

***Cordia verbenacea* DC e *Mikania* sp.: interferência no ensaio de controle da qualidade microbiológico**

Cordia verbenacea DC and *Mikania* sp.: interference in the microbiological quality control assay

Catarina Bernardes PEREIRA¹, Suelen de Castro FONSECA¹, Lorena Ferreira GOMES¹, Felipe Lipparelli TIRONI^{1,2}, Nilton L. NETTO JÚNIOR², Christopher William FAGG³, Luiz Alberto SIMEONI⁴, Pérola Oliveira MAGALHÃES¹, Dâmaris SILVEIRA¹, Yris Maria FONSECA-BAZZO¹

¹Laboratório de Controle da Qualidade, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF. CEP: 70910-900. Brasil. ²Núcleo de Farmácia Viva SES-DF, Avenida Sucupira S/Nº, Riacho Fundo-I, Brasília, DF. CEP: 71825-300. Brasil. ³Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília, DF. CEP: 72220-900. Brasil. ⁴Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF. CEP: 70910-900. Brasil. E-mail: yrisfonseca@hotmail.com

ABSTRACT

This study aims to evaluate the microbial contamination of *Mikania* sp. (plant drug, tincture and syrup) and *Cordia verbenacea* (plant drug, tincture and ointment). Furthermore, it had been investigated the possible interference caused by secondary metabolites from these species on proposed evaluation. The microbial contamination was determined using the pour plate method. The evaluation of the interference in the process of the microbiological quality was performed by determining the recovery of viable microorganisms using *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Candida albicans* (ATCC 90028). In the evaluation the microbiological quality, dried leaves from *C. verbenacea* and *Mikania* sp. showed 4.5×10^4 CFU/g and 2.08×10^4 CFU/g of bacteria, respectively. Regarding count of *C. verbenacea* tincture, was found 3.3×10^3 CFU/mL for yeasts and molds and 2.2×10^3 CFU/mL for bacteria. For the ointment containing *C. verbenacea* tincture was found 1.1×10^3 CFU/g of bacteria, while fungi were not detected. Regarding microbial contamination of the syrup was not observed growth of bacteria, molds and yeasts in any of repetitions. Also, derivatives from both species were able to inhibit the growth of strains of *E. coli* and *C. albicans*. Thus, the presence of secondary metabolites with antimicrobial activity on *C. verbenacea* and *Mikania* sp. seems to interfere in the evaluation of the microbiological quality of products derived from plant drug.

Key Words: guaco; erva baleeira; *Escherichia coli*; *Candida albicans*; microbiological techniques

RESUMO:

Este estudo visa avaliar a contaminação microbiana de *Mikania* sp. (droga vegetal, tintura e xarope) e *Cordia verbenacea* (droga vegetal, tintura e pomada). Além disso, foi investigada a possível interferência ocasionada pelos metabólitos secundários presentes nos dois derivados vegetais. A contaminação microbiana foi determinada seguindo o método de semeadura em profundidade. O estudo da interferência no método de avaliação da qualidade microbiológica foi realizado por determinação da recuperação de microrganismos viáveis, utilizando as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 90028). Na avaliação da qualidade microbiológica, as folhas secas oriundas de *C. verbenacea* e *Mikania* sp. apresentaram $4,5 \times 10^4$ UFC/g e $2,08 \times 10^4$ UFC/g de bactérias, respectivamente. Em relação à tintura de *C. verbenacea*, foi encontrada a contagem de $3,3 \times 10^3$ UFC/mL para bolores e leveduras e $2,2 \times 10^3$ UFC/mL para bactérias. Para a pomada contendo a tintura de *C. verbenacea* foram encontradas $1,1 \times 10^3$ UFC/g de bactérias, e não houve crescimento de fungos. No xarope não foi observado crescimento de bactérias, bolores e leveduras em nenhuma das repetições realizadas. Quanto à atividade antimicrobiana, os produtos derivados das duas espécies mostraram inibir o crescimento das cepas de *E. coli* e *C. albicans*. Assim, a presença de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana em *C. verbenacea* e *Mikania* sp. parece interferir na avaliação da qualidade microbiológica de produtos derivados da droga vegetal.

Palavras-Chave: guaco; erva baleeira; *Escherichia coli*; *Candida albicans*; técnicas microbiológicas.

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Cordia* pertencem à família Boraginaceae, e são encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, incluindo Ásia, África, Austrália, Guiana e Brasil (1, 2). Conhecida popularmente como baleeira, erva-baleeira e camarinha, ocorre, no Brasil, a partir da região Amazônica até o Rio Grande do Sul, preferencialmente a uma distância de 0,5 a 10 Km da costa (3, 4).

Estudos indicam que o extrato obtido das partes aéreas, principalmente das folhas da *Cordia verbenacea* tem atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante, dentre outras (5, 6). Tieli et al (2005) relataram a inibição da fosfolipase A₂ pelo ácido rosmarinico, presente no extrato metanólico desta planta (7). Os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, e antidepressivos do ácido rosmarinico também são relatados na literatura (8, 9). Há três partes da planta *C. verbenacea* em uso medicinal: folhas, hastes e raízes. Trata-se de um arbusto ramificado, ereto e aromático, com 1 a 2 metros de altura, suas folhas são tipicamente verrucosas, as flores pequenas e brancas e os frutos vermelhos quando maduros (10). É indicada para artrite, reumatismo e problemas osteoarticulares, sendo administrada na forma de chá. O uso tópico das folhas é indicado para fins anti-inflamatórios em forma de compressa, infusão ou pomada (11).

Em sua composição química podem ser identificados monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, flavonoides e ácidos graxos (11).

Conhecida popularmente como guaco, *Mikania* sp. pertence à família Asteraceae e o gênero possui 171 espécies, ocorrendo de norte a sul do Brasil, sendo encontrada principalmente em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (12, 13).

O uso de guaco como agente broncodilatador é de longa data. No Brasil colonial, o encontro das práticas de jesuítas e índios consta como difusor de vários conhecimentos acerca do tratamento de doenças, associando o uso de ervas a rituais indígenas (14). O guaco é usado por índios brasileiros para picada de cobras, gripes e resfriados (15). Outras propriedades do guaco ainda estão sendo estudadas. Segundo Amaral et al. (2003), o extrato hexânico de *Mikania glomerata* contém substâncias antimicrobianas (16). Reforçando esta ideia, Duarte et al. (2005) constataram que o óleo essencial de *M. glomerata* apresentou grande atividade contra *Candida albicans* (17).

O Governo do Distrito Federal conta com o programa de Farmácia Viva situado no Riacho Fundo I, o qual distribui medicamentos fitoterápicos com retenção de receita a 21 unidades de atenção à saúde. Dentre as plantas medicinais utilizadas para preparo de medica-

mentos na Farmácia Viva do DF estão *C. verbenacea* e *Mikania* sp. O xarope contendo extrato *Mikania* sp. é prescrito com a indicação de expectorante e broncodilatador (18, 19). Quanto à pomada de *C. verbenacea* é prescrita como anti-inflamatório em caso de dores associadas a músculos e tendões (20).

Devido ao fato de os produtos vegetais estarem em contato direto com o solo rico em microrganismos, patas de insetos e animais, o controle da qualidade microbiológico de plantas medicinais apresenta grande relevância (21). Este tipo de contaminação pode acarretar deterioração do material e causar o desenvolvimento de doenças nos usuários. Assim, é preciso garantir a qualidade e segurança deste tipo de produto desde a coleta, armazenamento e manipulação até o produto final (22).

Um passo importante durante o controle microbiológico de plantas medicinais é a remoção ou neutralização da atividade antimicrobiana da amostra. A Farmacopeia Brasileira 5ª edição preconiza que deve ser demonstrada a eliminação de qualquer propriedade antimicrobiana da amostra teste antes da verificação da existência de contaminação microbiana. Esse protocolo requer o uso de microrganismos para o teste de recuperação microbiana. Caso haja interferência da amostra na determinação da contaminação microbiana, alguns procedimentos podem ser executados, tais como: maior diluição da amostra teste, incorporação de um agente neutralizante específico ou agente neutralizante universal ou utilização da metodologia por filtração em membrana (23).

O objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação microbiana, presença de bactérias e fungos, na pomada contendo tintura de *C. verbenacea* e no xarope contendo tintura de *Mikania* sp., ambos distribuídos pelo programa de Farmácia Viva do Distrito Federal. Além disso, avaliar a contaminação microbiana das folhas secas e tinturas de guaco e erva baleeira, usadas como matéria-prima para o preparo do xarope e pomada, respectivamente. E ainda, investigar a inibição do efeito antimicrobiano de metabólitos secundários presentes na *C. verbenacea* e *Mikania* sp., de forma a verificar possíveis interferências com teste de controle microbiológico.

MATERIAL E MÉTODO

Matéria-prima

Folhas de *C. verbenacea* foram coletadas no horto do Núcleo de Farmácia Viva, localizado na cidade satélite de Riacho Fundo I, DF, Brasil. A coleta e a secagem foram realizadas em agosto de 2012. Folhas de *Mikania* sp. foram coletadas na penitenciária Papuda, em Brasília, DF, Brasil. As espécies foram identificadas por comparação com amostras depositadas no Herbário

da Universidade de Brasília pelo número de vouchers Fagg CW 2240 e Fagg CW 2237, para *Mikania* sp. e *C. verbenacea*, respectivamente.

O material vegetal *in natura* foi seco em estufa a temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa de 60% por cinco dias. A amostragem foi efetuada por quarteamento como descrito para lotes menores de 10 Kg de folhas (23). A trituração em moinho trifásico de lâminas só foi realizada após a secagem completa da planta.

Derivado vegetal

A tintura de *C. verbenacea* foi preparada seguindo a técnica de preparo da tintura 50%, por meio de maceração da droga vegetal pulverizada com álcool 70° GL por duas horas e posteriormente percolada na velocidade de 60 a 100 gotas por minuto (3 a 5 mL/min).

A tintura de *Mikania* sp. a 20% foi obtida por percolação da droga vegetal com álcool de cereais neutro a 70° GL (20).

Produto acabado

O xarope contendo 10% de tintura de *Mikania* sp. foi preparado utilizando xarope simples como veículo. A pomada de *C. verbenacea* foi preparada com pomada de lanolina e vaselina contendo 10% de tintura de *C. verbenacea* (20).

Contagem do número total de microrganismos mesofílicos

Foi avaliada a presença de bactérias e bolores e leveduras, nas folhas secas e tinturas de *C. verbenacea* e *Mikania* sp., na pomada contendo tintura de erva baleeira e no xarope contendo tintura de guaco. Para tanto, foi empregado o método de semeadura em profundidade (23). Este teste consiste na contagem da população de microrganismos que apresentam crescimento visível, em até 5 dias, em ágar caseína-soja a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e em até 7 dias, em ágar sabouraud-dextrose a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

As diferentes amostras de tintura, xarope e pomada foram preparadas por diluição de 10 g (pomada) ou 10 mL (xarope e tinturas) em 90 mL de solução salina 0,9% contendo 1% de polissorbato 80. Em seguida, diluições seriadas foram preparadas com o mesmo diluente.

As amostras de folhas secas foram preparadas por diluição de 2g para 98 mL de solução salina 0,9%, em seguida as diluições seriadas foram preparadas com o mesmo diluente.

As três últimas diluições seriadas foram inoculadas pelo método em profundidade para avaliação da presença de bactérias, utilizando ágar caseína-soja e de bolores e leveduras, utilizando ágar sabouraud-dextrose. Assim, 1 mL da amostra preparada como descrito anteriormente, foi dispensado em placa de petri estéril e cerca de 20 mL de ágar caseína-soja ou ágar sabouraud-dextrose foram vertidos e homogeneizados. As placas,

após solidificação do ágar, foram mantidas a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ em até 5 dias para ágar caseína-soja e a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ em até 7 dias, para ágar sabouraud-dextrose. Para cada diluição testada foram utilizadas três placas para cada meio de cultura. Somente as placas que apresentaram número de colônias inferior a 250 (bactérias) e 50 (bolores e leveduras) por placa foram consideradas para o registro dos resultados. Foi calculada a média aritmética das placas de cada meio e o número de UFC por grama ou mililitro do produto.

Com esse teste é possível determinar o número total de bactérias mesófilas e bolores e leveduras em produtos e matérias-primas não estéreis e é aplicado para determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas das agências de regulação sanitária.

Inibição do efeito antimicrobiano de metabólitos secundários

É preconizado em Compêndios oficiais que se a amostra possui atividade antimicrobiana, essa deve ser convenientemente removida ou neutralizada, antes da análise microbiológica (23). *Cordia verbenacea* tem mostrado atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (24). De forma semelhante, *Mikania* sp. apresenta atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli* (16, 25). Assim, a inibição do efeito antimicrobiano produzido por metabólitos secundários deve ser estabelecida, evitando os resultados falso-negativos, durante a avaliação da qualidade microbiológica destas drogas vegetais ou seus derivados.

Essa interferência foi avaliada por inoculação de microrganismos-teste na amostra. Foi verificada a capacidade de detectar microrganismos na presença e na ausência da amostra. A porcentagem de recuperação dos microrganismos foi estabelecida pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de UFC no grupo contendo amostra teste}}{\text{n}^{\circ} \text{ de UFC no grupo controle}} \times 100.$$

Onde:

UFC = unidade formadora de colônias.

Os microrganismos utilizados para o teste de inibição do efeito antimicrobiano dos metabólitos secundários foram *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 90028).

Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram ágar caseína-soja (Himedia Laboratories, Índia) para análise de bactérias e ágar sabouraud-dextrose (Himedia Laboratories, Índia) para análise de bolores e leveduras.

Obtenção dos inóculos

Os microrganismos foram descongelados e colocados em meio de cultura líquido por 24h e, posteriormente, repicados para crescimento em tubo inclinado. O inóculo viável para realização do procedimento foi de quarta geração.

O inóculo de *E. coli* foi preparado a partir de uma suspensão bacteriana em tampão fosfato pH 6,0. Para determinar sua concentração foi utilizado o padrão de turbidez do sulfato de bário (0,5 da escala de MacFarland), onde a turbidez foi comparada em espectrofotômetro (625 nm). Assim, o resultado da absorbância deveria estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (26).

O inóculo de *C. albicans* foi preparado a partir da suspensão de colônias em solução salina estéril 0,9%. Para determinar a concentração do inóculo, foi utilizado o padrão de turbidez do BaSO_4 (0,5 da escala de MacFarland), onde a turbidez foi comparada em espectrofotômetro (530 nm). Assim, o resultado da absorbância deveria estar entre 0,12 e 0,15, o que equivale a $1,0-5,0 \times 10^6$ UFC/mL (26).

Inoculação das amostras

Folhas secas:

Grupo 1: Folhas secas de *Mikania* sp. + *E. coli*,

Grupo 2: Folhas secas de *Mikania* sp. + *C. albicans*,

Grupo 3: Folhas secas de *C. verbenacea* + *E. coli* **Grupo**

Grupo 4: Folhas secas de *C. verbenacea* + *C. albicans*.

Para inoculação das diferentes amostras-teste foi adicionado 1 mL de inóculo de *E. coli* na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL ou 1 mL de inóculo de *C. albicans* na concentração de $1,0-5,0 \times 10^6$ UFC/mL, a 2 g de droga vegetal (folhas de *Mikania* sp. ou *C. verbenacea*), em frasco erlenmeyer contendo 97 mL de solução salina (0,9%). Em seguida, diluições seriadas foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,9%) até obter uma concentração de $1,0-5,0 \times 10^2$ UFC/mL para *E. coli* ou $1,0-5,0 \times 10^1$ UFC/mL para *C. albicans*. O procedimento foi realizado em triplicata.

Tintura:

Grupo 5: Tintura de *Mikania* sp. + *E. coli*,

Grupo 6: Tintura de *Mikania* sp. + *C. albicans*,

Grupo 7: Tintura de *C. verbenacea* + *E. coli*

Grupo 8: Tintura de *C. verbenacea* + *C. albicans*.

Para inoculação das diferentes amostras teste foi adicionado 1 mL de inóculo de *E. coli* na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL ou 1 mL de inóculo de *C. albicans* na concentração de $1,0-5,0 \times 10^6$ UFC/mL, a 10 mL de tintura de *C. verbenacea* ou *Mikania* sp., em frasco erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (0,9%). Em seguida, diluições seriadas foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,9%) até obter

uma concentração de $1,0-5,0 \times 10^2$ UFC/mL para *E. coli* ou $1,0-5,0 \times 10^1$ UFC/mL para *C. albicans*. O procedimento foi realizado em triplicata.

Controles:

Grupo 9: Controle positivo *E. coli*,

Grupo 10: Controle positivo *C. albicans*,

Grupo 11: Controle negativo etanol

Grupo 12: Controle negativo do meio (Controle de contaminação).

O inóculo de *E. coli*, 1 mL, na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL ou 1 mL de inóculo de *C. albicans* na concentração de $1,0-5,0 \times 10^6$ UFC/mL foi adicionado em frasco erlenmeyer contendo 99 mL de solução salina (0,9%). Em seguida, diluições seriadas foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,9%) até obter uma concentração de $1,0-5,0 \times 10^2$ UFC/mL para *E. coli* ou $1,0-5,0 \times 10^1$ UFC/mL para *C. albicans*. O procedimento foi realizado em triplicata.

Foi preparado um grupo controle do álcool presente na tintura. Para isto, 1 mL da suspensão microbiana foi adicionado a 10 mL de álcool 50% e 89 mL de solução salina. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas na proporção de 1:9 para obter concentração final de $1,0-5,0 \times 10^2$ UFC/mL para *E. coli*.

As duas últimas diluições de cada série de diluição dos diferentes grupos foram inoculadas pelo método em profundidade. Somente as placas que apresentaram número de colônias inferior a 250 (bactérias) e 50 (bolores e leveduras) por placa foram consideradas para o registro dos resultados. Foi calculada a média aritmética das placas de cada meio e o número de UFC por grama ou mililitro do produto.

Análise estatística

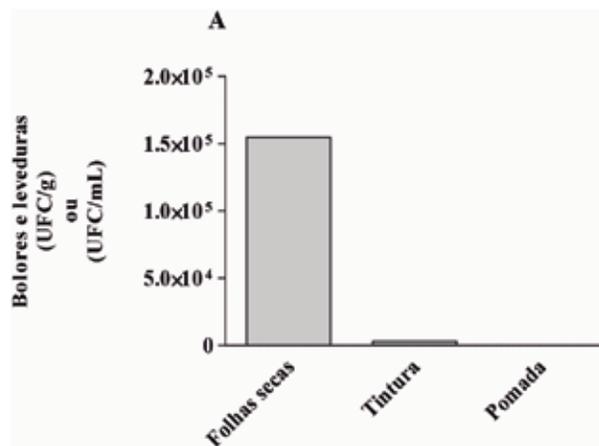
A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPadPrism® (versão 3.0, 1999). Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido de *t*-teste. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem do número total de microrganismos mesofílicos

Foram encontradas, nas folhas secas de *C. verbenacea*, $4,5 \times 10^4$ UFC/g de bactérias e $1,5 \times 10^5$ UFC/g de fungos (Figura 1 A e B). Os limites oficiais são de 10^5 UFC/g de bactérias e 10^3 UFC/g de fungos para drogas vegetais submetidas a processos extrativos a frio (23).

Em relação à tintura de *C. verbenácea*, foi encontrada a contagem de $3,3 \times 10^3$ UFC/mL de bolores e leveduras e $2,2 \times 10^3$ UFC/mL de bactérias (Figura 1 A e B). Os limites oficiais são de 10^4 UFC/mL de bactérias e 10^3 UFC/mL de fungos para tinturas (23).



Para a pomada contendo a tintura de *C. verbenacea* foi encontrado um total de $1,1 \times 10^3$ UFC/g de bactérias, mas não houve crescimento de fungos (Figura 1 A e B). Os limites estabelecidos são de 10^2 UFC/g de bactérias e 10^1 UFC/g de fungos para preparações de uso tópico.

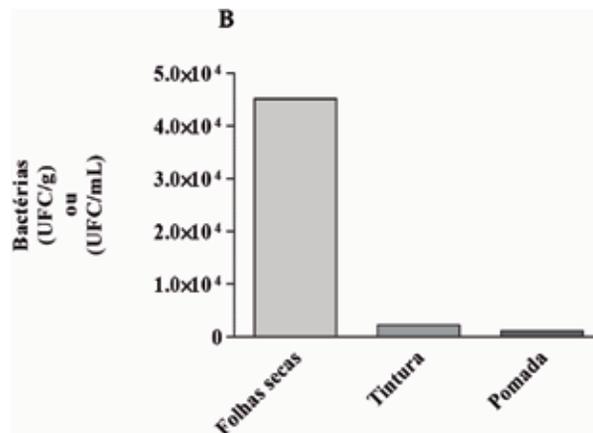


Figura 1. Contaminação microbiana encontrada nas folhas secas, tintura e pomada contendo *Cordia verbenacea*. A: contagem de bolores e leveduras e B: contagem de bactérias.

Em relação à contaminação microbiana das folhas secas de *Mikania* sp. foi observado que os resultados da contagem de bactérias, bolores e leveduras estão de acordo com os limites estabelecidos oficialmente.

Foram encontradas, nas folhas secas de *Mikania* sp., $2,08 \times 10^4$ UFC/g de bactérias e $8,75 \times 10^3$ UFC/g de fungos (Figura 2).

Quanto à contaminação microbiana da tintura e xarope de *Mikania* sp., não foi observado crescimento de bactérias, bolores e leveduras em qualquer das repetições realizadas. Isto pode ter ocorrido por dois motivos: 1) os produtos estavam isentos de contaminação; 2) houve interferência do produto na determinação da contaminação microbiana; e neste caso, a tintura pode conter substâncias antimicrobianas que impeçam o crescimento dos microrganismos, o que não ocorreu com as folhas secas, devido à ausência de extração das substâncias ativas. O mesmo ocorreu com o xarope, pois o mesmo contém a tintura e o xarope *per se* apresenta atividade bacteriostática.

Os limites oficiais para tintura seriam de 10^4 UFC/mL de bactérias e 10^3 UFC/mL de fungos. E para preparações de uso oral (xarope) contendo matéria-prima de origem vegetal de 10^4 UFC/mL de bactérias e 10^2 UFC/mL de fungos (23).

Inibição do efeito antimicrobiano de metabólitos secundários

O ensaio de inibição do efeito antimicrobiano é geralmente executado em produtos que contenham conservantes químicos. O teste é extremamente importante em

fitoterápicos, pois muitos metabólitos secundários apresentam atividade antimicrobiana. Portanto, esta propriedade pode interferir nos resultados dos testes de controle da qualidade microbiológica.

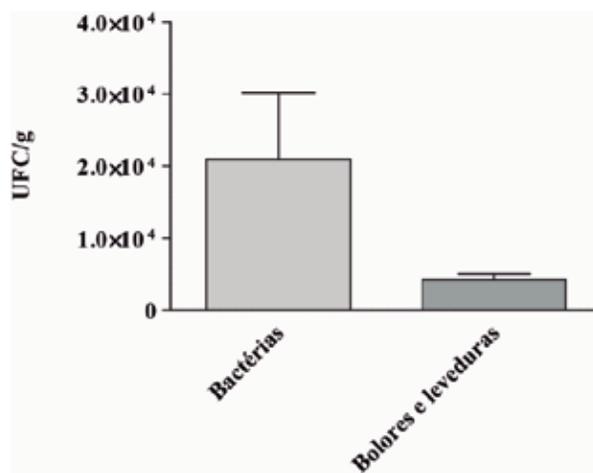


Figura 2. Contaminação microbiana encontrada nas folhas secas de *Mikania* sp

Foi avaliada esta interferência por inoculação de microrganismos teste na amostra, e verificada o número de microrganismos viáveis totais recuperadas na presença e na ausência da amostra.

Primeiramente foi avaliada a interferência da matéria-prima, folhas secas de *Mikania* sp., utilizando os microrganismos, *E. coli* e *C. albicans*. Na avaliação da interferência utilizando *E. coli*, foi verificado que não

houve interferência das folhas secas de *Mikania* sp. (Grupo 1) na recuperação dos microrganismos, sendo alcançada uma recuperação 95,57%. A contagem no grupo contendo *E. coli* (Grupo 9) foi de $5,42 \times 10^4$ UFC/g e no grupo contendo *E. coli* + folhas de *Mikania* sp. (Grupo 1) de $5,18 \times 10^4$ UFC/g. Na avaliação da interferência utilizando *C. albicans* (Grupo 2) houve um valor elevado de recuperação 172,55%. A contagem no grupo contendo *C. albicans* (Grupo 10) foi de $1,02 \times 10^4$ UFC/g e no grupo contendo *C. albicans* + folhas de *Mikania* sp. (Grupo 2) de $1,76 \times 10^4$ UFC/g (Figura 3A). O valor de recuperação tão elevado pode ser devido à contaminação presente nas folhas de *Mikania* sp. antes da inoculação de *C. albicans*.

Foi avaliada ainda a interferência da matéria-prima, folhas secas de *C. verbenacea*, utilizando os microrganismos *E. coli* e *C. albicans*. Foi constatado que neste ensaio não houve interferência das folhas secas de *C. verbenacea* (Grupo 3 e 4) na recuperação dos microrganismos, sendo alcançada uma recuperação 116,72% e 94,34% para *E. coli* e *C. albicans*, respectivamente. A contagem no grupo controle positivo contendo *E. coli* (Grupo 9), foi de $5,14 \times 10^6$ UFC/g; e no grupo contendo *E. coli* + folhas de *C. verbenacea*, de $6,0 \times 10^6$ UFC/g (Grupo 3). A contagem no grupo contendo *C. albicans* foi de $1,06 \times 10^5$ UFC/g (Grupo 10) e no grupo contendo *C. albicans* + folhas de *C. verbenacea* (Grupo 4), de $1,06 \times 10^5$ UFC/g (Figura 3B).

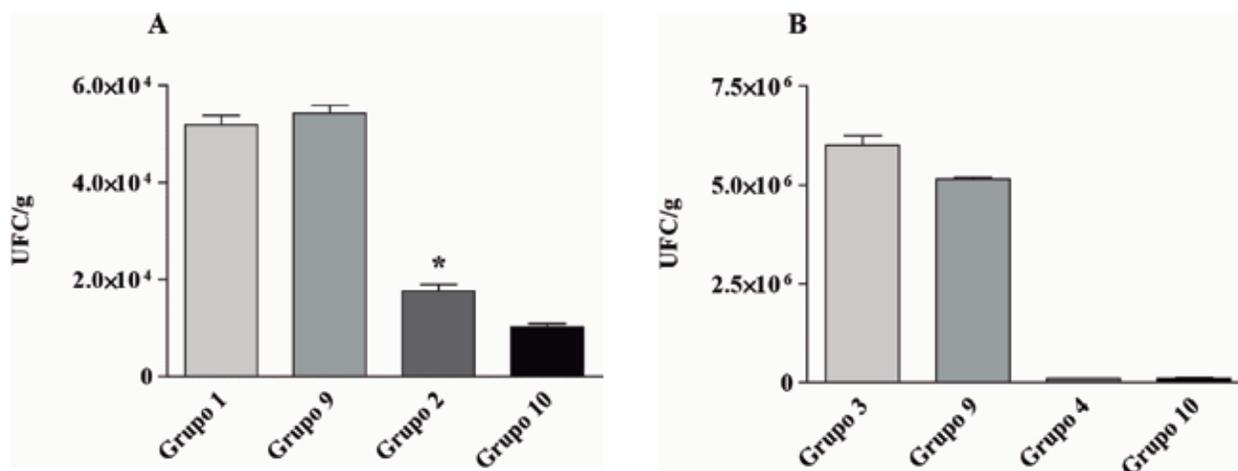


Figura 3. Interferência das folhas secas de *Cordia verbenacea* e *Mikania* sp. na recuperação de microrganismos *Candida albicans* e *Escherichia coli*. A: folhas secas de *Mikania* sp.. B: folhas secas de *C. verbenacea*. *p<0,05 vs controle positivo (Grupo 10), pelo test-t. Grupo 1: Folhas secas de *Mikania* sp.+ *E. coli*; Grupo 2: Folhas secas de *Mikania* sp. + *C. albicans*; Grupo 3: Folhas secas de *C. verbenacea* + *E. coli*; Grupo 4: Folhas secas de *C. verbenacea* + *C. albicans*; Grupo 9: Controle positivo *E. coli*; Grupo 10: Controle positivo *C. albicans*.

Os resultados sugerem a ausência de interferência do efeito antimicrobiano na determinação da qualidade microbiana das folhas secas de *C. verbenacea* e *Mikania* sp., em relação às estirpes microbianas estudadas. No entanto, é necessário verificar esta interferência contra outras estirpes de microrganismos.

Da mesma forma, a interferência do derivado vegetal, tintura de *Mikania* sp., foi determinada utilizando os microrganismos, *E. coli* e *C. albicans*. Na avaliação da interferência utilizando *E. coli* foi verificado que parece haver interferência da tintura na recuperação dos microrganismos, sendo alcançada uma recuperação 74,58% (Grupo 5). A contagem no grupo contendo *E. coli* foi de $1,18 \times 10^4$ UFC/mL (Grupo 9) e no grupo contendo *E. coli* + tintura de $0,88 \times 10^4$ UFC/mL (Grupo

5). Na avaliação da interferência utilizando *C. albicans* também foi observada uma baixa recuperação, de 74,0% (Grupo 6). A contagem no grupo contendo *C. albicans* foi de $1,50 \times 10^4$ UFC/mL (Grupo 10) e no grupo contendo *C. albicans* + tintura de $1,11 \times 10^4$ UFC/mL (Grupo 6) (Figura 4A).

Foi avaliada a interferência do derivado vegetal, tintura de *C. verbenacea*, utilizando o microrganismo *E. coli*. Parece haver interferência da tintura na recuperação dos microrganismos, sendo alcançada uma recuperação de apenas 75,95% (Grupo 7). A contagem no grupo contendo *E. coli* foi de $1,32 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo 9) e no grupo contendo *E. coli* + tintura de $1,00 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo 7) (Figura 4B).

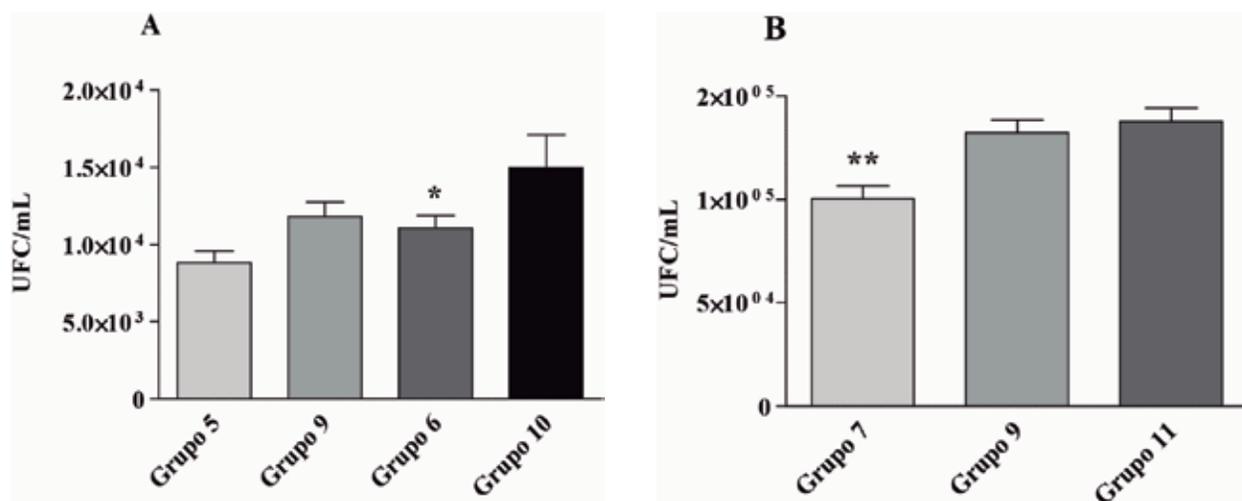


Figura 4. Interferência da tintura de *Cordia verbenacea* e *Mikania* sp. na recuperação de *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A: tintura de *Mikania* sp.. B: tintura de *C. verbenacea*. * $p < 0,05$ vs controle positivo (Grupo 10), pelo test-*t*. ** $p < 0,05$ vs controle positivo (Grupo 9), pelo test-*t*. Grupo 5: Tintura de *Mikania* sp. + *E. coli*; Grupo 6: Tintura de *Mikania* sp. + *C. albicans*; Grupo 7: Tintura de *C. verbenacea* + *E. coli*; Grupo 8: Tintura de *C. verbenacea* + *C. albicans*; Grupo 9: Controle positivo *E. coli*; Grupo 10: Controle positivo *C. albicans*; Grupo 11: Controle negativo etanol.

Estes baixos valores de recuperação poderiam ser explicados pela interferência etanol presente na tintura. Soluções hidroalcoólicas possuem atividade antimicrobiana em concentrações mais elevadas. Contudo, foi testada a interferência do etanol nos ensaios realizados neste trabalho na mesma concentração presente nas amostras testadas. Observamos que no grupo controle etanol + *E. coli* (Grupo 11) foi encontrada boa recuperação de 104,16%, sendo a contagem de $1,38 \times 10^5$ UFC/mL, descartando esta hipótese (Figura 4B). Assim, acredita-se que a interferência seja devida aos metabólitos secundários presentes nas tinturas que impedem o crescimento dos microrganismos e não etanol.

A mesma interferência não ocorre com as folhas secas, possivelmente devido a não extração destes metabólitos secundários. No ensaio de avaliação da contaminação microbiana nas folhas secas de ambas as espécies, foi utilizada solução salina 0,9% como solvente de diluição das amostras. Entretanto, para o preparo das tinturas foi utilizado etanol 70° GL, o qual pode apresentar um poder extrator de metabólitos secundários maior que a solução salina 0,9%. Desta forma, mesmo que *Mikania* sp e *C. verbenacea* apresentem atividade antimicrobiana descrita por diversos estudos (6, 16, 25), é preciso que os metabólitos secundários sejam adequadamente extraídos dos tecidos das folhas para que possam exercer o efeito descrito. Assim, se não houve extração dos metabólitos secundários no ensaio de contaminação das folhas secas, não poderia haver interferência destes.

CONCLUSÃO:

A atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de *C. verbenacea* e *M. glomerata* podem interferir na avaliação da qualidade microbiológica destes produtos derivados devido à extração de compostos com propriedade antimicrobiana.

Considerando a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de *C. verbenacea* e *Mikania* sp., os resultados de uma análise visando comprovar a qualidade microbiológica podem gerar dúvidas. Se compostos presentes na matéria vegetal são capazes de interferir na avaliação da qualidade microbiológica dos derivados vegetais obtidos, a ocorrência de uma contaminação pode não ser detectada. Assim a interferência precisa ser eliminada antes da análise da qualidade microbiológica destas matérias-primas e produtos acabados.

Ambas as espécies são utilizadas tanto por Farmácias Vivas quanto por indústrias farmacêuticas, e estes resultados evidenciam a importância da validação de métodos de determinação da qualidade microbiana de produtos de origem vegetal. Ainda, parece não ser possível padronizar um único método a ser utilizado para diferentes drogas vegetais, considerando que a natureza dos compostos presentes é diversa, tanto quanto a capacidade de interferir na análise.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desen-

volvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação-UnB (DPP/UnB) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

REFERÊNCIAS

- Rapisarda A, Iauk L, Ragusa S. Micromorphological study on leaves of some *Cordia* (Boraginaceae) species used in traditional medicine. *Econ Bot.* 1997;51(4):385-391.
- Ficarra R, Ficarra P, Tommasini S, Calabro M, Ragusa S, Barbera R, et al. Leaf extracts of some *Cordia* species: analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. *Farmacol.* 1995;50(4):245-256.
- Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Medicinais no Brasil*. Odessa. 2002.
- Angely J. *Flora Analítica e Fitogeográfica do Estado de São Paulo*. São Paulo. 1970.
- Sertié JA, Basile AC, Panizza S, Matida AK, Zelnik R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. *Planta Med.* 1988;54(1):7-10.
- Michelin EM, Salvador AA, Riehl CA, Smânia Jr A, Smânia EF, Ferreira SR. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresour Technol.* 2009;100(24):6615-23.
- Ticli FK, Hage LI, Cambraia RS, Pereira PS, Magro ÂJ, Fontes MR, et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicol.* 2005;46(3):318-27.
- Shetty K. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiaceae. *Asia Pac J Clin Nutr.* 1997;6:162-71.
- Cervellati R, Renzulli C, Guerra MC, Speroni E. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. *J Agr Food Chem.* 2002;50(26):7504-9.
- Silva Júnior A, Vizzoto V, Giorgi E, Macedo S, Marques L. *Plantas medicinais; caracterização e cultivo*. EPAGRI [Internet]. 1995; 71.
- Gilbert B, Favoreto R. *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. *Rev Fitos.* 2012;7(1).
- Oliveira F. Contribuição para o estudo botânico de *Mikania hirsutissima* DC. var. *hirsutissima*. II. Morfologia externa e anatomia da folha, flor, fruto e semente. *Rev Farm Bioquim.* 1972; 10(1):15-36.
- Budel JM, Duarte MR, Kosciuv I, Morais TBd, Ferrari LP. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;19:545-52.
- Fernandes TMD. *Plantas medicinais: memória da ciência no Brasil*. Fiocruz; 2004.
- Napimoga MH, Yatsuda R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62(7):809-20.
- Amaral R, Arcenio Neto F, Carvalho E, Teixeira L, Araújo G, Sharapin N, et al. Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Bras Farmacogn.* 2003;13:24-7.
- Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):305-11.
- BRASIL. Portaria GM/MS n. 533. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Ministério da Saúde. Brasília. 2012.
- Moura RS, Costa S, Jansen J, Silva C, Lopes C, Bernardo Filho M, et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea pig trachea. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54(2):249-56.
- BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 2011. p. 126.
- Rocha LO, Soares MMSR, Corrêa CL. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. *Rev Bras Cien Farmac.* 2004;40(4):521-527.
- Kneifel W, Czech E, Kopp B. Microbial contamination of medicinal plants-a review. *Planta Med.* 2002;68(01):5-15.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5 ed 2010.
- Matias EF, Santos KK, Almeida TS, Costa JG, Coutinho HD. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. *Rev Bras Bioci.* 2010;8(3):294-298.
- Pessini G, Holetz F, Sanches N, Cortez D, Dias Filho B, Nakamura C. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn.* 2003;13(1):21-24.
- NCCSL. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard: NCCLS document M7-A6. 6 ed. Pennsylvania. : NCCLS; 2003.