



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

LUANA ROSSI DE CARVALHO DOS SANTOS

**CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO E DA DROGA
VEGETAL DAS FOLHAS DE *Psidium guajava* L.**

BRASÍLIA

2023

LUANA ROSSI DE CARVALHO DOS SANTOS

**CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO E DA DROGA
VEGETAL DAS FOLHAS DE *Psidium guajava* L.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Ciências em
Saúde da Universidade de Brasília, com o
requisito para o título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador (a): Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Coorientador (a): Profa. Dra. Paula Monteiro de Souza

BRASÍLIA

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Agradeço primeiramente a esta universidade, seu corpo docente, direção e administração, por proporcionarem um ambiente acadêmico propício ao aprendizado e ao desenvolvimento de pesquisas.

À minha orientadora, Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, e à coorientadora, Dra. Paula Monteiro de Souza, meu sincero agradecimento pelo suporte, orientação e correções ao longo do processo. Vocês foram fundamentais para o sucesso deste trabalho em tão pouco tempo.

Agradeço a Deus por ter me concedido saúde e força para superar as dificuldades ao longo dessa jornada acadêmica.

Minha gratidão especial à minha mãe, Lucélia Rossi, uma verdadeira heroína, que me ofereceu apoio incondicional, incentivo e força nos momentos difíceis, de desânimo e cansaço. Sem você, nada disso seria possível.

Ao meu namorado, Victor Barboza, agradeço por todo o amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu avô, padrasto e irmã, meu profundo agradecimento por sempre estarem presentes, oferecendo palavras de encorajamento, força e apoio ao longo dessa jornada.

Não poderia deixar de mencionar minha amiga Beatriz, companheira de trabalho e irmã na amizade, que fez parte da minha formação e continuará presente em minha vida. Seu apoio e companheirismo foram inestimáveis.

Agradeço a todos os meus familiares, parentes e amigos que, com seu incentivo constante, contribuíram para que eu pudesse concluir meu curso e iniciar uma nova carreira.

Mais uma vez, meu sincero agradecimento a todos que estiveram ao meu lado nessa jornada. Sou imensamente grata por todo o apoio, incentivo e carinho recebidos. Vocês fizeram a diferença em minha vida acadêmica e pessoal.

RESUMO

As plantas medicinais apresentam destaque na terapêutica popular. Entretanto, seu uso pode representar um risco potencial à saúde. Por serem oriundas de ambientes naturais e comercializadas na forma não estéril, há uma preocupação das autoridades sanitárias quanto a qualidade de drogas vegetais, devido ao alto potencial de contaminação microbiana. Dentro desse contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o controle microbiológico do extrato aquoso e da droga vegetal das folhas de *Psidium Guajava L.* Para a avaliação qualitativa e quantitativa da qualidade microbiológica, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) de bactérias e fungos e identificação dos microrganismos patogênicos, segundo a metodologia preconizada pela 6ª edição da Farmacopeia Brasileira, 2019. Neste estudo não foi observado crescimento de bactérias mesófilas, acima do limite, e presença de patógenos. No entanto, é fundamental expandir esses requisitos para outras plantas medicinais e estabelecer diretrizes mais abrangentes para garantir a qualidade e segurança desses produtos tão importantes para a saúde pública.

Palavras-chave: Farmacopeia Brasileira; Controle de Qualidade; droga vegetal; patógenos; plantas medicinais.

ABSTRACT

Medicinal plants play a prominent role in popular therapy. However, their use can pose a potential health risk. As they originate from natural environments and are commercially sold in a non-sterile form, health authorities are concerned about the quality of herbal drugs due to the high potential for microbial contamination. Within this context, this study aims to evaluate the microbiological control of the aqueous extract and plant material from *Psidium Guajava L.* leaves. For qualitative and quantitative assessment of microbiological quality, the colony-forming units (CFU/g) of bacteria and fungi were counted, and the identified pathogenic microorganisms were detected using the methodology recommended by the Brazilian Pharmacopoeia 6th edition, 2019. In this study, no growth of mesophilic bacteria above the limit or presence of pathogens was observed. However, it is essential to expand these requirements to other medicinal plants and establish more comprehensive guidelines to ensure the quality and safety of these products, which are crucial for public health.

Keywords: Brazilian Pharmacopoeia; Quality Control; herbal drugs; pathogens; medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Psidium guajava</i> L. (folhas, flores e frutos) (27).	16
Figura 2. Esquema geral para contagem de número total de microrganismos mesófilos.....	22
Figura 3. Esquema geral para o teste de ausência de Bactérias gram-negativas bile tolerantes.....	24
Figura 4. Esquema geral empregado para pesquisa da <i>Escherichia coli</i>	25
Figura 5. Esquema geral empregado para pesquisa da <i>Salmonella</i>	27
Figura 6. Resultado da droga vegetal em ágar caseína após 5 dias a 35 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.....	31
Figura 7. Resultado do extrato aquoso em ágar caseína após 5 dias a 35 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.....	32
Figura 8. Resultado da droga vegetal em ágar Sabouraud após 7 dias a 25 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.....	33
Figura 9. Resultado do extrato aquoso em ágar Sabouraud após 7 dias a 25 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.....	34
Figura 10. Resultado da droga vegetal em Ágar violeta vermelho neutro glicose e incubadas a 35 °C por 24 horas. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.....	35
Figura 11. Resultado da droga vegetal em Ágar MacConkey e incubadas a 35 °C por 24 horas.....	36
Figura 12. Resultado do extrato em Ágar MacConkey e incubadas a 35 °C por 24 horas.....	36
Figura 13. Resultado da droga vegetal em Ágar xilose lisina desoxicolato e incubadas a 35 °C por 24 horas.....	37
Figura 14. Resultado do extrato aquoso em Ágar xilose lisina desoxicolato e incubadas a 35 °C por 24 horas.....	37
Figura 15. Resultado das placas controles de todos os meios.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites Microbianos para produtos não estéreis não submetido a tratamento.....	14
Tabela 2. Exemplo de cálculo do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g)	21
Tabela 3. Resultado da contagem de colônias dos microrganismos mesófilos.....	30
Tabela 4. Resultado do cálculo do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
SUS	Sistema Único de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Controle de qualidade e Legislação	12
2.2. Controle de qualidade microbiológico.....	13
2.3. <i>Pisidium guajava</i> L.....	14
2.4. Microrganismos patogênicos	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Obtenção da droga vegetal	19
4.2. Obtenção do extrato aquoso.....	19
4.3. Rendimentos extrativos.....	20
4.4. Controle de qualidade microbiológico.....	20
4.4.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos.....	20
4.4.2. Pesquisa de microrganismos patogênicos.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Rendimentos extrativos.....	29
5.2. Controle de qualidade microbiológico.....	29
5.2.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos.....	29
5.2.2. Pesquisa de microrganismos patogênicos.....	35

6. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde refere que 65 a 80% da população mundial busca fins terapêuticos nas plantas, seja por motivo de pobreza ou precariedade no sistema de saúde (1). O Brasil é um país que se destaca por apresentar a maior biodiversidade de plantas superiores conhecidas no planeta. Em meio a essa grande variedade de riquezas naturais, encontramos a goiabeira *Psidium guajava* L., uma árvore da família das *Mirtáceas*, do gênero *Psidium* e que pode ser utilizada tanto no seu estado *in natura* como pela indústria (2).

As plantas do gênero *Psidium* são utilizadas pela população como agentes anti-infecciosos, através das preparações de chás das folhas da goiabeira de polpa vermelha (*Psidium guajava*). Na medicina popular é utilizada para cólicas, colite, diarreia, disenteria e dor de barriga (3-5). Entretanto, existe ainda uma falta de conhecimento sobre propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas a fim de assegurar a eficácia e segurança das plantas medicinais. Com isso surge a necessidade de preocupação com a qualidade, principalmente devido ao potencial de contaminação microbiana de plantas medicinais (6).

Para alcançar um padrão de qualidade nos fitoterápicos, é necessário que sejam realizadas análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e do produto acabado, assim como ocorre para os demais medicamentos não estéreis, garantindo o seu uso seguro e eficaz (7). A legislação brasileira atual determina que, para que a indústria farmacêutica solicite o registro do medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico frente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), seja realizado o controle microbiológico desde a droga vegetal até o produto acabado (8). A contaminação microbiana em qualquer medicamento pode comprometer a eficácia terapêutica do mesmo, além de causar efeitos adversos prejudiciais, bem como acarretar danos maiores à saúde do indivíduo. Sendo assim, é de extrema importância a realização do controle da qualidade microbiológico, garantindo a segurança, eficácia e aceitabilidade desses produtos (9). Dentro desse contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o controle microbiológico do extrato aquoso e da droga vegetal das folhas de *Psidium Guajava* L.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Controle de Qualidade e Legislação

O interesse farmacêutico por questões fitoterápicas e plantas medicinais, mostrou que é preciso garantir um controle de qualidade nos produtos, pois é necessário saber a procedência das plantas medicinais utilizadas nos fitoterápicos para que a partir disso o processo de contaminação, não só microbiológico, mas químico, possa ocorrer sem desvios na qualidade e que não traga danos aos seus consumidores (10). O controle de qualidade é um conceito muito abrangente que cobre questões que influenciam a qualidade de um produto. Pode-se dizer que o controle de qualidade é a totalidade de medidas tomadas com a finalidade de assegurar a qualidade de um produto de acordo com a sua necessidade. Diferentes produtos possuem diferentes necessidades de qualidade (11). A normatização vigente estipula que o controle de qualidade aplicado às matérias-primas dos fitoterápicos, em especial às drogas vegetais, inclua a identificação macroscópica e microscópica, além da determinação do perfil cromatográfico (12, 13). Paes-Leme (2008) (14) demonstrou que a anatomia vegetal é de grande importância no controle de qualidade de plantas medicinais e drogas vegetais e consiste em um critério relevante ao tentar aplicar o conceito de “Boas Práticas de Fabricação” (15). Porém, a análise microscópica, apesar de indispensável, pode ser insuficiente para a determinação da qualidade de matérias-primas de origem vegetal, sendo sua associação com testes químicos capaz de apresentar resultados mais conclusivos (16).

Os produtores fitoterápicos devem seguir, sempre que existentes, as monografias de controle de qualidade específica para cada planta medicinal da Farmacopeia Brasileira, ou dos outros compêndios internacionais reconhecidos no Brasil. A RDC nº 26, de 13/05/2014: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (17).

No Brasil, a 6ª edição da Farmacopeia (2019), junto com outras literaturas não oficiais, como o livro organizado por Simões *et al* (2004), contêm parâmetros semelhantes aos da OMS para verificação da identidade e controle de qualidade de drogas vegetais.

O Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, sobre a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, tem como algumas de suas diretrizes garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos, promover e reconhecer as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros e promover a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e de manipulação e produção de fitoterápicos, a partir de uma legislação específica (16).

Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde elaborou a RENISUS (Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS), com o objetivo de regulamentar o uso de plantas medicinais. A RENISUS inclui 71 espécies com potencial terapêutico, que servem como referência para a cadeia produtiva e o desenvolvimento de pesquisas. Uma das espécies destacadas nessa lista é a *Psidium guajava L.* (18). O principal propósito da RENISUS é fornecer suporte para o desenvolvimento integral da cadeia produtiva, envolvendo também ações a serem realizadas por outros ministérios participantes do programa. Isso engloba iniciativas relacionadas à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos (19).

2.2. Controle de Qualidade Microbiológico

O controle de qualidade microbiológico de plantas medicinais e/ou fitoterápicos deve considerar que, pela origem, os produtos vegetais estão em contato direto com o ambiente e, portanto, com o solo rico em esporos de fungos, patas de insetos e animais carregadas de bactérias e esporos (20). Para que a carga microbiana seja reduzida, alguns cuidados são necessários, como higiene adequada das mãos dos manipuladores das plantas medicinais; o material coletado deve ser colocado sobre superfície limpa; o recipiente de coleta deve ser limpo; deve-se procurar eliminar impurezas que possam acompanhar o órgão ou planta recém coletada; a secagem da planta deve ser realizada o mais rápido possível sem, entretanto, deixar de ser eficiente (21).

O controle microbiológico de plantas medicinais é indispensável para garantir a qualidade do produto e minimizar os riscos para o consumidor (22). No Brasil, a preocupação com a contaminação de materiais vegetais vem desde a década de 80 com

estudos sobre qualidade microbiológica (23). Na Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999, está estabelecido parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, que também preconizou os limites de contaminação microbiana para materiais vegetais, sendo considerados para controle de qualidade microbiológico como medicamentos não estéreis (24).

Na Tabela 1, estão listadas as especificações microbiológicas da 6ª Edição da Farmacopeia Brasileira de 2019 para a droga vegetal. A tabela apresenta os requisitos tanto para a droga vegetal que será submetida a um pré-tratamento destinado a reduzir a carga microbiana, quanto para a droga vegetal que não passará por esse processo (25).

Tabela 1 – Limites Microbianos para droga vegetal não submetida a pré-tratamento e droga vegetal que será submetida a pré-tratamento (25).

Tabela 1 – Limites microbianos para produtos não estéreis.

<i>Via de administração</i>	<i>Contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL^a</i>	<i>Contagem total de fungos UFC/g ou mL^a</i>	<i>Pesquisa de patógenos^{b, c}</i>
-----------------------------	---	---	---

2.2 Insumos farmacêuticos vegetais

Droga vegetal (rasurado ou triturado) que será submetida a pré-tratamento que reduz a carga microbiana.	10 ⁷	10 ⁴	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1 g ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g ou mL. Limite máximo de 10 ³ bactéria Gram negativa bile tolerante ^c em 1 g ou mL.
Droga vegetal (rasurada ou triturada) que não será submetida a pré-tratamento que reduz a carga microbiana.	10 ⁵	10 ³	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1 g ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g ou mL. Limite máximo de 10 ³ bactéria Gram negativa bile tolerante ^c em 1 g ou mL.

2.3. *Pisidium guajava* L.

A planta *Pisidium guajava*, conhecida popularmente como goiabeira, se apresenta na natureza em forma de arbusto pertencente à família *Myrtaceae*. A goiabeira é uma árvore frutífera de pequeno porte, atingindo até 10 m de altura, de ocorrência espontânea em todas as regiões do Brasil (26). O tronco e galhos possuem casca fina, descamante, pardo-avermelhada. As flores são brancas. Floresce de setembro a novembro e os frutos amadurecem entre dezembro e março. As folhas (Figura 1) são opostas, simples,

subcoriáceas, de 8 cm–12 cm de comprimento e 3 cm–6 cm de largura. Suas folhas apresentam a seguinte composição química: taninos (9-10%); óleo essencial (0,1-0,3%): cariofileno, nerolidiol, b-bisaboleno, aromadendreno, p-selineno, a-pineno e 1,8-cineol; triterpenóides (ácido guajavanóico, obtusinina); ácido oleânico, ácido ursólico, ácido catecólico, ácido guayavólico, ácido elágico, b-sitosterol; flavonóides (quercetina e seus heterosídeos.) (27).

A fruta é uma baga, que consiste em um pericarpo e uma polpa com numerosas pequenas sementes (28). No Brasil, a safra da goiaba acontece entre os meses de janeiro e abril, sendo a maior concentração no mês de fevereiro. Um pomar, quando bem conduzido, produz em média de 20 a 60 kg de goiaba/planta/ano, a partir do sexto ano de idade. Porém, o consumo interno da fruta *in natura* é baixo, estando estimado em 300g/habitante/ano (29). Os frutos da goiabeira são bagas com tamanho, forma e coloração de polpa variável em função da cultivar. Possui um dos mais altos teores de vitamina C (ácido ascórbico) entre as frutas, superada apenas pela acerola (29). Existem dois tipos mais comuns, a vermelha e a branca, sendo a vermelha mais saborosa e nutritiva. Pode ser cultivada a partir das sementes. Seus principais constituintes são taninos, flavonóides, óleos essenciais, álcoois sesquiterpenóides e ácidos triterpenóides. As partes utilizadas das plantas são a casca, brotos, folhas e raízes. Possui atividade antimicrobiana, antimutagênica e atividade hipoglicêmica, dentre outras (30-32). A goiabeira é cultivada em todo o país para a produção de frutos, existindo numerosas variedades de cultivo. Como planta medicinal é a planta mais usada no tratamento caseiro de diarreias na infância, em todos os países tropicais do mundo. É referido também o uso do seu chá, em bochechos e gargarejos no tratamento de inflamações da boca e da garganta ou para lavar feridas e úlceras e na leucorreia (33-34).



Figura 1. *Psidium guajava* L. (folhas, flores e frutos) (27).

2.4. Microrganismos patogênicos

As matérias-primas de origem natural têm maior susceptibilidade a problemas de contaminação. Isso se deve a uma série de fatores, como a poluição da água de irrigação, a influência da atmosfera e do solo, além das condições de coleta, manipulação, secagem e estocagem (35). É essencial considerar esses fatores ao lidar com matérias-primas de origem natural, a fim de garantir a qualidade e segurança dos produtos finais. Os microrganismos, de maneira geral, exigem condições favoráveis para o crescimento, o que torna algumas matérias-primas livres de contaminação ou, pelo contrário, muito susceptíveis. Estas últimas podem tornar-se substrato para o crescimento microbiano, uma vez que podem ser utilizadas como fonte de carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, sais orgânicos, água, entre outros (36). Com base na Farmacopeia Brasileira e na OMS, os testes microbiológicos devem seguir parâmetros em relação ao controle de qualidade de drogas vegetais, que não será submetida a pré-tratamento que reduz a carga microbiana, como: ausência de *Salmonella*, *Escherichia coli* e Bactérias Gram-negativas bile tolerantes, sendo o último citado apenas permitido até 10^3 em 1 g de amostra (25, 37).

A seguir, apresenta-se uma breve descrição de alguns microrganismos:

Bactérias Gram-negativas bile tolerantes: O crescimento de colônias bem desenvolvidas de bactérias Gram-negativas em Ágar Violeta Vermelho Neutro Bile Glicose, geralmente de cor vermelha ou avermelhada, indica contaminação (resultado positivo). Não há uma definição precisa para esse grupo de microrganismos, uma vez que

abrange uma grande variedade de espécies bacterianas. Na avaliação da qualidade de produtos, a Farmacopeia Brasileira destaca a importância dos microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Essa família é amplamente reconhecida e inclui um grande número de bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas, com algumas exceções. Entre elas, estão patógenos relevantes que causam doenças transmitidas por alimentos, como *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (38).

Escherichia coli: O crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas, em Ágar MacConkey, com micromorfologia característica de bacilo Gram-negativo, indica a presença provável de *E.coli*, que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. Trata-se de um bastonete Gram-negativo, flagelado e anaeróbico facultativo, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Essa bactéria é comensal e pode ser encontrada na microbiota intestinal de várias espécies animais, incluindo os seres humanos. No entanto, nem todas as cepas são inofensivas, uma vez que algumas são patogênicas e capazes de causar doenças debilitantes nos tecidos intestinais e extraintestinais, tais como gastroenterite, intoxicação alimentar, infecções do trato urinário e respiratório, podendo, em alguns casos, levar ao óbito (39).

Salmonella: O crescimento de colônias bem desenvolvidas, vermelhas com ou sem centro negro, em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato indica a presença provável de *Salmonella*, que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. Trata-se de um bastonete Gram-negativo, flagelado, anaeróbico facultativo e intracelular, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Essas bactérias são normalmente adquiridas por via oral e são frequentemente isoladas de vegetais e frutas frescas (40). As infecções entéricas causadas por diferentes tipos de *Salmonella*, conhecidas como salmoneloses, manifestam-se através de sintomas como dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômitos, sendo raras as ocorrências fatais. Os sintomas geralmente aparecem de 12 a 36 horas após a infecção e podem durar até 72 horas. A infecção por *Salmonella* é a manifestação mais comum, e a maioria dos casos se resolve em dois a três dias sem a necessidade de tratamento com antibióticos. Os alimentos mais frequentemente associados a essas infecções são carne bovina, aves, suíno e ovos crus (41).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é verificar a ausência de microrganismos patogênicos e determinar a contagem de microrganismos viáveis no extrato aquoso e na droga vegetal das folhas de *Psidium guajava L.* Para alcançar esse objetivo, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Obtenção da droga vegetal;
- Preparação do extrato aquoso;
- Avaliação do crescimento de bactérias mesófilas, leveduras e fungos na droga vegetal e no extrato aquoso;
- Avaliação do crescimento de patógenos, como *E. coli*, *Salmonella* e bactérias gram-negativas bile tolerantes, na droga vegetal e no extrato aquoso.

Esses objetivos específicos visam fornecer informações sobre a presença de microrganismos potencialmente prejudiciais nas folhas de *Psidium guajava L.*, bem como estabelecer medidas de controle e garantir a segurança microbiológica dos extratos aquosos e drogas vegetais utilizados.

4. MATERIAIS E METÓDOS

4.1. Obtenção da droga vegetal

As folhas da espécie vegetal *Psidium guajava* L. foram coletadas no dia 25 de junho de 2019, das 10 às 11 horas, no Condomínio Vivendas Bela Vista (5°39'21"S; 47°51'55"W), no Grande Colorado, Sobradinho - DF. A temperatura registrada no momento da coleta variou em torno de 15,7 a 17,5°C e a umidade relativa do ar entre 77 e 82%. O céu estava ensolarado e a espécie se encontrava no seu período de frutificação. O material botânico foi preparado pela Renata Paula Coppini doutoranda do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília (UnB), onde ela após o processo de seleção, as folhas foram secas, intercalando estufa (SOLAB - modelo SL – 102), à temperatura de 37°C, e ao natural (temperatura ambiente, à sombra), até atingirem teor de umidade entre 8 e 14%, conforme o guia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa para a registro de fitoterápicos (42). Segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição, o teor máximo de água aceitável para a droga vegetal é de 12% (25). A análise do teor de umidade das folhas foi realizada em triplicata com amostras de 1g, por meio da perda por dessecação, utilizando o analisador de umidade por infravermelho (Gehaka, modelo IV2000, São Paulo/SP, Brasil). Após a secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas (Marconi MA-580®) com peneiro de mesh 30. As partículas obtidas foram armazenadas em recipientes de vidros sob abrigo da luz e umidade, a temperatura ambiente. O cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, foi realizado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número de cadastro nº AF6618D.

4.2. Obtenção do extrato aquoso

O extrato foi preparado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília (UnB), com a colaboração do doutorando Artur Borges, seguindo o protocolo descrito por Azevedo *et al.* (2010), com adaptações (44). Para obter os extratos aquosos, foi realizada uma infusão utilizando uma proporção de 1:10 entre as folhas pulverizadas da espécie e água deionizada. A água foi aquecida até atingir o ponto de ebulição usando um mergulhão, e em seguida foi vertida sobre o material vegetal, com agitação mecânica. O recipiente foi então coberto e aguardou-se o resfriamento para cerca de 50 °C antes de

iniciar a filtração (45, 46). Os extratos aquosos obtidos foram armazenados em potes de vidro protegidos da luz. Inicialmente, foram armazenados a -20 °C por 24 horas e, posteriormente, a -80 °C por mais 24 horas. Em seguida, os extratos foram submetidos ao processo de liofilização utilizando um liofilizador SP Scientific®, modelo Advantage Plus XL-70, por um período de 14 dias. Durante a liofilização, o condensador foi ajustado para -70 °C e o vácuo para 15 mTorr. Após a sublimação do solvente, os extratos secos foram armazenados a -20 °C.

4.3 Rendimentos extrativos

O rendimento do processo extrativo das folhas de *P. guajava* L. foi calculado em porcentagem, relacionando a massa do extrato após liofilização com a massa das folhas pulverizadas, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato final (g)} / \text{massa das folhas pulverizadas (g)}) \times 100$$

4.4 Controle de qualidade microbiológico

Para a avaliação qualitativa e quantitativa da qualidade microbiológica, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) de bactérias, fungos e a identificação dos microrganismos patogênicos, segundo a metodologia preconizada pela 6ª Edição da Farmacopeia Brasileira de 2019. A contagem de fungos e bactérias totais foi realizada em triplicata para cada uma das amostras.

4.4.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos

As folhas pulverizadas foram pesadas, totalizando 10 g, transferidas para 90 mL de caldo caseína-soja e em seguida diluídas em uma série de diluições, incluindo 1:10, 1:100 e 1:1000, utilizando caldo caseína-soja. Para o extrato aquoso, o processo de preparação foi realizado de forma similar à droga vegetal. Para a contagem do número total de bactérias, utilizou-se o meio de cultura Ágar Caseína-soja, enquanto para a contagem de fungos e leveduras, utilizou-se o meio de cultura Ágar Sabouraud. Em placas de Petri estéreis, foram adicionados 15 mL de Ágar caseína-soja e Ágar Sabouraud-dextrose, respectivamente, e deixou-se solidificar. Após a solidificação, as placas foram inoculadas

com 100 µL da amostra diluída, utilizando o método de inoculação por superfície e incubadas em temperatura de 35°C por 5 dias para o Ágar Caseína-soja e a 25°C por 7 dias para o Ágar Sabouraud (Figura 2). Após o crescimento das colônias, foi realizado o cálculo do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g) (Tabela 2). O estudo foi conduzido em triplicata para obter resultados mais precisos e confiáveis.

Tabela 2. Exemplo de cálculo do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g) (25).

Exemplo de cálculo:

<i>Diluição</i>	<i>Colônias por placas</i>	<i>UFC/g ou mL</i>
1:100	293	2,93 x 10 ⁴
1:100	100	1,00 x 10 ⁴
1:1000	41	4,10 x 10 ⁴
1:1000	12	1,20 x 10 ⁴

$$\text{Média} = \frac{(2,93 + 1,00 + 4,10 + 1,20)}{4} \times 10^4 = 2,30 \times 10^4$$

Caso o número de colônias nas placas de todas as diluições seja menor que 20, registrar a contagem correspondente à de menor diluição e expressar como UFC/g ou mL. Se as placas de todas as diluições não apresentarem colônias, registrar a contagem como sendo menor que uma vez a menor diluição correspondente (25).

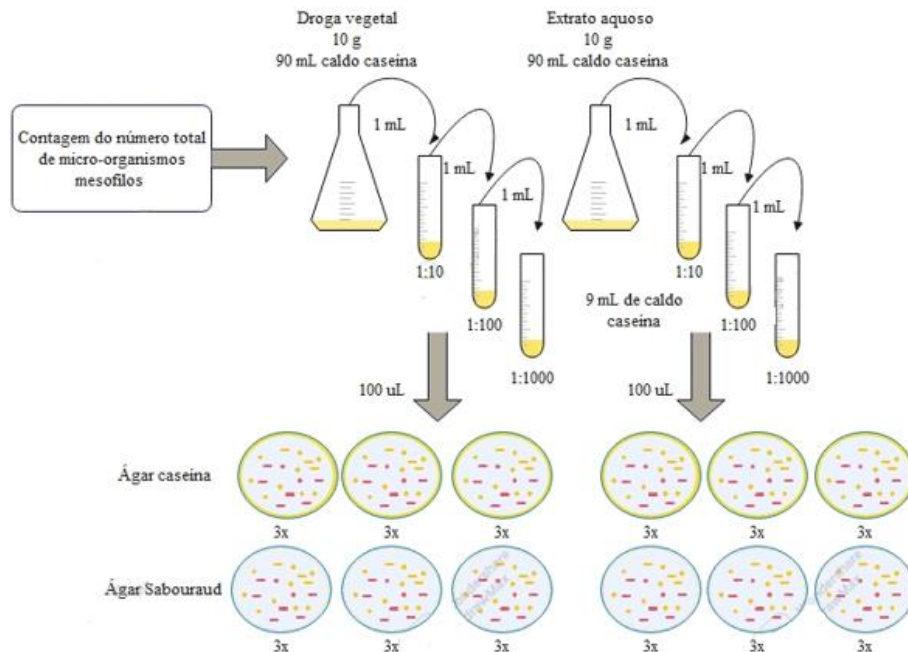


Figura 2. Esquema geral para contagem de número total de microrganismos mesófilos.

Preparo das soluções

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 monoidratada 2,5 g

Água purificada 1000 mL

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

Ágar caseína-soja

Peptona de caseína pancreática 15,0 g

Farinha de soja obtida por digestão papaínica 5,0 g

Cloreto de sódio 5,0

Ágar 15,0 g

Água purificada 1000 mL

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

Ágar Sabouraud-dextrose 4%

Dextrose 40,0 g

Peptonas 10,0 g

Ágar 15,0 g

Água purificada 1000 mL

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

4.4.2. Pesquisa de microrganismos patogênicos

Esse método possibilita verificar a presença ou a ausência de micro-organismos específicos em meios seletivos.

Bactérias gram-negativas bile tolerantes

Foi preparada uma diluição de 1 g das folhas pulverizadas em caldo caseína-soja, na proporção de 1:10. A amostra foi homogeneizada e incubada a 25 °C por 2 horas. Para as bactérias gram-negativas bile tolerantes realizou-se o teste de ausência, onde 1mL do caldo caseína-soja diluído foram transferidos para 9 mL do caldo de enriquecimento enterobactérias Mossel. A incubação foi realizada a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, foram preparadas subculturas em placas contendo Ágar violeta vermelho neutro glicose e incubadas a 35 °C por 24 horas (Figura 3).

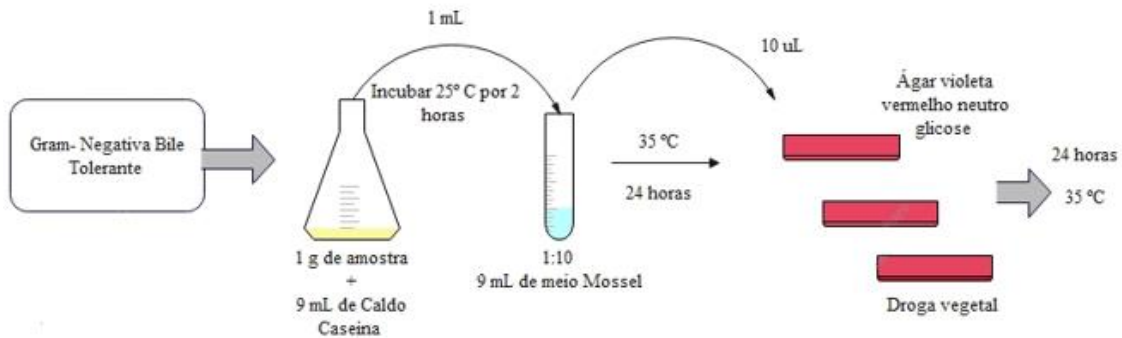


Figura 3. Esquema geral para o teste de ausência de Bactérias gram-negativas bile tolerantes.

Preparo das soluções

Caldo de enriquecimento para enterobactérias Mossel

Hidrolisado de pancreático de gelatina 10,0 g

Glicose monoidratada 5,0 g

Bile de boi desidratada 20,0 g

Fosfato de potássico monobásico 2,0 g

Fosfato dissódico di-hidratado 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.

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 monoidratada 10,0 g

Ágar 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 e não esterilizar em autoclave.

Escherichia coli

Na pesquisa de *Escherichia coli* foram realizados testes utilizando a droga vegetal e o extrato aquoso. Para isso foi adicionado 1 g da amostra a 9 mL de caldo caseína-soja. Utilizou-se 10 mL da diluição da amostra para 90 mL de caldo de enriquecimento, que é o Caldo caseína-soja. A amostra foi incubada a 35°C por 24 horas. Homogeneizou-se a mistura e incubou a uma temperatura de 35°C por um período de 24 horas. Após a incubação, homogeneizou-se novamente e transferiu 1 mL da amostra enriquecida para 100 mL de Caldo MacConkey. Incubou-se a uma temperatura de 43°C por 24 horas. Realizou-se uma subcultura em placa de Ágar MacConkey e incubou a uma temperatura de 35°C por 24 horas (Figura 4). De acordo com a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição de 2019, a interpretação dos resultados para o meio ágar MacConkey seria o crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas.

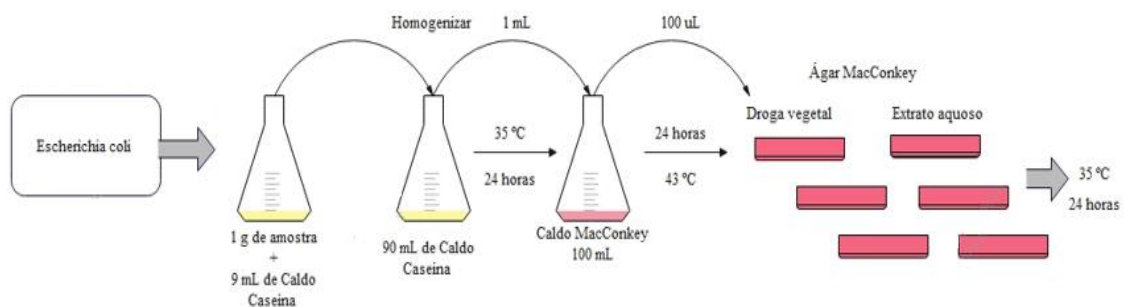


Figura 4. Esquema geral empregado para pesquisa da *Escherichia coli*.

Preparo das soluções

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.

Ágar MacConkey

Hidrolisado de pancreático de gelatina 17,0 g

Peptona (carne ou caseína) 3,0 g

Lactose monoidratada 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

Ágar 13,5 g

Água purificada 1000 mL

pH $7,1 \pm 0,2$. Ferver um minuto sob agitação constante. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Salmonella

Na pesquisa de *Salmonella* foram realizados testes utilizando a droga vegetal e o extrato aquoso. Foi utilizada 1 g de amostra a 9 mL de caldo caseína-soja. A amostra foi homogeneizada e incubada a 35°C por um período de 24 horas. Após essa incubação, 100 uL do conteúdo foi transferido para 10 mL de caldo de enriquecimento *Salmonella* Rappaport Vassiliadis, sendo então incubado a uma temperatura de 35 °C por 24 horas. Em seguida, realizou-se a subcultura em ágar xilose lisina desoxicolato e a incubação

ocorreu a 35 °C por 24 horas (Figura 5). Conforme a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), a interpretação dos resultados obtidos no ágar xilose lisina desoxicolato é baseada na presença de colônias vermelhas com ou sem centro negro, indicando a possível presença de colônias de *Salmonella*.

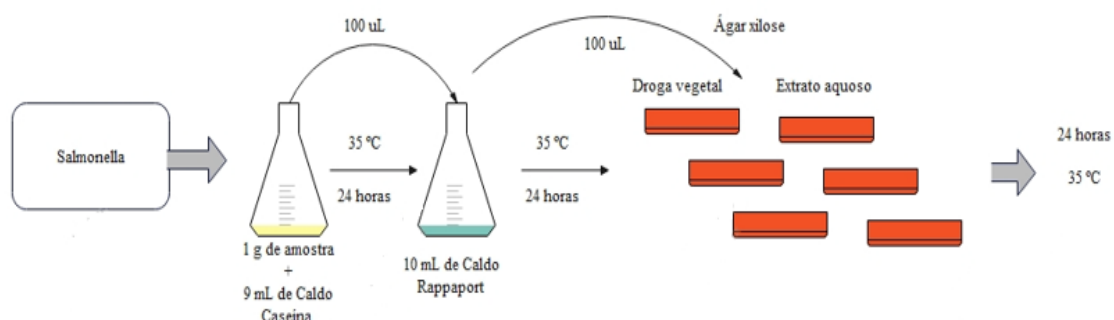


Figura 5. Esquema geral empregado para pesquisa da *Salmonella*.

Preparo das soluções

Caldo enriquecimento *Salmonella* Rappaport Vassiliadis

Peptona de soja 4,5 g

Cloreto de magnésio hexaidratado 29,0 g

Cloreto de sódio 8,0 g

Fosfato de potássio dibásico 0,4 g

Fosfato de potássio monobásico 0,6 g

Verde malaquita 36,0 mg

Água purificada 1000 mL

pH 5,2 ± 0,2. Esterilizar em autoclave em temperatura que não exceda a 115 °C.

Ágar xilose lisina desoxicolato

Xilose 3,5 g

L-Lisina 5,0 g

Lactose monoidratada 7,5 g

Sacarose 7,5 g

Cloreto de sódio 5,0 g

Extrato de levedura 3,0 g

Vermelho fenol 80,0 mg

Ágar 13,5 g

Desoxicolato de sódio 2,5 g

Citrato de amônio férrico 0,8 g

Tiosulfato de sódio 6,8 g

Água purificada 1000 mL

Ajustar de forma que após aquecimento seja $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$. Aquecer até a ebulição e não esterilizar em autoclave.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimentos extrativos

O rendimento do processo extrativo das folhas de *P. guajava L.* foi calculado em porcentagem, relacionando a massa do extrato após liofilização com a massa das folhas pulverizadas, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato final (g)} / \text{massa das folhas pulverizadas (g)}) \times 100$$

O rendimento extrativo foi de 17% ao pulverizar uma massa de folhas de 100 g, resultando em um peso de extrato seco de 17 g.

Ojewole *et al.* (2008) realizaram a extração de 1 kg de folhas pulverizadas de *P. guajava L.* com 5,0 L de água destilada a temperatura ambiente ao longo de 48 horas, divididas em duas extrações de 2,5 L cada, com agitação ocasional. Obtiveram um resíduo de 24,83 g, correspondendo a um rendimento de 2,483% (46). Por outro lado, em um estudo realizado por Geidam *et al.* (2015), folhas secas de *P. guajava L.* foram extraídas com água destilada em um extrator Soxhlet durante 24 horas, obtendo-se um rendimento de 9,9% (47). Esses dados evidenciam que pequenas variações nos métodos extrativos podem resultar em diferentes porcentagens de rendimento, reforçando a importância da padronização do método extrativo para produtos derivados de plantas.

5.2. Controle de qualidade microbiológico

5.2.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos

A contagem de mesófilos foi realizada em triplicata, seguindo as diretrizes estabelecidas pela Farmacopeia 6ª edição. No estudo realizado, foi observado que a contagem de colônias nas placas de ágar caseína-soja e ágar Sabouraud, em todas as diluições testadas, foi inferior a 20, conforme mostrado na Tabela 3. Como preconizado na Farmacopeia 6ª edição, foi considerado somente o número de colônias correspondente à menor diluição e multiplicado pelo fator de diluição. Portanto, não foi necessário realizar a média aritmética das triplicatas, como demonstrado na Tabela 4. A baixa contagem de colônias de fungos e bactérias, conforme demonstrado nas Figuras 6, 7, 8 e

9, indica que a folha de *Psidium guajava L.* está dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia para microrganismos mesófilos. Isso indica que a amostra está em conformidade com os padrões microbiológicos exigidos.

Vale ressaltar que as folhas de *Psidium guajava L.* possuem atividade antimicrobiana. No estudo realizado por Bona *et al.* (48) constatou que os extratos aquosos e alcoólico das folhas de *P. guajava* não demonstraram atividade sobre leveduras, porém apresentaram potencial antimicrobiano contra bactérias Gram positivas, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 6,25 a 100 mg/mL, além de mostrarem uma ação mais eficaz contra bactérias Gram negativas, com CIM variando de 0,39 a 25 mg/mL. Portanto, pode ser plausível relacionar a atividade antimicrobiana dos extratos com a diminuição da contagem de colônias observada.

Tabela 3. Resultado da contagem de colônias dos microrganismos mesófilos.

Diluição/ UFC	Droga vegetal ágar caseína	Extrato aquoso ágar caseína	Droga vegetal ágar sabouraud	Extrato aquoso ágar sabouraud
1:10	2 colônias	1 colônia	1 colônia	1 colônia
1:100	1 colônia	1 colônia	Ausente	Ausente
1:1000	1 colônia	1 colônia	Ausente	Ausente

Tabela 4. Resultado do cálculo do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

Droga vegetal ágar caseína	Extrato aquoso ágar caseína	Droga vegetal ágar sabouraud	Extrato aquoso ágar sabouraud
20 UFC/g	10 UFC/g	10 UFC/g	10 UFC/g

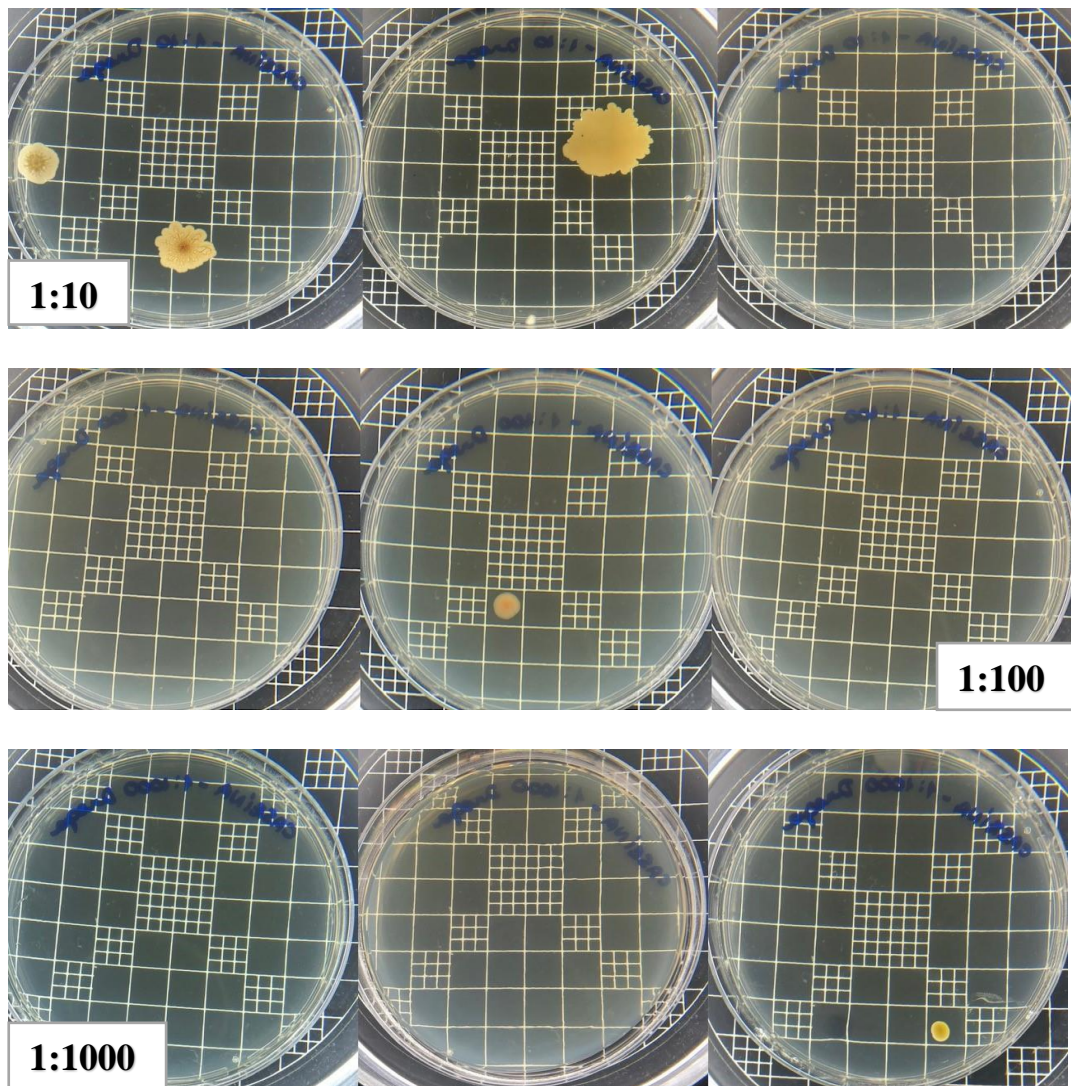


Figura 6. Resultado da droga vegetal em ágar caseína após 5 dias a 35 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.

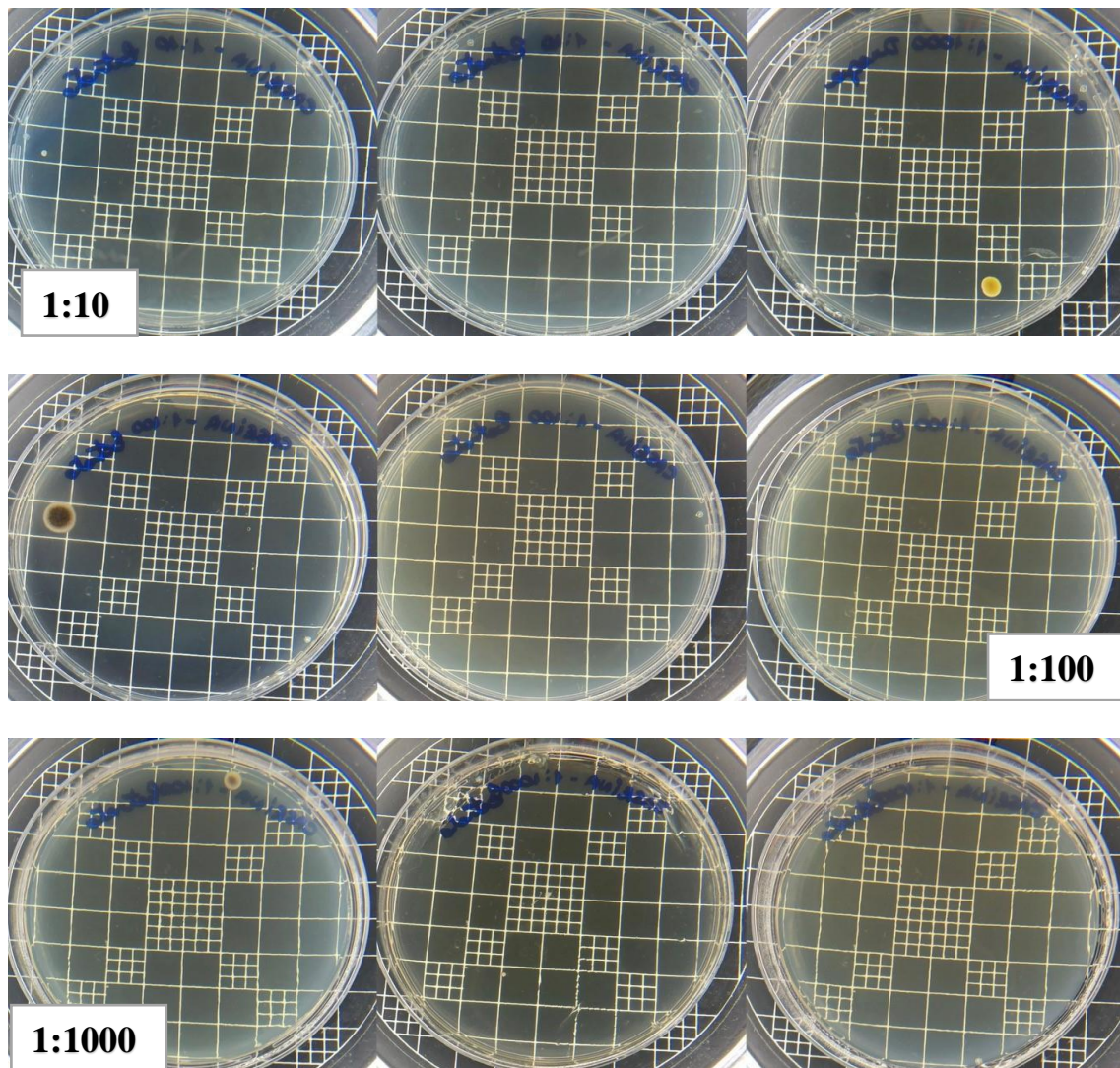


Figura 7. Resultado do extrato aquoso em ágar caseína após 5 dias a 35 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.

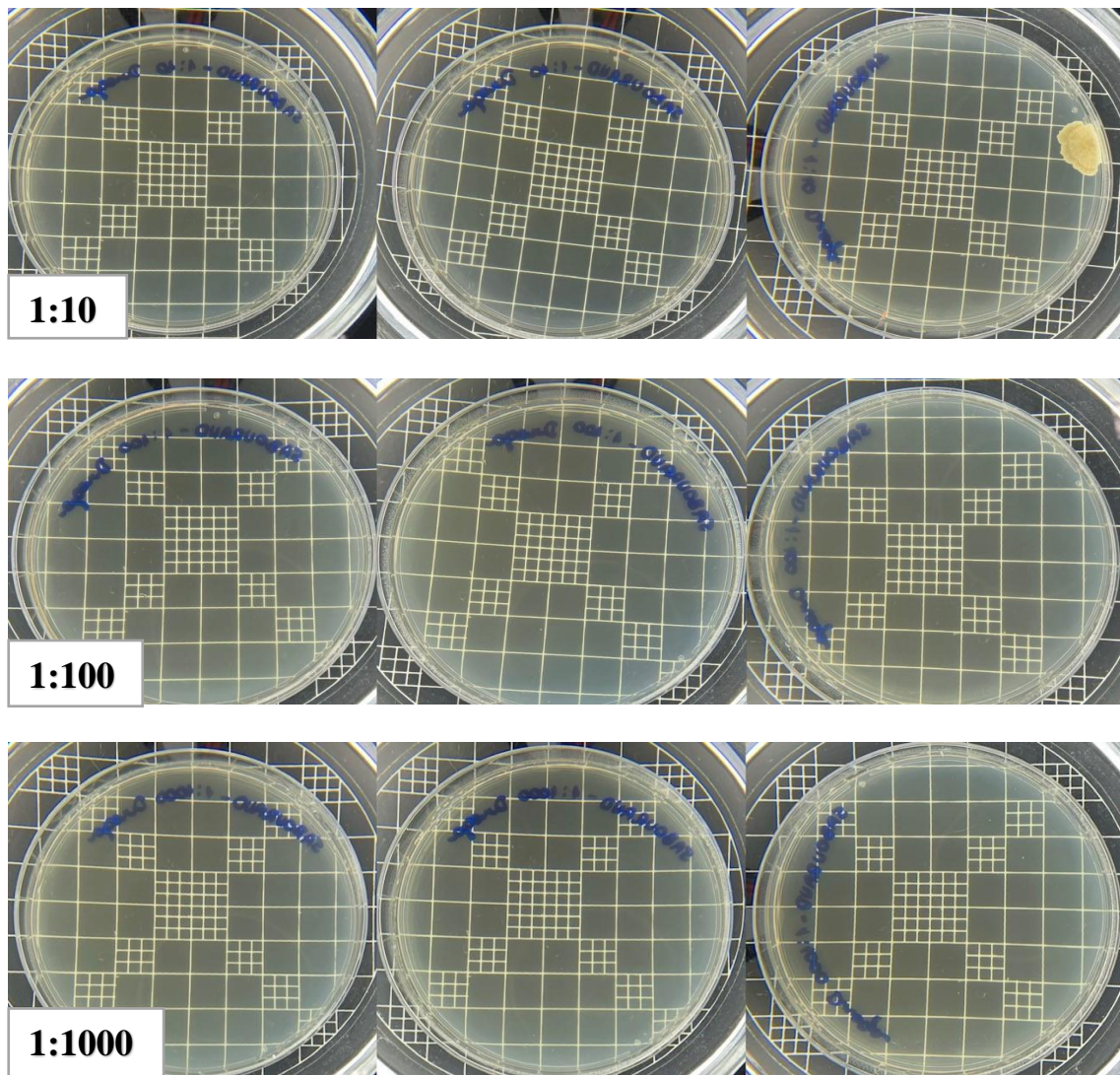


Figura 8. Resultado da droga vegetal em ágar Sabouraud após 7 dias a 25 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.

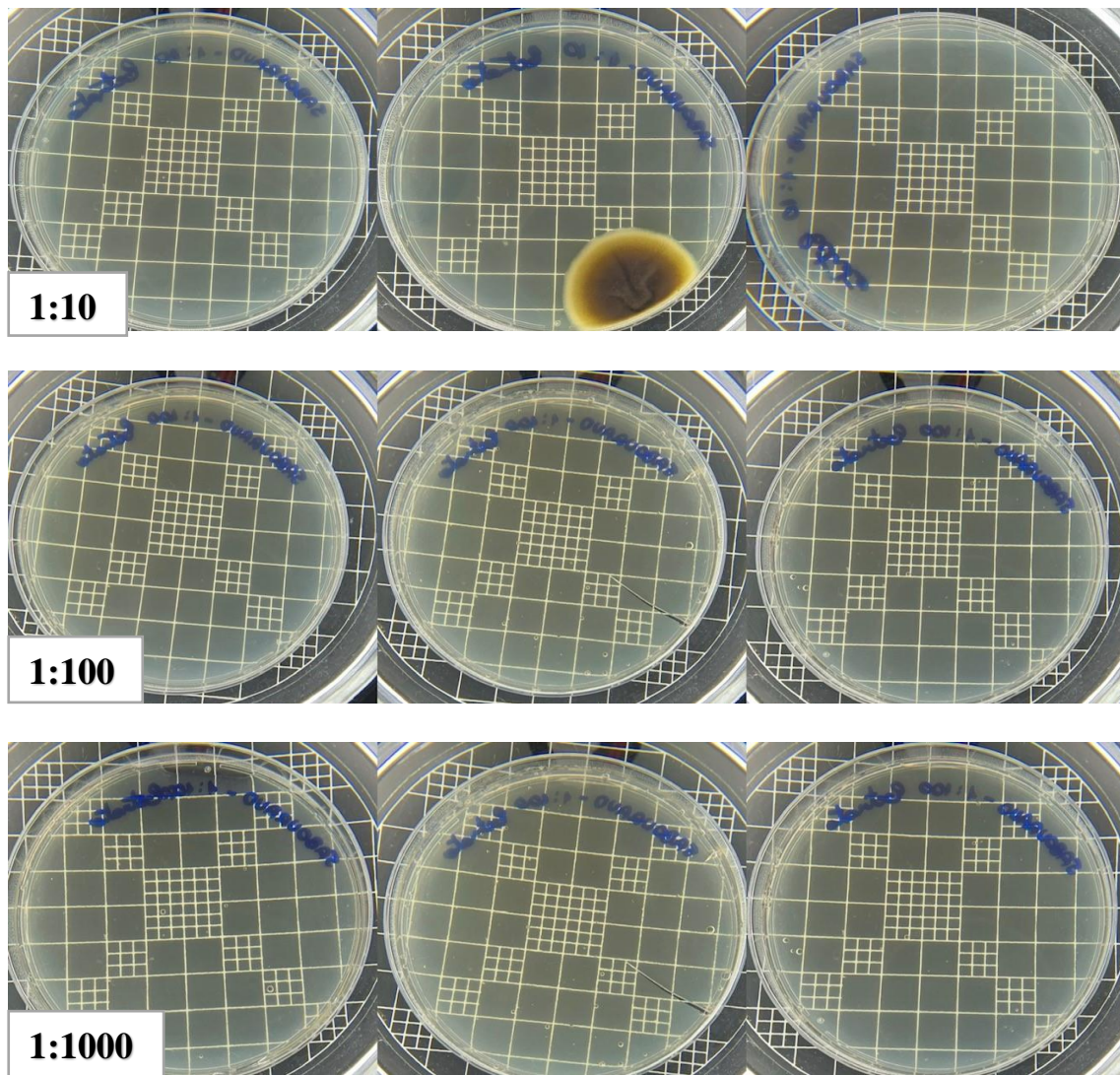


Figura 9. Resultado do extrato aquoso em ágar Sabouraud após 7 dias a 25 °C. As diluições foram realizadas em sequência, seguindo a ordem de 1:10, 1:100 e 1:1000.

5.2.2. Pesquisa de microrganismos patogênicos

Bactérias gram-negativas bile tolerantes

Para as bactérias gram-negativas bile tolerantes, foi realizado o teste de ausência, no qual não foi observada a presença dessas bactérias (Figura 10). É importante destacar que o teste de ausência está em conformidade com os limites microbianos permitidos pela Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. De acordo com essa edição, o produto é considerado conforme ao teste se não houver crescimento de colônias.

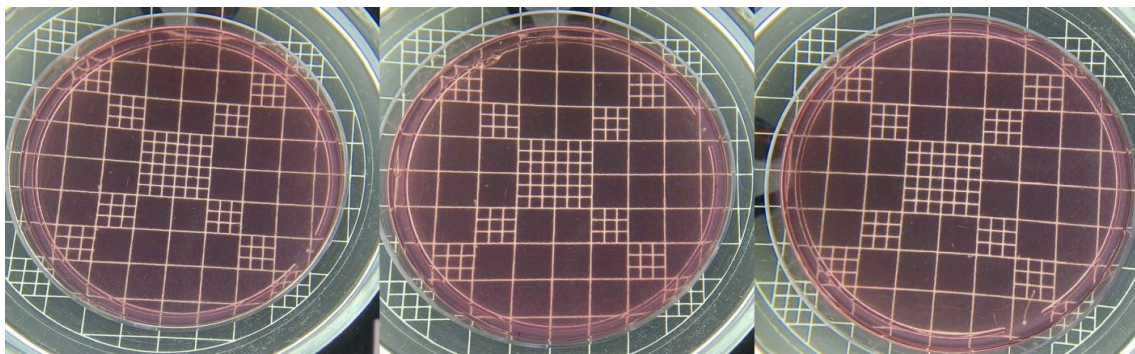


Figura 10. Resultado da droga vegetal em Ágar violeta vermelho neutro glicose e incubadas a 35 °C por 24 horas.

Escherichia coli

Durante a pesquisa envolvendo *Escherichia coli*, foram realizados testes utilizando tanto a droga vegetal quanto o extrato aquoso. Nesses testes, não foi observada a presença dessa bactéria, como pode ser observado nas Figuras 11 e 12. No entanto, é importante ressaltar que o crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas, com a micromorfologia característica de bacilos Gram-negativos, pode indicar a possível presença de *E. coli*. Essa presença deve ser confirmada por meio de testes de identificação microbiana específicos. Para o produto ser considerado em conformidade com o teste, não deve ser observado crescimento de tais colônias ou devem ser obtidos resultados negativos nos testes microbianos realizados.

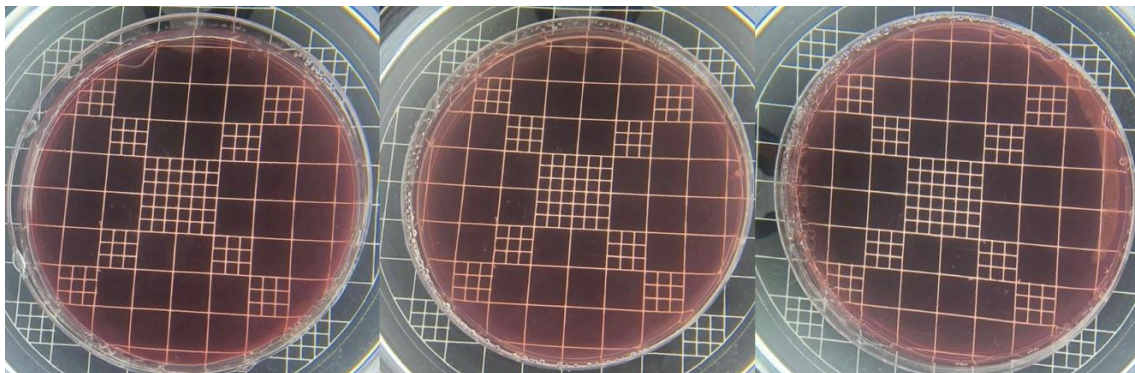


Figura 11. Resultado da droga vegetal em Ágar MacConkey e incubadas a 35 °C por 24 horas.

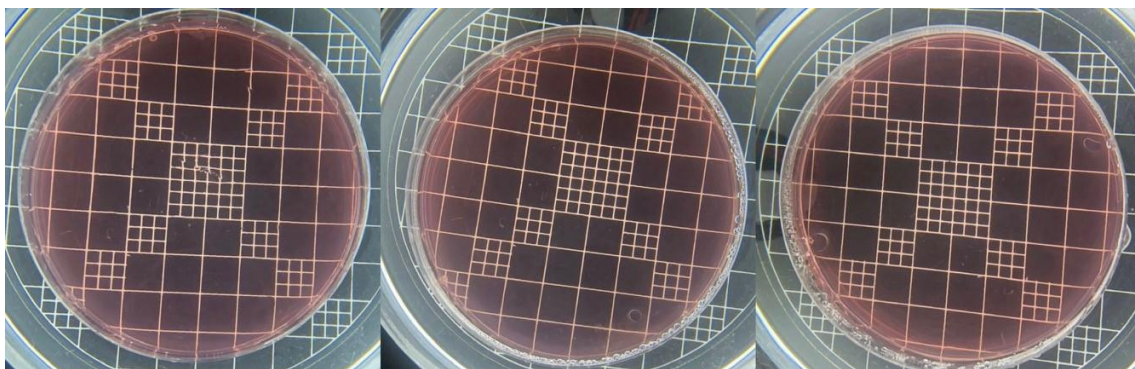


Figura 12. Resultado do extrato em Ágar MacConkey e incubadas a 35 °C por 24 horas.

Salmonella

Durante a pesquisa relacionada à *Salmonella*, foram conduzidos testes utilizando a droga vegetal e o extrato aquoso, não sendo observada a presença dessa bactéria (Figura 13 e 14). No entanto, é importante mencionar que o crescimento de colônias bem desenvolvidas, de cor vermelha com ou sem um centro negro, pode indicar a possível presença de *Salmonella*. Essa presença precisa ser confirmada por meio de testes específicos de identificação microbiana. Para que o produto seja considerado em conformidade com o teste, é necessário que não haja crescimento de tais colônias ou que os resultados dos testes microbianos sejam negativos.

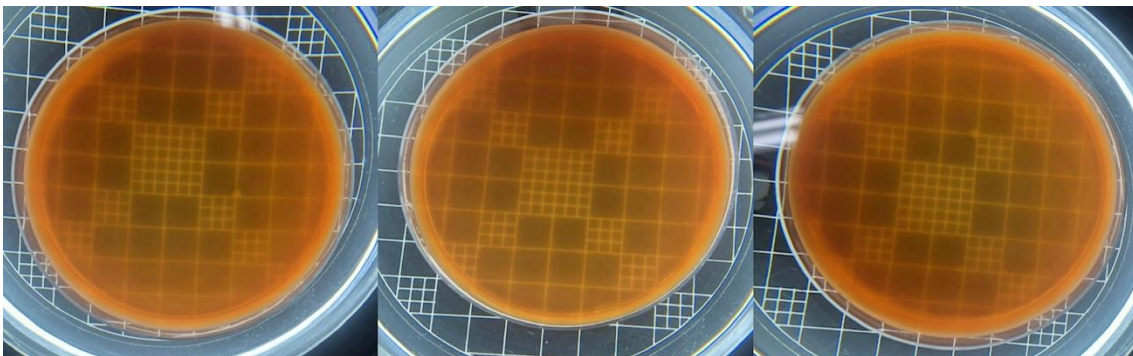


Figura 13. Resultado da droga vegetal em Ágar xilose lisina desoxicolato e incubadas a 35 °C por 24 horas.

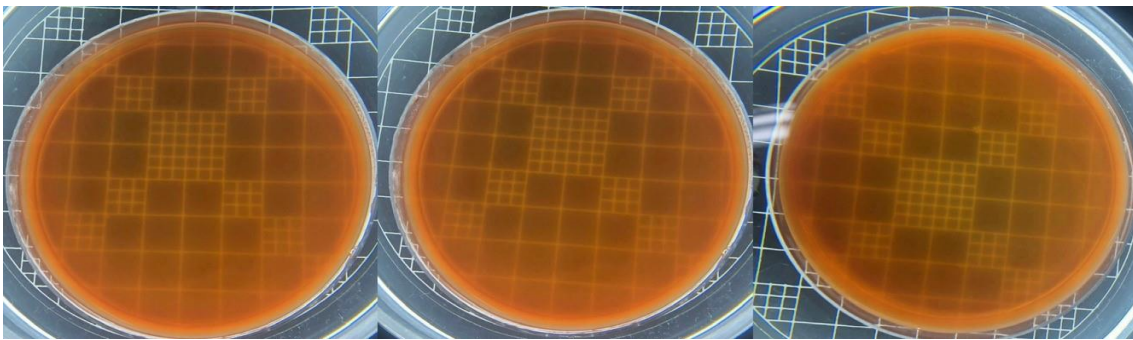


Figura 14. Resultado do extrato aquoso em Ágar xilose lisina desoxicolato e incubadas a 35 °C por 24 horas.

No estudo de Silvia M. *et al.* (2008) (49), observou-se que para o ensaio do controle microbiológico no extrato de *P. guajava*, não houve crescimento de microrganismos patogênicos específicos nas amostras analisadas. Na contagem do número total de microrganismos houve crescimento inferior a 10 UFC/g de produto, o que permite a sua aprovação, segundo as recomendações oficiais para produtos não estéreis.

Durante todos os testes, tanto para a contagem total de microrganismos mesófilos quanto para a pesquisa de patógenos, foi realizada uma placa controle de cada meio. Esse procedimento é fundamental para garantir o controle dos meios utilizados e dos microrganismos analisados. Em nenhuma das placas controle foram observados quaisquer sinais de crescimento, o que era o resultado desejado. Isso indica que os meios utilizados estavam em conformidade e livres de contaminação microbiana (Figura 15).

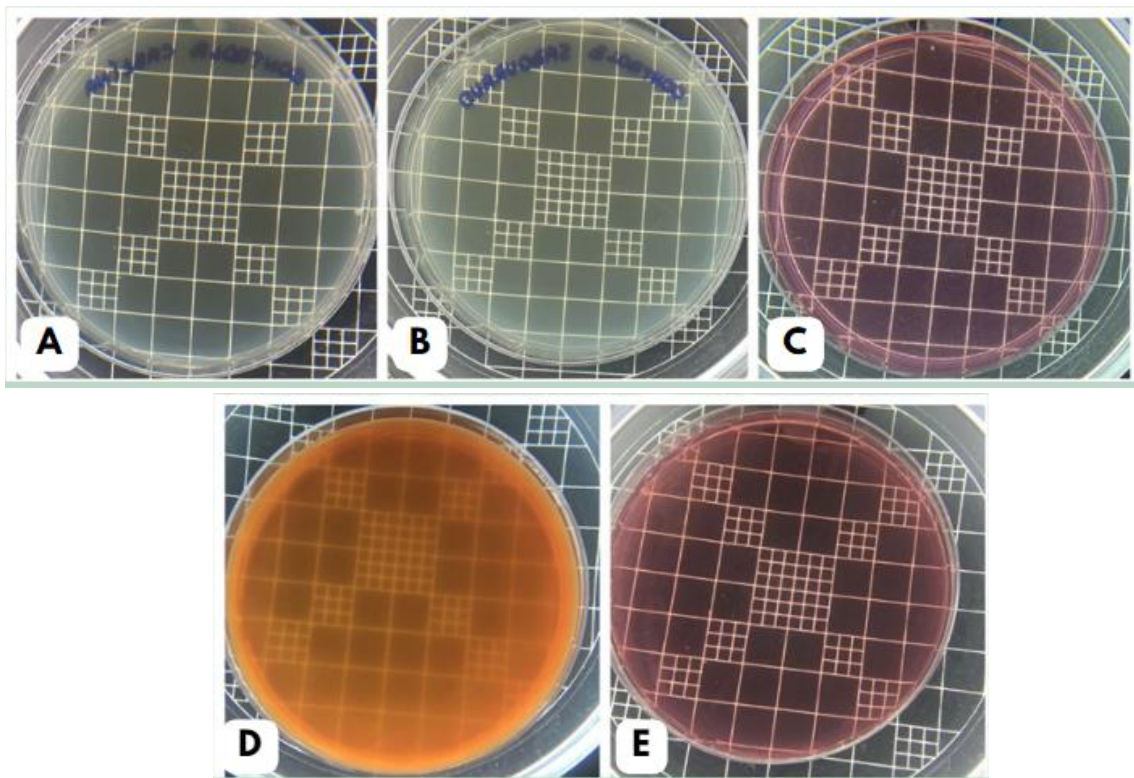


Figura 15. Resultado das placas controles de todos os meios. A) ágar caseína; B) ágar sabouraud; C) ágar violeta vermelho neutro glicose; D) ágar xilose lisina desoxicolato; E) ágar MacConkey.

6. CONCLUSÃO

O aumento do uso de plantas medicinais no Brasil, juntamente com a implementação de Políticas Nacionais de integração dessas plantas na saúde, ressalta a importância de garantir a qualidade, segurança e eficácia desses produtos disponibilizados aos consumidores. Apesar da existência de legislação sobre plantas medicinais, ainda há algumas lacunas que precisam ser preenchidas, para garantir a comercialização de produtos de qualidade. A falta de regulamentação adequada resulta em práticas inadequadas no cultivo, coleta e processamento das plantas, afetando diretamente sua qualidade final e podendo comprometer suas propriedades terapêuticas. Uma revisão e atualização da legislação sobre plantas medicinais seriam benéficas, pois exigiriam maior transparência e informações para os consumidores, reduzindo assim os riscos envolvidos. Além disso, é importante ressaltar que análises microbiológicas mostraram que o uso das folhas de *Psidium Guajava L.* está dentro dos limites microbianos estabelecidos pela farmacopeia, o que confirma sua segurança para uso. No entanto, é fundamental expandir esses requisitos para outras plantas medicinais e estabelecer diretrizes mais abrangentes para garantir a qualidade e segurança desses produtos tão importantes para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- (1) CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of medical and Biological research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- (2) OKAMOTO, Marise Kiyoko Hasegawa. **Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de Psidium guajava L. e estudo da estabilidade do gel**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de Sao Paulo.
- (3) VENDRUSCOLO, Giovana Secretti; RATES, Stela Maris K.; MENTZ, Lilian Auler. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 15, p. 361-372, 2005.
- (4) TÔRRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 373-380, 2005.
- (5) OLIVEIRA, Franciêlda Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 466-476, 2007.
- (6) BARBOSA, Laisa Cristina Ramos Souza. **Análise da importância do uso racional de plantas medicinais e seu controle microbiológico**. 2013.
- (7) PASSARINHO, Andressa Martins et al. Análise Total da Qualidade em Cápsulas de Passiflora incarnata L./Total Analysis of Quality in Capsules of Passiflora incarnat L. **Saúde em Foco**, p. 64-77, 2018.
- (8) Brasil. (2014). RDC 26-Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. ANVISA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF.
- (9) DE CABRAL SOBREIRA, Ana Laura et al. Aspectos legais e qualidade de um produto fitoterápico à base de graviola (*Annona Muricata* Linn). **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 31, n. 4, p. 305-316, 2019.
- (10) EIGNER, U. et al. Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of Salmonella species from stool specimens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. 558-565, 2001.

- (11) WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on good manufacturing practices [GMP] for herbal medicines. Geneva, 2007.
- (12) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de diretoria colegiada nº 10 de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União. nº 46, 10 de março de 2010a. Seção 1, p 52-9.
- (13) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de diretoria colegiada nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, nº 63, 05 de abril de 2010b. Seção 1, p 85-7.
- (14) PAES-LEME ACV. **A Importância da Microscopia no Controle de Qualidade de Drogas de Origem Vegetal**. [Monografia]. Rio de Janeiro (RJ): Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.
- (15) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 210, de 04 de agosto 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. Diário Oficial da União, nº 156, 14 de agosto de 2003. Seção 1, p24-50.
- (16) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. World Health Organization, 1998.
- (17) ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 13 de maio de 2014. 2014.
- (18) MARMITT, Diorge Jônatas et al. Revisão sistemática sobre a produção científica de plantas medicinais da RENISUS voltadas ao diabetes mellitus. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 12, n. 1, 2015.
- (19) BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br>. Acesso em: 23 de jun.2023.
- (20) ROCHA, Liliana de O.; SOARES, Maria Magali SR; CORRÊA, Cristiana Leslie. 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. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 40, p. 521-527, 2004.
- (21) BOCHNER, Rosany et al. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 537-547, 2012.
- (22) COSSATIS, Nataly de Almeida et al. **Qualidade microbiológica e vigilância sanitária de plantas medicinais brasileiras**. 2015. Tese de Doutorado.
- (23) FISCHER, Dominique Corinne Hermine; OHARA, Mitsuko Taba; SAITO, Takako. Padrão microbiano em medicamentos não estéreis de uso oral: enquadramento de produtos fitoterápicos. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 5, p. 29-54, 1996.
- (24) ANVISA : Agência Nacional de Vigilância digital, 2004. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br>>
- (25) BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Volume 1. 6a ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2019.
- (26) SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae. In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2015. Disponível em: Acesso em: 08 jun. 2023.
- (27) LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.
- (28) JIMÉNEZ-ESCRIG, Antonio et al. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.
- (29) Sebrae. O cultivo e o mercado da goiaba. 2016. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-goiaba,d3aa9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 08 jun. 2023.
- (30) CRUZ, Gilberto Luiz da. Dicionário das plantas úteis do Brasil. In: **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 1985. p. 599-599.

- (31) GONDIM, Antonio NS et al. Complete atrioventricular block on isolated guinea pig heart induced by an aqueous fraction obtained from *Psidium guajava* L. leaf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 312-316, 2006.
- (32) AMARAL, Flavia MM et al. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 696-720, 2006.
- (33) MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas na fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2ª edição. **Ed. Imprensa Universitária, Fortaleza**, 2000.
- (34) NASEER, Sumra et al. The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). **Clinical phytoscience**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2018.
- (35) SCHAPOVAL, Elfrides Eva Scherman. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 279-280, 2005.
- (36) BUGNO, Adriana et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 491-497, 2005.
- (37) WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems**. World Health Organization, 2004.
- (38) BAYLIS, Chris et al. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. **The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry.**, 2011.
- (39) BÉLANGER, Louise et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2011.
- (40) PUI, Chai Fung et al. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 337-342, 2011.

- (41) SHINOHARA, Neide Kazue Sakugawa et al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & saúde coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.
- (42) BRASIL. Instrução Normativa N.º 4, de 18 de junho de 2014. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. . In: Sanitária. ANdV, editor. 2014
- (43) Azevedo C, Moura M. Cultivo de plantas medicinais: Guia prático. Rio de Janeiro, Niterói: Rural PR 2010.
- (44) SILVEIRA, Damaris. Plantas medicinais e fitoterápicos: guia rápido para a utilização de algumas espécies vegetais. **Brasília: Universidade de Brasília**, 2013.
- (45) BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Volume 2. 6a ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2019.
- (46) OJEWOLE, John AO; AWE, Emmanuel O.; CHIWORORO, Witness DH. Antidiarrhoeal activity of Psidium guajava Linn.(Myrtaceae) leaf aqueous extract in rodents. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 6, p. 195-207, 2008.
- (47) GEIDAM, Y. A. et al. Antibacterial efficacy of ethyl acetate fraction of Psidium guajava leaf aqueous extract on experimental Escherichia coli (O78) infection in chickens. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 358, 2015.
- (48) BONA, Eliana Almeida Mira De et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.
- (49) IHA, Silvia M. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (Psidium guajava L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 387-393, 2008.