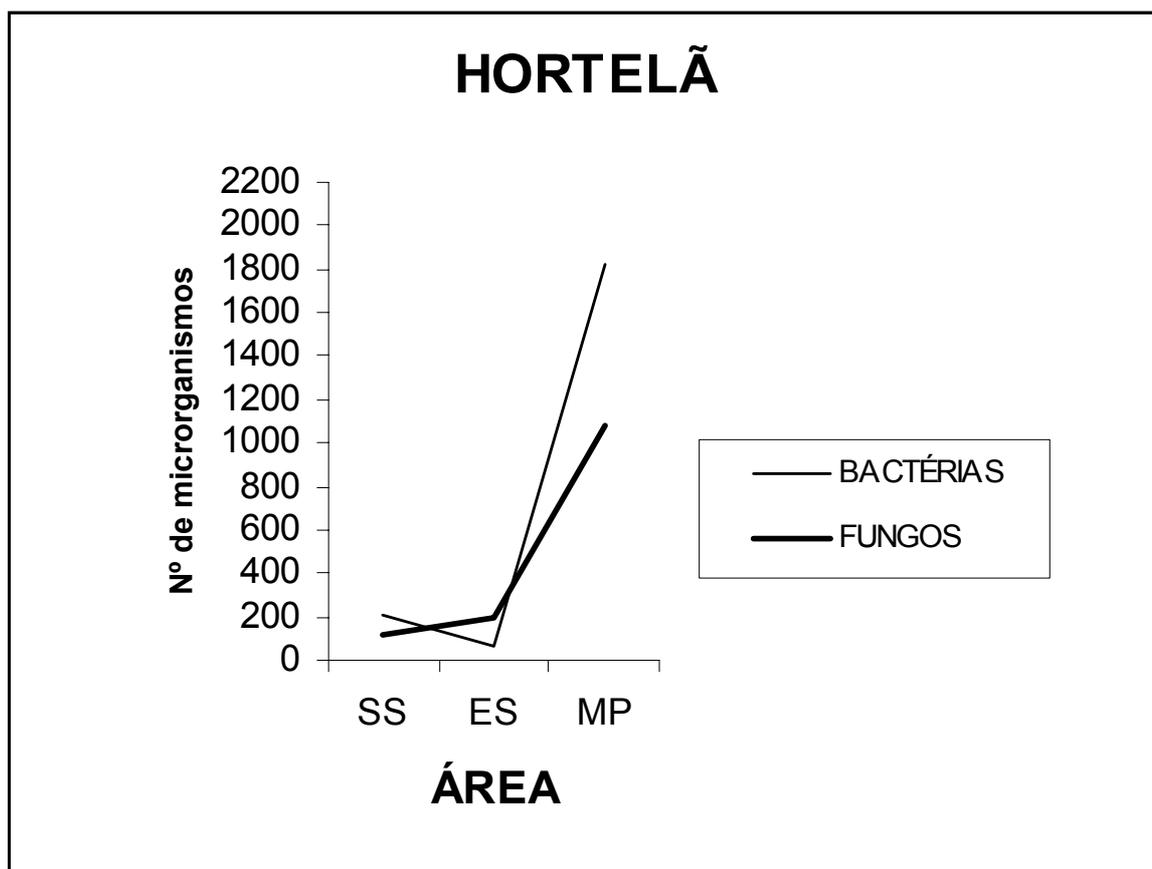
MARTINS, Et al. **Plantas Mediciniais**. 1 ed. Viçosa, MG; Imprensa Universitária,
1994. 220p.

PANIZZA, S. **Plantas que Curam. Cheiro de Mato**. 3 ed. São Paulo, SP; Ibrasa,
1997. 279p.

MOREIRA DA SILVA, R. M., **Especificações Microbiológicas para Ambientes,
Manipuladores e Equipamentos em Restaurantes Industriais em MG**.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade
Federal de Viçosa- MG, 1996. 84p.

VI- ANEXO

VI.1- FIGURAS

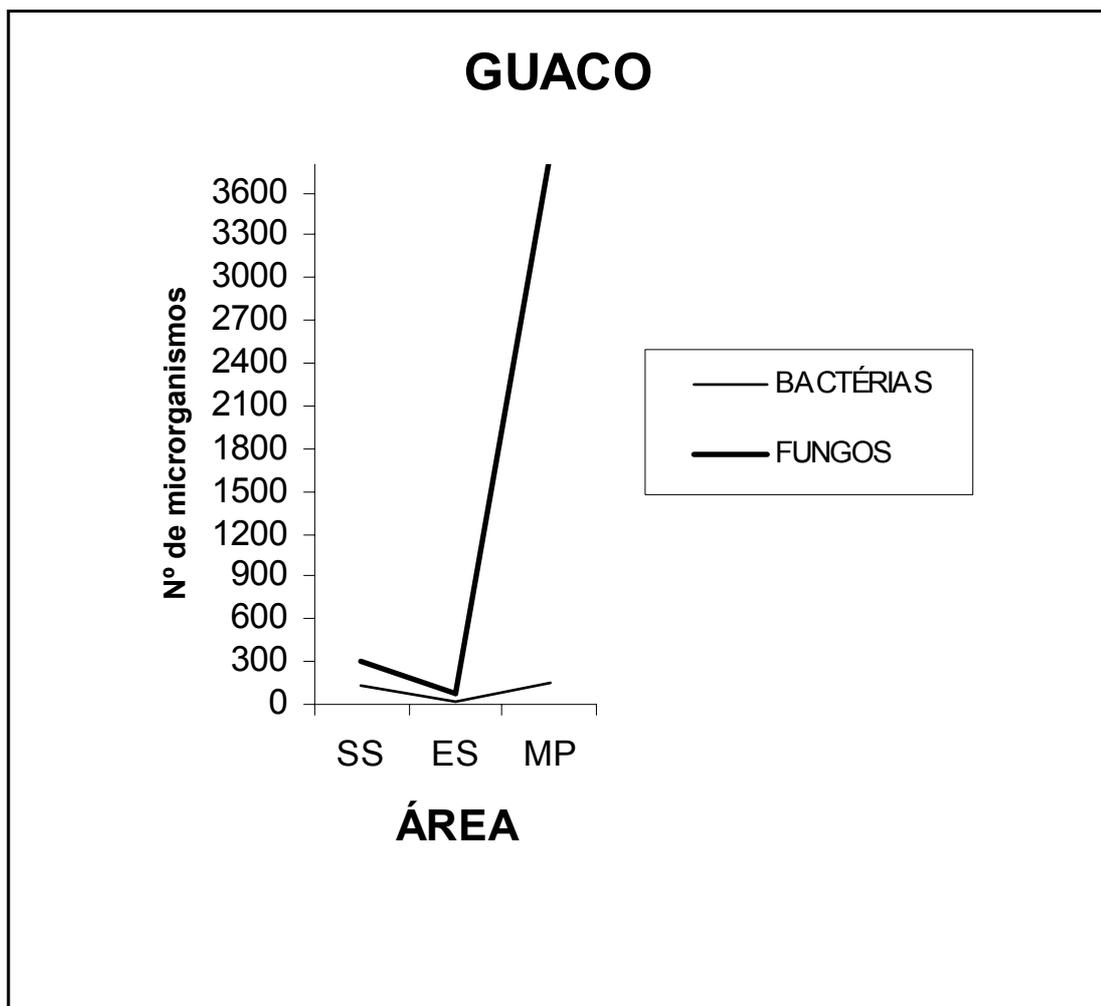


Unidade: UFC / cm² / semana

SS - Sala de seleção ES - Estufa de estabilização

MP - Sala de manipulação

FIGURA 1- Número de microrganismos nas diversas áreas de produção de fitoterápicos para o hortelã (média de três repetições).



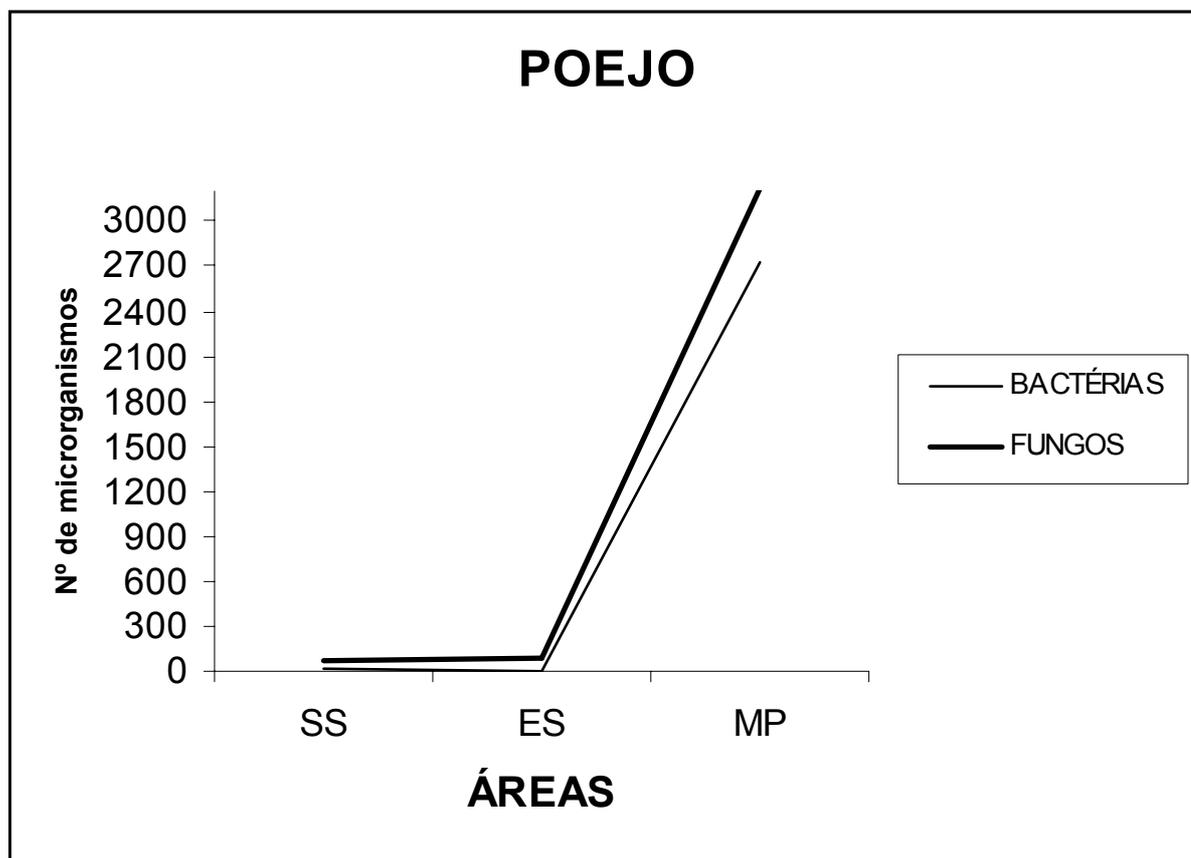
Unidade: UFC / cm² / semana

SS - Sala de seleção

ES - Estufa de estabilização

MP - Sala de manipulação

FIGURA 2- Número de microrganismos nas diversas áreas de produção de fitoterápicos para o guaco (média de três repetições).

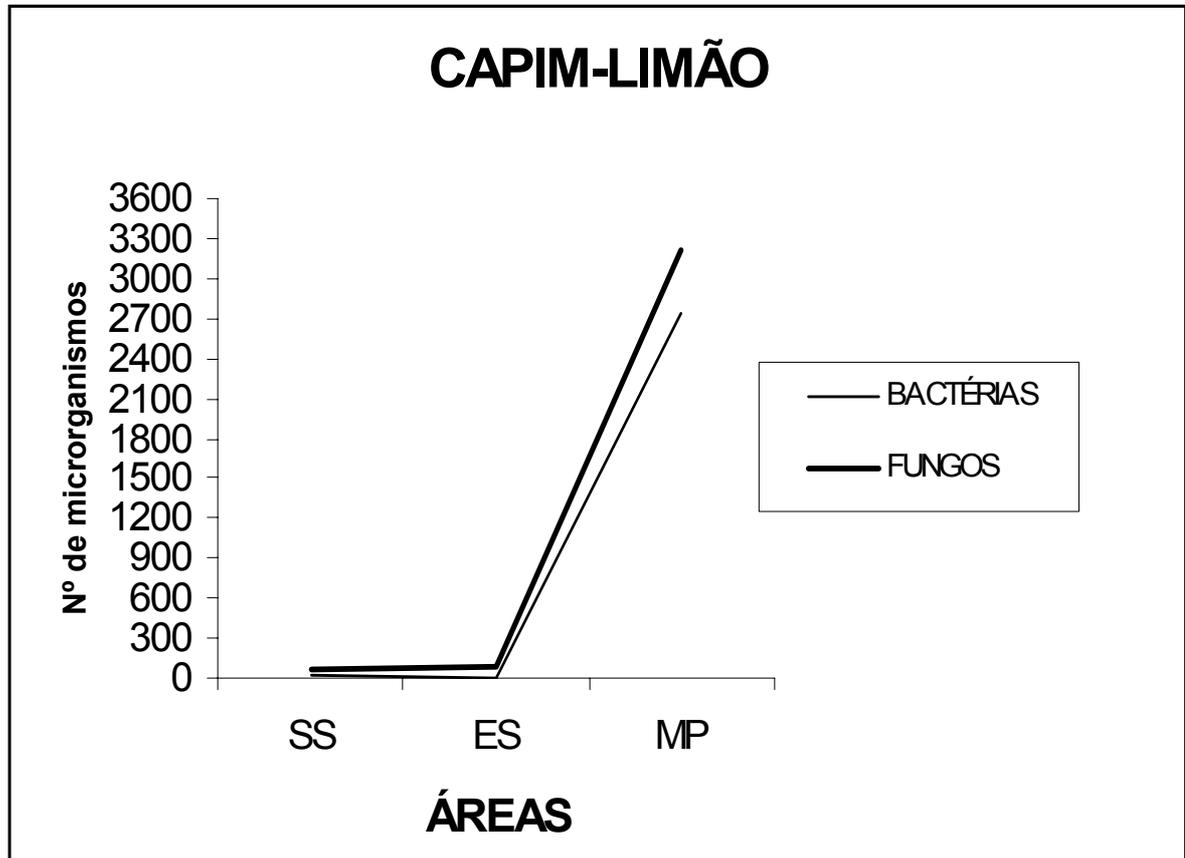


Unidade: UFC / cm² / semana

SS - Sala de seleção ES - Estufa de estabilização

MP - Sala de manipulação

FIGURA 3- Número de microrganismos nas diversas áreas de produção de fitoterápicos para o poejo (média de três repetições).



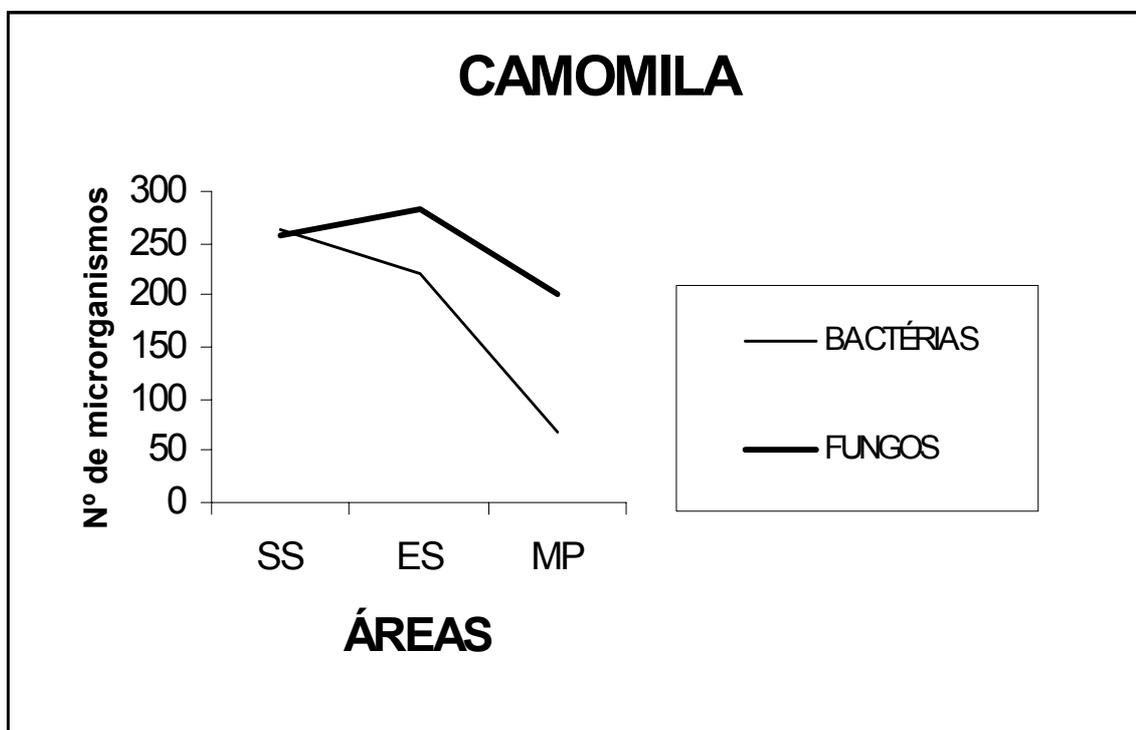
Unidade: UFC / cm² / semana

SS - Sala de seleção

ES - Estufa de estabilização

MP - Sala de manipulação

FIGURA 4- Número de microrganismos nas diversas áreas de produção de fitoterápicos para o capim-limão (média de três repetições).



Unidade: UFC / cm² / semana

SS - Sala de seleção ES - Estufa de estabilização

MP - Sala de manipulação

FIGURA 5- Número de microrganismos nas diversas áreas de produção de fitoterápicos para o camomila (média de três repetições).