

Aplicabilidade de Petrifilm® na enumeração de bactérias e fungos em drogas vegetais

Use of Petrifilm® for bacteria and fungi counting in herbal drugs

RIALA6/1011

Adriana BUGNO^{1*}, Adriana A. B. ALMODOVAR¹, Tatiana C. PEREIRA¹, Terezinha de Jesus A. PINTO²

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Controle de Esterilidade, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo/SP e-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br;

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Recebido: 22/11/2004 – Aceito para publicação: 04/05/2005

RESUMO

Técnicas alternativas aos métodos de plaqueamento em ágar para enumeração de bactérias e fungos têm sido desenvolvidas, buscando-se rapidez e simplicidade, mas sem comprometimento da sensibilidade e exatidão. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia e aplicabilidade de Petrifilm® AC para a enumeração de bactérias e de Petrifilm® YM para enumeração de bolores e leveduras em 90 amostras de drogas vegetais, comparando-se as contagens obtidas com a utilização dos sistemas Petrifilm® com àquelas obtidas com as técnicas de semeadura em profundidade em meios de cultura. Os coeficientes de correlação obtidos foram 0,9833 e 0,9231 para as contagens de bactérias e fungos, respectivamente. As contagens obtidas não mostraram diferenças significativas entre os métodos empregados. Os resultados sugerem a aplicabilidade do sistema Petrifilm® como alternativa ao método convencional de plaqueamento.

Palavras-Chave. qualidade dos medicamentos, contaminação de medicamentos, plantas medicinais, métodos microbiológicos, Petrifilm®, plaqueamento.

ABSTRACTS

Alternative techniques to agar plating methods for enumerating of bacteria and fungi counting have been developed, in order to get faster and simpler techniques without producing any effect on analytical sensibility and precision. The objective of the present study was evaluate the performance of Petrifilm® AC for enumeration of bacteria and of Petrifilm® YM for enumeration of yeasts and molds in ninety samples of herbal drugs, by comparing the enumeration obtained from both Petrifilm® systems, and that one achieved from conventional agar plating methods. Correlation coefficients of 0,9833 and 0,9231 were observed for enumeration of bacteria and fungi respectively. The results suggest that Petrifilm® is suitable as an alternative technique to conventional methods for microorganisms counting.

Key Words. drug quality, drug contamination, medicinal plants, microbiological methods, Petrifilm®, plating.

INTRODUÇÃO

Os métodos de plaqueamento em ágar para enumeração de bactérias e fungos têm sido tradicionalmente utilizados na avaliação microbiológica da qualidade de produtos farmacêuticos, no entanto, técnicas alternativas têm sido desenvolvidas, buscando-se rapidez e simplicidade, sem comprometimento da sensibilidade e exatidão. Entre as novas tecnologias desenvolvidas para enumeração de microrganismos, o sistema Petrifilm® tem ganho aceitação como alternativa aos métodos convencionais de plaqueamento em meio de cultura, pela facilidade, simplicidade e maior facilidade em evidenciar o crescimento microbiano. Consiste

em sistema pronto de meio de cultura, composto por um cartão coberto com ágar nutriente suplementado ou não com antibióticos e um filme plástico que protege o meio antes da inoculação e a amostra após a inoculação. O sistema incorpora um agente gelificante solúvel em água fria e indicador de tetrazólio para facilitar a visualização e enumeração de colônias.

Embora pouco utilizados na área farmacêutica, são vários os estudos comparativos entre os sistemas Petrifilm® e os métodos convencionais para enumeração de microrganismos aeróbios, coliformes e *Staphylococcus aureus* em produtos alimentícios, sendo metodologia oficializada para a avaliação de contaminação microbiana em várias matrizes de alimentos

pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e a *American Public Health Association* (APHA)¹.

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade de Petrifilm® AC e de Petrifilm® YM como alternativas aos métodos convencionais de semeadura em profundidade em meios de cultura para enumeração de bactérias e fungos em amostras de drogas vegetais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental

O estudo foi realizado como comparação pareada entre os dois métodos de enumeração, sendo que o

método de plaqueamento em profundidade utilizando Agar caseína de soja e Agar Sabouraud com cloranfenicol (0,5%) para enumeração de bactérias e fungos, respectivamente, foi referência na avaliação do Petrifilm® AC e Petrifilm® YM.

Todos os ensaios foram executados em triplicata.

Amostras

Foram avaliadas 90 amostras de drogas vegetais compostas por 64 espécies vegetais, adquiridas em estabelecimentos comerciais, conforme abaixo indicado. Em alguns casos, foram avaliadas amostras de mais de um fornecedor, sendo que o número de amostras analisadas aparece indicado entre parênteses:

Nome da Planta	Nome Científico	Nome da Planta	Nome Científico
Abutua	<i>Chondrodendron platyphylum</i>	Funcho	<i>Foeniculum vulgare</i>
Agoniada	<i>Plumeria lancifolia</i>	Ginkgo biloba (4)	<i>Ginkgo biloba</i>
Alcachofra (3)	<i>Cynara scolymus</i>	Guaraná (3)	<i>Paulinia cupana</i>
Alfazema (2)	<i>Lavandula officinallis</i>	Hipérico	<i>Hypericum perforatum</i>
Alteia	<i>Althaea officinalis</i>	Hissopo	<i>Hyssopus officinalis</i>
Angélica	<i>Angelica archangelica</i>	Ipê roxo	<i>Tabebuia avellaneda</i>
Aquiléia	<i>Achillea millefolium</i>	Jaborandi	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Bardana	<i>Arctium lappa</i>	Jalapa (2)	<i>Operculina sp</i>
Boldo do Chile (2)	<i>Peumus boldus</i>	Jasmim	<i>Jasminum officinale</i>
Calumba	<i>Jatrorrhiza palmata</i>	Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i>
Camédrio	<i>Teucrium chamaedrys</i>	Losna	<i>Artemisia absinthium</i>
Camomila (3)	<i>Matricaria recutita</i>	Macela	<i>Achyrocline satyroides</i>
Capim cidrão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Malva	<i>Malva silvestris</i>
Cardo santo	<i>Cardus benedictus</i>	Marapuama	<i>Ptychopetalum olacoides</i>
Carobinha	<i>Jacaranda caroba</i>	Mate torrado	<i>Illex paraguariensis</i>
Carqueja (2)	<i>Baccharis gaudichaudiana</i>	Mate verde	<i>Illex paraguariensis</i>
Cáscara-sagrada (3)	<i>Rhamnus purshiana</i>	Melissa (2)	<i>Melissa officinalis</i>
Castanha-da-índia	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Pfáffia	<i>Pfaffia paniculata</i>
Catuaba (2)	<i>Trichilia catigua</i>	Quássia (2)	<i>Quassia amara</i>
Cavalinha	<i>Equisetum arvense</i>	Quebra pedra	<i>Phyllanthus niruri</i>
Centáurea menor	<i>Erythraea centaurium</i>	Quina amarela	<i>Chinchona calisaya</i>
Chá de bugre	<i>Cordia ecalculata</i>	Ratânia	<i>Krameria triandra</i>
Chapéu de couro	<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Ruibarbo	<i>Rheum palmatum</i>
Cipó-prata	<i>Banisteria argyrophylla</i>	Sabugueiro (3)	<i>Sambucus nigra</i>
Condurango	<i>Marsdenia condurango</i>	Sene (2)	<i>Cassia angustifolia</i>
Erva doce	<i>Pimpinella anisum</i>	Stévia (2)	<i>Stevia rebaudiana</i>
Escamônea	<i>Convolvulus scammonia</i>	Sucupira	<i>Bowdichia spp</i>
Estigma de milho	<i>Zea mays</i>	Tília	<i>Tilia cordata</i>
Espinheira santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Urucum	<i>Bixa orellana</i>
Fava tonka	<i>Dipteryx odorata</i>	Uva ursi	<i>Arctostaphylos uva ursi</i>
Frângula	<i>Rhamnus frangula</i>	Valeriana	<i>Valeriana officinalisL.</i>
Fucus (3)	<i>Fucus vesiculosus</i>	Verbascio	<i>Verbascum phlomoides</i>

Preparação da amostra

Porções de 10,0 g de amostra foram adicionadas a 90,0 mL de Água Peptonada Tamponada (MERCK), seguindo-se de homogeneização em agitador tipo vórtex, por 2 minutos. A partir desta diluição inicial, correspondente à diluição 10^{-1} , foram executadas diluições decimais seriadas até a diluição 10^{-7} , em Água Peptonada Tamponada (MERCK), com agitação em agitador tipo vórtex, por 2 minutos.

Enumeração de bactérias

Pela técnica de semeadura em profundidade

A técnica de plaqueamento em profundidade foi executada conforme indicado na Farmacopéia Brasileira². Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sobre as quais foram adicionados 25,0 mL de Agar caseína de soja (MERCK). Após homogeneização das placas e solidificação do agar, as placas foram incubadas em posição invertida, a $34 + 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

Pelo sistema Petrifilm® AC

Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas Petrifilm® AC (3M). Após homogeneização, com auxílio de um disco difusor, as placas foram incubadas, a $34 + 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

Enumeração de fungos

Pela técnica de semeadura em profundidade

A técnica de plaqueamento em profundidade foi executada conforme indicado na Farmacopéia Brasileira². Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sobre as quais foram adicionados 25,0 mL de Agar Sabouraud com cloranfenicol (DIFCO). Após homogeneização das placas e solidificação do agar, as placas foram incubadas em posição invertida, a $26 + 1^{\circ}\text{C}$, por 7 dias. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

Pelo sistema Petrifilm® YM

Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas Petrifilm® YM (3M). Após homogeneização, com auxílio de um disco difusor, as placas foram incubadas, a $26 + 1^{\circ}\text{C}$, por 7 dias. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada uma das 90 amostras foi analisada em triplicata, sendo calculadas as médias das contagens de bactérias e

fungos/g de amostra correspondentes aos métodos convencionais e Petrifilm® para cada uma das 64 espécies vegetais. Em seguida, estes valores foram convertidos em escala logarítmica para que assumissem distribuição normal. Cálculos estatísticos foram executados com o uso do Microsoft Excell 2000, utilizando intervalo de confiança de 95%. Para comparar os dois métodos, convencional e Petrifilm®, foi realizado estudo de regressão linear, com o cálculo dos coeficientes de correlação, coeficientes angulares e interceptos.

As Figuras 1 e 2 apresentam os gráficos de regressão linear obtidos na avaliação entre sistemas Petrifilm® e os métodos convencionais para enumeração de bactérias e fungos, respectivamente. A Tabela 1 apresenta os dados da avaliação estatística entre os métodos convencional e Petrifilm® na enumeração de microrganismos.

Na enumeração de bactérias, foi observada alta correlação entre os métodos ($r = 0,9833$), evidenciando que a contagem de bactérias utilizando as placas Petrifilm® AC foi muito próxima àquela obtida com o método convencional. O

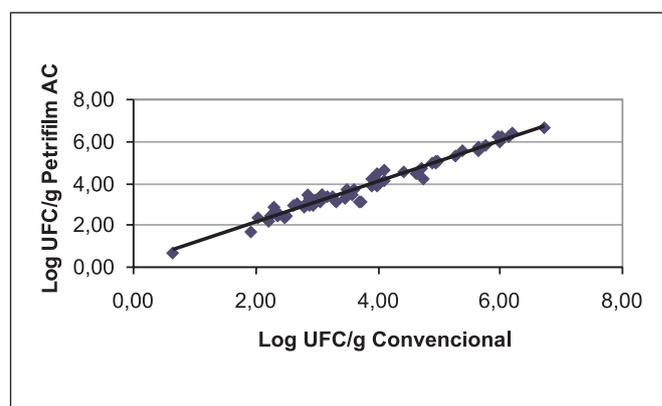


Figura 1. Dados de regressão linear entre os métodos de enumeração de bactérias utilizando semeadura em profundidade (método convencional) e sistema Petrifilm® AC ($n = 64$, $\alpha = 0,05$).

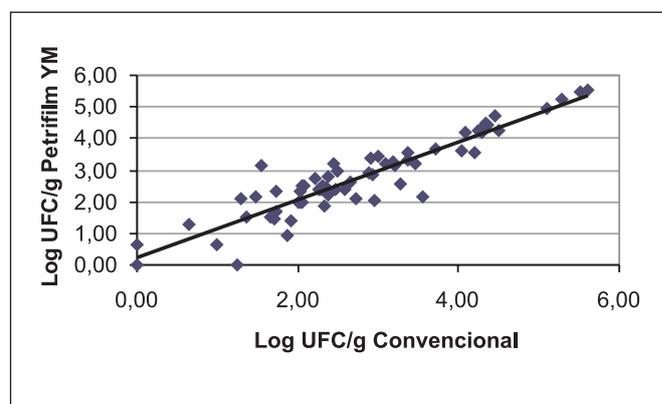


Figura 2. Dados de regressão linear entre os métodos de enumeração de fungos utilizando semeadura em profundidade (método convencional) e sistema Petrifilm® YM ($n = 64$, $\alpha = 0,05$).

Tabela 1. Dados da análise estatística entre os métodos de enumeração utilizando semeadura em profundidade (método convencional) e sistema Petrifilm®.

	Enumeração de Bactérias *		Enumeração de Fungos *	
	Convencional	Petrifilm® AC	Convencional	Petrifilm® YM
Média + Desvio padrão	3,79 + 1,29	3,87 + 1,28	2,77 + 1,25	2,77 + 1,23
Variância	1,66	1,63	1,55	1,52
	Teste F		Teste F	
Valor F _{calculado} (p) **	1,0211 (0,4671)		1,0246 (0,4616)	
	Regressão linear		Regressão linear	
Coefficiente de correlação (r)	0,9833		0,9231	
Coefficiente angular	0,9731		0,9120	
Intercepto	0,1835		0,2534	

* Valores expressos em Log₁₀ UFC/g**F_{calculado} < 1,5183 (para n = 64 e α = 0,05)

sistema Petrifilm® AC apresentou alta sensibilidade para detecção e quantificação de bactérias em relação ao método convencional, evidenciada por coeficiente angular > 0,96 e intercepto < 0,8 (0,9731 e 0,1835, respectivamente). Estes valores são similares a outras comparações³⁻¹¹, que demonstraram coeficientes de correlação entre 0,94 e 0,99 para a enumeração de bactérias, embora se verifiquem trabalhos nos quais os coeficientes de correlação são mais baixos, indicando baixa sensibilidade^{12,13}.

As médias obtidas nas contagens utilizando o método convencional e placas Petrifilm® foram 3,79 e 3,87, respectivamente, não tendo sido verificada diferença significativa entre os métodos avaliados.

A combinação destes resultados sugere que as placas Petrifilm® AC podem ser uma alternativa confiável ao método convencional de enumeração de bactérias em amostras de drogas vegetais.

Em avaliações da performance do sistema Petrifilm® YM em relação aos métodos convencionais de enumeração de bolores e leveduras, verificaram-se contagens de fungos menores, equivalentes ou maiores às obtidas pelos métodos convencionais¹⁴⁻²⁰.

Embora alguns trabalhos^{14-17,20} tenham demonstrado coeficientes de correlação entre 0,96 e 0,99 para a enumeração de fungos, neste estudo, foram observados coeficiente de correlação, coeficiente angular e intercepto iguais a 0,9231, 0,9120 e 0,2534, respectivamente, indicando existir boa correlação e sensibilidade do sistema Petrifilm® YM em relação ao método convencional. Este resultado está de acordo com o observado por Taniwaki^{18, 19} e Bovill⁵, que evidenciaram contagens superestimadas ou não possíveis de serem realizadas com a utilização de Petrifilm® YM em amostras com alta concentração de fungos filamentosos.

Todos os métodos para enumeração de microrganismos têm vantagens e desvantagens quando comparados a outros métodos e o sistema Petrifilm® não é exceção, apresentando

vantagens em relação ao método convencional como a facilidade de uso, não exigir treinamento específico para sua utilização, não exigir a preparação e esterilização de meios de cultura e de placas de Petri, permitir melhor visualização das colônias e utilizar 1/10 do espaço necessário para armazenamento e incubação das placas. Embora o tempo de incubação seja comparável entre as duas metodologias, a utilização do sistema Petrifilm® permite obter resultados mais rápidos por não haver a necessidade da preparação de meios de cultura antes da análise.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que os sistemas Petrifilm® para enumeração de bactérias e de fungos constituem-se em alternativas aos métodos convencionais de plaqueamento em ágar, para medidas mais rápidas em amostras de drogas vegetais, sem comprometer a confiabilidade e sensibilidade.

REFERÊNCIAS

- Downes FP, Ito K, editors. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington: APHA; 2001.
- Farmacopéia Brasileira, 4th ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1988.
- Beuchat LR, Copeland F, Curiale MS, Danisavich T, Gangar V, King BW et al. Comparison of the SimPlate total plate count method with Petrifilm, Redigel, and conventional Pour-Plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. *J Food Prot* 1998; 61: 14-8.
- Blackburn CW, Baylis CL, Pettit SB. Evaluation of Petrifilm methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in wide range of foods. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22: 137-40.
- Chain VS, FUNG DYC. Comparison of Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid and Aerobic Plate Count for determining the number of aerobic in selected foods. *J Food Prot* 1991; 54: 208-11.
- Cormier A, Chiasson S, Leger A. Comparison of maceration and enumeration procedures for aerobic count in selected seafoods by Standard Method, Petrifilm™, Redigel™ and Isogrid. *J Food Prot* 1993; 56: 249-51.

7. Ellis P, Meldrum R. Comparison of the Compact Dry TC and 3M Petrifilm ACP Dry Sheet Media Methods with the Spiral Plate Method for the examination of randomly selected foods for obtaining aerobic colony counts. *J Food Prot* 2002; 65: 423-5.
8. Ginn RE, Packard VS, Fox TL. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 1986; 69: 527-31.
9. Mizuochi S, Kodaka H. Evaluation of dry sheet medium culture plate (Compactdry TC) method for determining numbers of bacteria in food samples. *J Food Prot* 2000; 63: 665-7.
10. Park YH, Seo KS, Ahn JS, Yoo HS, Kim SP. Evaluation of Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retailed meat samples. *J Food Prot* 2001; 64: 1841-3.
11. Senyk GF, Kozlowski SM, Noar PS, Shipe WF, Bandler DK. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci*, 1987; 70: 1152-8.
12. Hayes MC, Ralyea RD, Murphy SC, Carey NR, Scarlett JM, Boor KJ. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. *J Dairy Sci* 2001; 84: 292-8.
13. Pattison TL, Geornaras I, Holy AV. Microbial populations associated with commercially produced South African sorghum beer as determined by conventional and Petrifilm plating. *Int J Food Microbiol* 1998; 43: 115-22.
14. Beuchat LR, Nail BV, Brackett RE, Fox TL. Evaluation of a culture film (Petrifilm™ YM) method for enumeration of yeasts and molds in selective dairy and high-acid foods. *J Food Prot* 1990; 53: 869-74.
15. Beuchat LR, Nail BV, Brackett RE, Fox TL. Comparison of Petrifilm™ yeast and mold culture film method to conventional methods for enumerating yeasts and molds in foods. *J Food Prot* 1991; 54: 443-7.
16. Bovill R, Bew J, Robinson S. Comparison of selective media for the recovery and enumeration of probiotic yeasts from animal feed. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 55-61.
17. Spangenberg DS, Ingham SC. Comparison of methods for enumeration of yeasts and molds in shredded low-moisture, part-skim mozzarella cheese. *J Food Prot* 2000; 63: 529-33.
18. Taniwaki MH, Iamanaka BT, Banhe AA. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulps. *J Food Mycol* 1999; 2: 291-302.
19. Taniwaki MH, Silva N, Banhe AA, Iamanaka, BT. Comparison of culture media, Simplate, and Petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *J Food Prot* 2001; 64: 1592-6.
20. Vlaemyneck GM. Comparison of Petrifilm™ and plate count methods for enumerating molds and yeasts in cheese and yogurt. *J Food Prot* 1994; 57: 913-4.