



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - CAMPUS I  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE FARMÁCIA**

**NADJAELE DE MELO APOLINÁRIO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MULTIRRESISTÊNCIA EM LINHAGENS DE  
*ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - LAC/UEPB**

**CAMPINA GRANDE  
2014**

**NADJAELE DE MELO APOLINÁRIO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MULTIRRESISTÊNCIA EM LINHAGENS DE  
*ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - LAC/UEPB**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Departamento de Farmácia da Universidade  
Estadual da Paraíba, como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Raíssa Mayer Ramalho Catão

**CAMPINA GRANDE  
2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A643a Apolinário, Nadjaele de Melo.

Atividade antimicrobiana e multirresistência em linhagens de Escherichia Coli isoladas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual Da Paraíba - LAC/UEPB [manuscrito] / Nadjaele de Melo Apolinario. - 2014.

72 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Raissa Mayer Ramalho Catão, Departamento de Farmácia".

1. Escherichia coli. 2. Resistência bacteriana. 3. Produtos vegetais. I. Título.

21. ed. CDD 579

NADJAELE DE MELO APOLINÁRIO

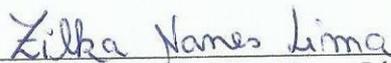
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MULTIRRESISTÊNCIA EM LINHAGENS DE  
*ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - LAC/UEPB**

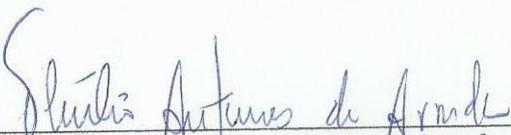
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 21 / 11 / 2014.

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raíssa Mayer Ramalho Catão  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> MS. Zilka Nanes Lima  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e apoio,  
DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Ao meu pai Apolinário e a minha mãe Carmem Lúcia, exemplos de perseverança, coragem e fé, pelo apoio incondicional.

À minha irmã Nadyely, pelo carinho e companheirismo.

A Marcus Vinícius, pelo amor, cumplicidade e palavras de incentivo.

À professora Dr<sup>a</sup> Raïssa Mayer Ramalho Catão, pelas orientações indispensáveis recebidas ao longo desse trabalho e pela dedicação.

À professora Ms. Zilka Nanes Lima, por sua amizade, motivação e disponibilidade.

Ao professor Dr. Thúlio Antunes de Arruda, pela aprendizagem adquirida ao longo da graduação, pelo incentivo e entusiasmo contagiante.

Aos funcionários da UEPB, Luis Augusto Pereira Silva, Silvana Brito Camelo e Wilma Raianny pela presteza e atendimento quando necessário.

Aos colegas de classe pelos momentos de amizade e apoio.

“Confia no teu Deus de todo o teu coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer e Ele lhe mostrará o caminho a seguir. A humildade vai adiante da honra!”

Provérbio Bíblico

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MULTIRRESISTÊNCIA EM LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - LAC/UEPB

APOLINÁRIO, Nadjale de Melo; CATÃO, Raissa Mayer Ramalho

## RESUMO

Os bastonetes Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae estão associados a diversos tipos de infecção, especialmente as infecções no trato urinário (ITU) e em infecções nosocomiais. Destacando-se espécies de *Escherichia coli* que têm sido amplamente estudadas por sua patogenicidade e multirresistência, sendo necessários estudos de avaliação do perfil de sensibilidade às diferentes classes de antibióticos para a terapia apropriada destes processos infecciosos. O objetivo deste trabalho foi determinar o comportamento de linhagens de *E. coli* isoladas de pacientes ambulatoriais atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba – LAC/UEPB e pertencentes à coleção do setor de Microbiologia desta Instituição de Ensino Superior (IES). As 11 linhagens de *E. coli* multirresistentes mantidas sob refrigeração foram reativadas e testadas através do método de disco difusão em placa com ágar Müller Hinton, quanto a sua sensibilidade frente aos antimicrobianos convencionais de uso rotineiro na clínica médica e também frente a produtos de origem vegetal. Os ensaios foram realizados em duplicata e as placas ficaram incubadas em estufa a 37°C/24h. Os resultados foram expressos pela média aritmética dos ensaios. Utilizou-se para tanto tinturas das plantas: *Arnica montana* (Arnica), *Calendula officinalis* (Calêndula), *Echinacea purpurea* (Equinácea), *Erythrina mulungu* (Mulungu), *Eucalyptus globulus* (Eucalipto), *Matricaria chamomilla* (Camomila), *Maytenus ilicifolia* (Espinheira santa), *Stryphnodendron barbatimam* (Barbatimão) e *Thuya occidentalis* (Thuya); bem como, óleos essenciais das plantas: *Citrus bergamia* (Bergamota), *Cymbopogon citratus* (Capim Santo), *Cymbopogon nardus* (Citronela), *Lavandula officinalis* (Lavanda), *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) e *Zingiber officinale* (Gengibre). A análise do comportamento das linhagens de *E. coli* demonstrou que dos 18 antimicrobianos testados, 5 (28%) apresentaram ineficácia frente a todas as linhagens bacterianas analisadas, foram eles: ampicilina, ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino e ácido nalidíxico. Quanto às cefalosporinas de segunda à quarta geração, 10 (91%) das linhagens demonstraram-se sensíveis a estes antimicrobianos. Todas as linhagens testadas foram sensíveis à ação do imipenem. Os resultados dos ensaios com produtos vegetais demonstraram que as tinturas não apresentaram atividade frente às linhagens testadas. Entretanto, dentre os óleos essenciais 4 apresentaram atividade antibacteriana. Os óleos ativos foram: *Cymbopogon citratus* (Capim Santo), *Cymbopogon nardus* (Citronela), *Lavandula officinalis* (Lavanda), e *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca). Os halos de inibição de crescimento formados variaram entre 12 e 16 mm. Sugere-se o desenvolvimento de novos estudos utilizando outros métodos, bem como a utilização de extratos obtidos com outros solventes, frente a fungos e outras espécies bacterianas. Desta forma, o potencial do uso dos produtos vegetais como coadjuvante no tratamento de doenças infecciosas, poderá ser melhor elucidado.

**Palavras-Chave:** *Escherichia coli*. Resistência bacteriana. Produtos vegetais.

# ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND MULTIRESISTANCE IN STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED IN CLINICAL LABORATORY ANALYSIS OF UNIVERSITY OF PARAÍBA - LAC / UEPB.

APOLINÁRIO, Nadjale de Melo; CATÃO, Raissa Mayer Ramalho

## ABSTRACT

The Gram negative rods belonging to the Enterobacteriaceae family are associated with many types of infections, especially urinary tract infections (UTI) and nosocomial infections. Highlighting species of *Escherichia coli* that have been widely studied because for their pathogenicity and multidrug resistance, are needed studies assessing the sensitivity profile to different classes of antibiotics for proper treatment of these infectious processes. The objective of this study was to determine the behavior of strains of *E. coli* isolated from outpatients treated at the Clinical Analysis Laboratory, State University of Paraíba - LAC / UEPB and from the collection of the Microbiology of this sector Higher Education Institution (HEI). The 11 multiresistant strains of *E. coli* kept under refrigeration were reactivated and tested by the disk diffusion method on Muller Hinton agar plate, as its sensitivity to conventional antimicrobials routinely used in clinical medicine and with against products of plant origin. Assays were performed in duplicate and the plates were incubated in a 37 ° C / 24h. Results were expressed as the arithmetic average of the trials. Was used for tinctures plants: *Arnica montana* (Arnica), *Calendula officinalis* (Calendula), *Echinacea purpurea* (Echinacea), *Erythrina mulungu* (Mulungu), *Eucalyptus globulus* (Eucalyptus), *Matricaria chamomilla* (Chamomile), *Maytenus ilicifolia* (Holy thorn) *Stryphnodendron barbatimam* (Barbatimão) and *Thuya occidentalis* (Thuya); as well as essential oils of plants: *Citrus bergamia* (Bergamot), *Cymbopogon citratus* (Lemongrass), *Cymbopogon nardus* (Citronella), *Lavandula officinalis* (Lavender), *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) and *Zingiber officinale* (Ginger). The behavior of strains of *E. coli* showed that of the 18 antimicrobials tested, 5 (28%) were ineffective against all bacterial strains examined, they were: ampicillin, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin and nalidixic acid. Regarding cephalosporins of second to fourth generation, 10 (91%) of the strains demonstrated to be sensitive to these antibiotics. All strains tested were susceptible to the action of imipenem. The results of trials with plant products showed that tinctures showed no activity ahead of the tested strains. However, among the four essential oils showed antibacterial activity. The oils were active: *Cymbopogon citratus* (Lemongrass), *Cymbopogon nardus* (Citronella), *Lavandula officinalis* (Lavender) and *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca). The zones of growth inhibition formed ranged from 12 to 16 mm. It is suggested the development of new studies using other methods, as well as the use of extracts obtained with other solvents, against fungi and other bacterial species. Therefore, the use potential of plant products as an adjunct in the treatment of infectic diseases can be better elucidated.

**Keywords:** *Escherichia coli*. Bacterial resistance. Plant products.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	Objetivo geral .....	13
2.2	Objetivos específicos .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>3.1</b>	<b>Enterobacteriaceae - Uma visão geral</b> .....	14
<b>3.2</b>	<b>Características da <i>Escherichia coli</i></b> .....	16
3.2.1	Patogenicidade .....	17
3.2.2	Estrutura antigênica .....	18
3.2.3	Principais sorotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	19
<b>3.3</b>	<b>Antibióticos e resistência bacteriana</b> .....	21
3.3.1	Principais mecanismos de ação dos antibióticos .....	22
3.3.2	Principais mecanismos de resistência bacteriana .....	24
3.3.2.1	Beta-Lactamases de Espectro Estendido .....	26
<b>3.4</b>	<b>Atividade antimicrobiana de produtos vegetais</b> .....	30
<b>3.5</b>	<b>Considerações gerais sobre algumas plantas medicinais</b> .....	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
<b>4.1</b>	<b>Material vegetal</b> .....	33
<b>4.2</b>	<b>Micro-organismos estudados</b> .....	33
<b>4.3</b>	<b>Cultivo bacteriano e testes para a confirmação da identificação</b> .....	33
<b>4.4</b>	<b>Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos</b> .....	33
<b>4.5</b>	<b>Ensaio com produtos vegetais</b> .....	34
4.5.1	Preparação do inóculo .....	34
4.5.2	Determinação da atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
<b>5.1</b>	<b>Determinação do perfil fenotípico de linhagens de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes frente a antimicrobianos tradicionais</b> .....	36
<b>5.2</b>	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana de produtos vegetais frente à <i>E.coli</i> ATCC 25299 e determinação da Concentração Inibitória Mínima</b>	38
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	43

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>ANEXOS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

No decorrer das últimas décadas, foram descobertas numerosas classes de antimicrobianos e hoje estão disponíveis centenas de fármacos. De todos os fármacos, os antimicrobianos estão entre os mais comumente utilizados, no entanto, estão também entre os fármacos mais utilizados de forma incorreta. De acordo com Goodman e Gilman (2005), embora sejam universalmente reconhecidos pela sua ausência de atividade antiviral, 50% ou mais dos pacientes com diagnóstico de infecção viral das vias respiratórias são tratados com terapia antimicrobiana. Como consequência inevitável do uso disseminado dos antimicrobianos surge agentes infecciosos resistentes a antibióticos, levando a uma necessidade cada vez mais crescente de novos fármacos e contribuindo para os altos custos da assistência médica. Além disso, apenas um número reduzido de novos agentes antimicrobianos tem sido introduzido na prática clínica durante a última década.

O autor afirma que os micro-organismos possuem uma grande facilidade para trocar material genético (DNA) entre cepas da mesma espécie e mesmo entre espécies diferentes, podendo ocorrer amplas variações na sensibilidade de diferentes cepas da mesma espécie bacteriana aos agentes antimicrobianos. De modo que antes de escolher o fármaco, é essencial obter informações sobre o perfil de sensibilidade do micro-organismo infectante.

A resistência aos antibióticos é manifestamente uma das principais causas da reemergência das doenças infecciosas e do aumento da morbidade, mortalidade e custos em saúde decorrente da redução das opções terapêuticas eficazes contra os micro-organismos resistentes. Por mais rápido que se desenvolvam novos antibióticos, os organismos são capazes de desenvolver resistência contra eles. Tal aumento de resistência aos antibióticos comumente usados é, atualmente, uma das maiores preocupações da saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos. As diversas ações internacionais conjuntas que têm sido desenvolvidas nas últimas décadas, com vista à vigilância e controle das resistências dos micro-organismos aos antibióticos, são reflexos da importância que se atribui a este fenômeno a nível mundial (SILVA, 2009).

Esta resistência prolifera-se rapidamente através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias Gram negativas, dentre elas, *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae e principal agente causador de infecções no trato urinário e de sepse (SILVA, 2011).

A terapia antibiótica com drogas convencionais é efetiva no tratamento das infecções bacterianas, no entanto, a crescente descoberta de novos mecanismos de resistência bacteriana, exige a contínua busca por novas soluções e terapias. Dessa forma, a investigação

da potencialidade antimicrobiana de produtos vegetais está em constante expansão. Os compostos provenientes de extratos de plantas podem contribuir para o desenvolvimento de antibióticos mais eficazes e menos tóxicos, na corrida contra a resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (OSTROSKY, 2009).

Desta forma o conhecimento sobre o potencial terapêutico dos vegetais tem despertado o interesse científico, trazendo novas possibilidades para o controle e tratamento de diversas doenças. Pesquisas de tal natureza no Brasil são de grande valor, pelo fato do país ser considerado um dos maiores reservatórios de biodiversidade do mundo e, além disso, a grande extensão territorial abriga diversos tipos de ecossistemas, cada um com suas particularidades, o que, segundo Ferreira et al. (2011), o torna verdadeira fonte quase que inesgotável de moléculas a serem descobertas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a suscetibilidade de linhagens de *Escherichia coli* frente a drogas antimicrobianas sintéticas e naturais.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar o perfil de sensibilidade de linhagens ambulatoriais de *E.coli* aos agentes antimicrobianos utilizados rotineiramente na clínica médica;
- Determinar o perfil de sensibilidade de linhagens de *E.coli* frente a produtos vegetais;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos vegetais ativos frente às cepas de *E.coli*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Enterobacteriaceae - Uma visão geral

A família Enterobacteriaceae talvez seja a mais importante família bacteriana. Pertence a ela um dos micro-organismos mais conhecido e estudado, a *E.coli*, além e muitos dos patógenos importantes para homem e animais. Com relação ao homem, estes patógenos estão entre os principais agentes de infecção hospitalar e, sem dúvida, constituem a principal causa de infecção intestinal em muitos países. As suas relações com os animais também interessam ao homem não só porque causam perdas econômicas, mas porque os animais representam um vasto reservatório de patógenos humanos. Tais razões explicam o fato de poucos micro-organismos serem tão estudados quanto os membros mais importantes da família (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

As bactérias da família Enterobacteriaceae formam uma ampla família de bastonetes Gram negativos, encontrados com maior frequência no cólon de humanos e outros animais, como membros da microbiota normal. Apesar de seus representantes estarem taxonomicamente agrupados na mesma família, eles causam uma variedade de doenças com diferentes mecanismos de patogenicidade. As características comuns a todos os membros dessa família são sua localização anatômica e os quatro processos metabólicos seguintes: todos são anaeróbios facultativos, fermentadores da glicose (a fermentação de outros açúcares é variável), não apresentam a enzima citocromo oxidase e são capazes de reduzir nitratos a nitritos como parte de seus processos geradores de energia. Essas quatro reações podem ser utilizadas para diferenciar as Enterobacteriaceae de outros grupos de organismos de importância médica, dentre eles, os bacilos Gram negativos não fermentadores, com destaque para *Pseudomonas aeruginosa* (LEVINSON, 2010).

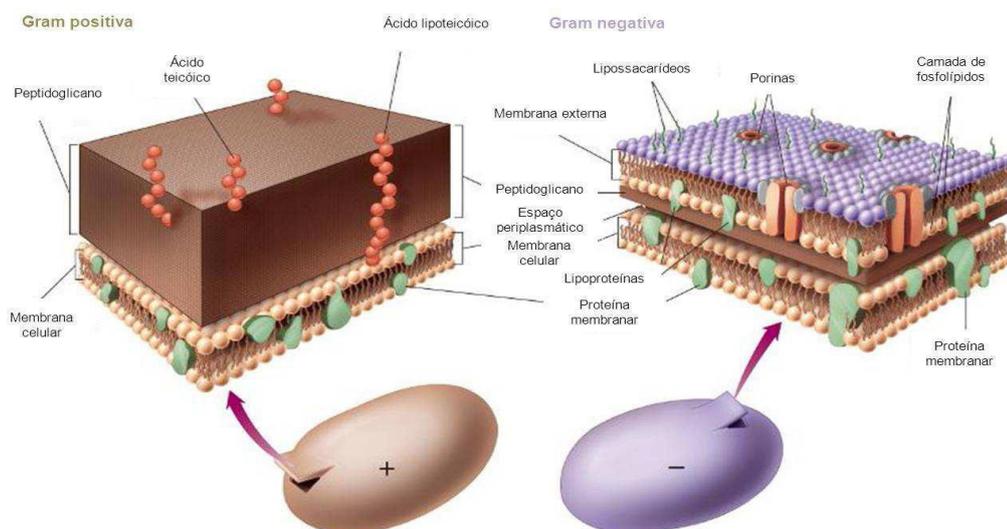
Quanto à patogênese, todos os membros da família Enterobacteriaceae, por serem bastonetes Gram negativos, contém endotoxinas em suas paredes celulares. Além de todos os fatores comuns aos membros da família, as cepas de *E. coli* possuem ainda outros fatores de virulência, específicos, que podem ser organizados em duas categorias principais: adesinas e exotoxinas. O lipopolissacarídeo (LPS) termoestável é o principal antígeno da parede celular e consiste de três componentes: o polissacarídeo somático O mais externo, um polissacarídeo central comum a todas as enterobactérias e o lipídeo A. O polissacarídeo central é importante para a classificação do micro-organismo como um membro da família Enterobacteriaceae; o polissacarídeo O é importante para a classificação epidemiológica das linhagens dentro da

espécie; e o lipídio A, componente do LPS, é responsável pela atividade endotóxica, um importante fator de virulência (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Segundo Trabulsi e Altherthum (2005), as enterobactérias são capazes de causar infecções intestinais e extraintestinais, as últimas podem ser localizadas ou sistêmicas. As infecções localizadas mais frequentes são as das vias urinárias, dos pulmões, do sistema nervoso central, da pele e do tecido celular subcutâneo (feridas). Tanto as infecções intestinais como as extraintestinais podem permanecer localizadas ou se transformarem em infecções sistêmicas; as septcemia são bastante frequentes. Estas também podem ocorrer em consequência da translocação para a corrente sanguínea de enterobactérias presentes nos intestinos, sendo favorecida por diferentes fatores.

A identificação de bastonetes Gram negativos é de grande importância devido a sua resistência elevada a vários antibióticos e capacidade de causar infecções graves, podendo estar associados a diversos processos infecciosos tanto em pacientes nosocomiais quanto em pacientes ambulatoriais.

A principal diferença entre bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas está na composição da parede celular. A parede das bactérias Gram negativas é mais complexa. A presença da membrana externa nas Gram negativas confere características bastante peculiares quando comparadas com as Gram positivas, constituindo uma barreira adicional à entrada de certas substâncias como antibióticos e alguns corantes. Isso explica parcialmente a razão pela qual as bactérias Gram negativas geralmente são mais resistentes aos antibióticos do que as Gram positivas (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).



**Figura 1** – Parede celular das bactérias Gram positiva e Gram negativa

Fonte: <http://sureshtvn.blogspot.com.br/2013/10/gram-positive-and-gram-negative.html>

Para diagnóstico laboratorial, amostras suspeitas de conter membros da família Enterobacteriaceae e outros micro-organismos relacionados são frequentemente inoculados em meios de cultura seletivos e diferenciais tais como: ágar MacConkey e ágar Eosin Methylene Blue (EMB). O critério metabólico básico levado em consideração quanto à capacidade diferencial desses meios é baseado na propriedade dos principais patógenos – *Salmonella* e *Shigella* – não fermentarem a lactose, apresentando colônias incolores nesses meios, enquanto os fermentadores como a *E. coli* formam colônias coloridas (SANTOS FILHO, 2006).

O tratamento adequado de infecções causadas por esses micro-organismos deve ser vinculado individualmente à sensibilidade dos mesmos, aos antibióticos. A seleção ideal e criteriosa dos antimicrobianos, na terapia das doenças infecciosas, exige discernimento clínico e conhecimento detalhado dos fatores farmacológicos e microbiológicos. De modo geral, uma ampla variedade de agentes antimicrobianos é potencialmente efetiva, por exemplo, algumas penicilinas e cefalosporinas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclina, quinolonas e sulfonamidas (GOODMAN; GILMAN, 2005; LEVINSON, 2010).

Apesar da diversidade de mecanismos de ação dos antimicrobianos, muitos isolados desses bastonetes entéricos Gram negativos, são altamente resistentes a antibióticos devido à produção de enzimas inativadoras dos mesmos. Estas enzimas promovem a transferência de agrupamentos químicos ou possuem atividade hidrolítica, como as beta-lactamases que clivam anéis beta-lactâmicos de penicilinas e cefalosporinas, desencadeando a perda da função antimicrobiana. Esses organismos frequentemente realizam conjugação, adquirindo plasmídeos que medeiam à resistência a múltiplos fármacos (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

### **3.2 Características da *Escherichia coli***

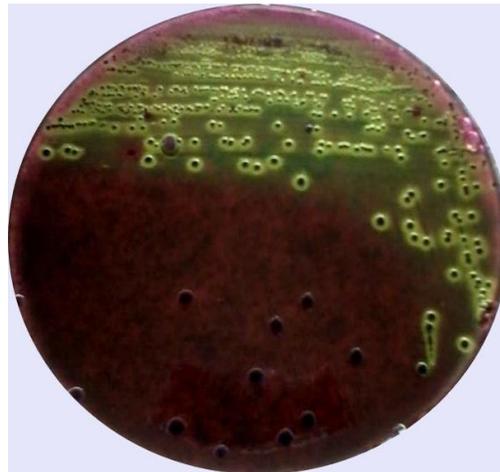
*Escherichia coli* é o mais comum e mais importante membro do gênero *Escherichia*. Este micro-organismo está associado a uma variedade de doenças, incluindo gastroenterite e infecções extraintestinais como infecções do trato urinário, meningites e sepses (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A *E. coli* tem propriedades semelhantes às de outras Enterobacteriaceae. São anaeróbicas facultativas, oxidase-negativas, fermentam a glicose e podem gerar energia por redução de nitratos e nitritos. É uma bactéria não esporulada, em sua maioria móvel e cresce em temperaturas de 18 a 44°C sendo 37°C é a temperatura ideal (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Essa bactéria também é caracterizada por suas propriedades bioquímicas; positiva para reação para indol, lisina, motilidade e reação de vermelho de metila; negativa para testes para

urease e hidrogênio e utilização de citrato. Além disso, algumas linhagens podem produzir  $H_2S$ . A produção de gás e ácido ocorre posteriormente à fermentação de manitol, glicose, sorbitol, ramanose, maltose, manose, xilose, arabinose e glicerol (ANDREATTI FILHO, 2007).

Em Ágar Eosin Methylene Blue (EMB), as colônias de *E. coli*, geralmente, apresentam um brilho metálico característico de cor esverdeada.



**Figura 2** – Placa de Ágar EMB apresentando colônias de *E.coli* com brilho metálico característico de cor esverdeada

Fonte: Dados da pesquisa (2014)

### 3.2.1 Patogenicidade

O conceito de patogenicidade está relacionado à capacidade de um micro-organismo causar a enfermidade. Os micro-organismos da mesma espécie se diferenciam uns dos outros por possuírem ou expressarem genes de virulência que proporcionam colonização e expressão de inúmeros mecanismos que dificultam o combate do hospedeiro, ocasionando assim a doença. De acordo com o sorogrupo e com a presença de genes de virulência as linhagens de *E.coli* podem causar desde quadro leves de diarreia até doenças septicêmicas graves. Adesinas, sistema de captação de ferro, invasinas, toxinas e os fatores, inibitórios do sistema imune do hospedeiro e genes de resistência a antimicrobianos são os genes mais importantes de virulência (VIEIRA, 2009).

### 3.2.2 Estrutura antigênica

A *E.coli* possui três antígenos utilizados para a identificação do organismo em investigações epidemiológicas: o antígeno da parede celular ou antígeno O, o antígeno flagelar ou antígeno H e o antígeno capsular ou antígeno K. Além de vários componentes

claramente identificados que contribuem para a sua capacidade de causar doença: endotoxina e exotoxinas (enterotoxinas), os *pili* e uma cápsula. As várias combinações desses antígenos resultam em mais de mil tipos antigênicos de *E. coli*. Sorotipos específicos estão associados a determinadas doenças; por exemplo, o antígeno O55 e o antígeno O111 causam epidemias de diarreia neonatal, já o antígeno O157 é a causa mais comum de colite hemorrágica. (LEVINSON, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O antígeno somático O corresponde ao lipopolissacarídeo (LPS), elemento termo-resistente que se projeta da membrana externa para o ambiente extracelular. O lipídeo A (endotoxina), componente do LPS, é liberado durante a multiplicação ou após a morte da bactéria, atua na ativação de macrófagos e de mediadores da inflamação (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

De acordo com Murray, Rosenthal e Pfaller (2009), a endotoxina é um fator de virulência encontrado em bactérias Gram negativas aeróbias e algumas anaeróbias. A atividade dessa toxina depende do lipídeo A. Muitas manifestações sistêmicas das infecções por bactérias Gram negativas são iniciadas pela endotoxina que ativa o complemento, causa liberação de citocinas, leucocitose, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, febre, diminuição da circulação periférica, choque e morte.

Antígenos flagelares H são compostos proteicos não utilizados com frequência na identificação antigênica das cepas de *E. coli*, nem a sua patogenicidade tem sido relacionada à presença do flagelo (ANDREATTI FILHO, 2007). Enquanto que os antígenos capsulares K são polissacarídeos capsulares relacionados à resistência bacteriana perante o sistema complemento (FERREIRA; KNÖBL, 2009). As Enterobacteriaceae encapsuladas são protegidas da fagocitose pelos antígenos capsulares hidrofílicos, que repelem a superfície hidrofóbica da célula fagocítica. Estes antígenos interferem com a ligação dos anticorpos na bactéria, são pouco imunogênicos e incapazes de ativar o complemento. O papel protetor da cápsula diminui, se o paciente desenvolve anticorpos específicos contra a cápsula (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Os antígenos fimbriais F, também chamados de adesinas, *pili* ou fímbrias, são moléculas proteicas que recobrem a superfície bacteriana, capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas. A expressão de adesinas é considerada um gene de virulência fundamental para aderência e colonização dos tecidos do hospedeiro. Elas também conferem especificidade de aderência da bactéria em relação a determinados tecidos e órgãos do hospedeiro. Embora essas adesinas apresentem poucas diferenças morfológicas existem características antigênicas e hemaglutinantes distintas (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

### 3.2.3 Principais sorotipos de *Escherichia coli*

Com base nos mecanismos de virulência específicos das linhagens patogênicas, a espécie pode ser classificada em pelo menos cinco sorotipos que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos, são elas: *E.coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E.coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC); e várias outras especificamente associadas com infecções urinárias, *E. coli* uropatogênica (UPEC); meningites e provavelmente outras infecções extraintestinais (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

A EPEC foi a primeira *E.coli* associada à doença diarreica e permanece a principal causa de diarreia infantil em países pobres. O termo EPEC é empregado para espécies de *E. coli* diarreicogênicas que não produzem nenhuma enterotoxina, mas que causam a lesão histopatológica característica determinada pela ligação íntima e desvanecimento das microvilosidades dos enterócitos, lesão essa que leva a uma pronunciada disfunção na absorção intestinal. Os principais sintomas da doença causada por EPEC são diarreia aquosa, em vários graus de intensidade, e desidratação (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A ETEC é a causa mais provável da maioria dos casos de diarreia dos viajantes. A infecção se dá pela via oral e a fixação no epitélio do intestino delgado ocorre pela ação de adesinas fimbriais. Após a aderência entre a bactéria e a célula hospedeira há produção de enterotoxinas que estimulam a secreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, ocasionando diarreia líquida, desidratação, acidose metabólica e morte. Grandes quantidades de LPS podem ser liberadas, aumentando o número de fatores de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina L-1 e L-6 que contribuam para um quadro de choque (HIRSH, 2003).

A ETEC produtora de toxina *Shiga* é um dos patógenos mais importantes para saúde pública. Embora sua maior característica seja a produção da *shiga* toxina, ela é atribuída a algumas doenças veiculadas aos alimentos, principalmente produtos cárneos, sendo capaz de colonizar o epitélio intestinal, já que apresenta como um importante fator de virulência: a sua capacidade de se aderir a mucosa intestinal. As bactérias destroem as microvilosidades e induzem a formação de projeções semelhantes a pedestais, onde se alojam (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; CADONA et al., 2013).

Outra linhagem que é cada vez mais reconhecida como causa da diarreia do viajante, possivelmente a segunda causa depois da ETEC, é a EAEC. Este grupo de coliformes é assim denominado por uma forma de crescimento na qual as bactérias aderem-se umas às outras em uma configuração de “tijolos empilhados”. Produzem toxinas termolábeis (LT), toxinas

termoestáveis enteroagregativas codificadas por um plasmídeo (eae-1), toxinas termoestáveis (ST), toxina do tipo hemolisina e em alguns casos produzem Shiga-toxinas. Essas toxinas auxiliam a instalação da infecção (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A EIEC invade a parede intestinal resultando em inflamação, febre e, algumas vezes, uma disenteria semelhante à causada pela *Shigella*, devido às suas propriedades fenotípicas e patogênicas análogas. As bactérias são capazes de invadir e destruir o epitélio do cólon, produzindo uma doença caracterizada inicialmente pela diarreia aquosa. Em uma minoria de pacientes, a doença progride para uma forma de disenteria, consistindo de febre, dores abdominais, sangue e leucócitos nos espécimes fecais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Vários genes plasmidiais estão envolvidos na invasão da bactéria ao epitélio do cólon. As bactérias lisam os vacúolos fagocíticos e se multiplicam no citoplasma da célula. O movimento dentro do citoplasma em direção às células epiteliais adjacentes é regulado pela formação de filamentos de actina. Este processo de destruição de células epiteliais com infiltração inflamatória pode avançar causando ulceração do cólon (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

As bactérias EHEC aderem-se à parede epitelial, destruindo a superfície das microvilosidades e causando a formação de projeções sobre as quais se apoiam. A função destas estruturas ricas em actina ainda não está elucidada, mas elas facilitam a disseminação das bactérias para as células adjacentes. A maioria das infecções é atribuída ao consumo de carne moída malcozida ou outros produtos derivados da carne, água, leite não pasteurizado, suco de frutas, vegetais malcozidos, como espinafre e frutas. (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A *E. coli* é o principal agente causador das infecções do trato urinário, capaz de invadir e de se replicar dentro das células uroepiteliais. Estima-se que a *E. coli* uropatogênica (UPEC) seja responsável por 85% a 90% dos casos de ITU, os quais são mais frequentes em mulheres devido à posição anatômica. Essas amostras formam um grupo geneticamente heterogêneo, que difere entre si de forma relevante quanto a capacidade de colonizar e de persistir no interior da bexiga e dos rins. (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005; MOURA; FERNANDES, 2010).

A maioria das cepas de *E. coli* pode produzir ITUs, entretanto a doença é mais comum em alguns sorogrupos específicos. Estas bactérias são particularmente virulentas, pois possuem a capacidade de produzir adesinas que se ligam às células que revestem a bexiga e o trato urinário superior (a aderência impede a eliminação da bactéria durante a micção) e produzem a hemolisina HlyA, que lisa os eritrócitos e outros tipos celulares, levando à

liberação de citocina e estimulando uma resposta inflamatória (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A maioria das infecções, exceto a meningite neonatal e gastroenterite, é endógena; isto é, a *E.coli* que faz parte da flora normal do paciente é capaz de estabelecer a infecção quando as defesas do paciente estão comprometidas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Assim, a fonte de *E. coli* responsável por ITUs consiste na microbiota do paciente, que coloniza a região urogenital. A fonte de *E. coli* que provoca meningite neonatal é o canal de parto materno, a infecção é adquirida durante o nascimento. Em contra partida, a *E. coli* responsável pela diarreia do viajante é adquirida pela ingestão de alimento ou água contaminados por fezes humanas (LEVINSON, 2010).

### **3.3 Antibióticos e resistência bacteriana**

A essência da terapia antimicrobiana é a toxicidade seletiva, isto é, a inibição seletiva do crescimento do micro-organismo sem danos ao hospedeiro. A toxicidade seletiva é obtida explorando-se as diferenças entre o metabolismo e estrutura do micro-organismo e as características correspondentes das células humanas (LEVINSON, 2010).

Os antibióticos interferem em diferentes atividades da célula bacteriana, causando a sua morte ou somente inibindo o seu crescimento. Os primeiros são chamados bactericidas e os segundos, bacteriostáticos. Do ponto de vista clínico, tanto os bacteriostáticos quanto os bactericidas são extremamente eficientes. Entretanto, em se tratando de pacientes com defesas imunológicas reduzidas, é preferível o uso de bactericidas (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

Esses fármacos têm contribuído para a redução dos índices de mortalidade e morbidade das diferentes doenças infecciosas, no entanto, a racionalização do seu uso demanda uma ação multidisciplinar. O uso indiscriminado e incorreto dos antibióticos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para o aparecimento e a disseminação da resistência bacteriana (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

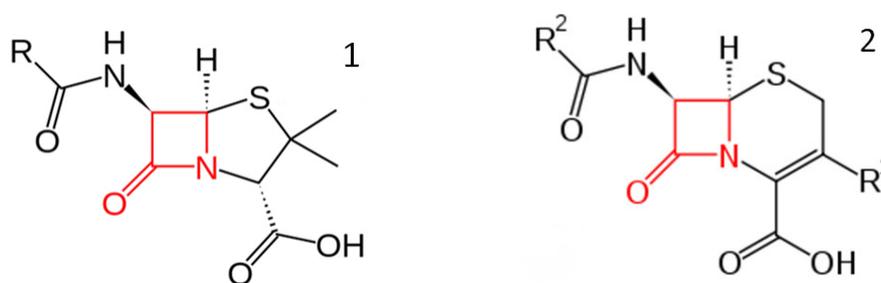
Conforme Levinson (2010), a probabilidade significativamente aumentada de infecções hospitalares serem causadas por micro-organismos resistentes a antibióticos, quando comparadas às infecções adquiridas na comunidade; especialmente quando estão envolvidos *Staphylococcus aureus* e bastonetes entéricos Gram negativos como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* ocorre devido à ampla utilização de antibióticos em hospitais, promovendo a seleção destes micro-organismos. Além disso, as linhagens hospitalares são frequentemente resistentes a múltiplos antibióticos.

Grande parte da resistência ao fármaco deve-se a uma modificação genética do organismo, ou por uma mutação cromossomal ou através da aquisição de um plasmídeo ou transposon. A resistência intrínseca é uma característica natural de determinadas bactérias, sendo espécie ou gênero-específica, delimitando o espectro de atividade dos antibióticos. Esse tipo de resistência pode, por muitas vezes, ser utilizada para confirmar a correta identificação de uma bactéria. A resistência adquirida, por sua vez, pode ser obtida por diferentes mecanismos genéticos, tais como: mutação, que pode ser benéfica para a bactéria, tornando-a resistente a ação de um antibiótico e oferecendo uma vantagem competitiva em seu ambiente; ou transferência de DNA (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

### 3.3.1 Principais mecanismos de ação dos antibióticos

Os antibióticos podem ser divididos em dois grandes grupos: beta-lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos; e não beta-lactâmicos como os aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas, entre outros (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

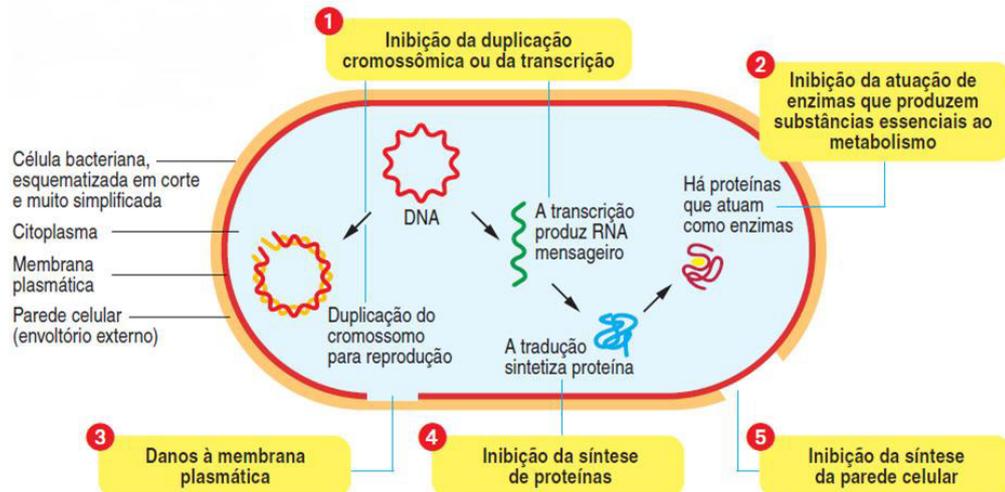
Todos os beta-lactâmicos possuem em comum o anel beta-lactâmico, composto por três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio, conforme pode ser observado na figura 3.



**Figura 3** – Estrutura do núcleo de penicilinas (1) e cefalosporinas (2). Anel beta-lactâmico em vermelho

Fonte: [http://medlibrary.org/medwiki/Beta-lactam\\_antibiotics](http://medlibrary.org/medwiki/Beta-lactam_antibiotics)

Os antibióticos são agrupados em classes, de acordo com sua estrutura química e mecanismos de ação. A estrutura molecular define os mecanismos de ação. As interações dos antibióticos com a célula bacteriana podem ocorrer no nível da parede celular (estrutura e biossíntese), membrana citoplasmática (estrutura e função), síntese de proteínas e síntese de ácidos nucleicos, conforme ilustra a figura a seguir (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).



**Figura 4** – Principais mecanismos de ação dos antibióticos sobre as bactérias

Fonte: [http://proteinafmetro2013.blogspot.com.br/2013/05/biossintese-proteica\\_18.html](http://proteinafmetro2013.blogspot.com.br/2013/05/biossintese-proteica_18.html)

a. Inibição da síntese da parede celular bacteriana: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos

A união de precursores durante a síntese da parede celular é uma reação catalisada por enzimas específicas. Participam desse processo proteínas reguladoras, as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs – *penicillin binding proteins*), que são o alvo dos antibióticos beta-lactâmicos. A rígida estrutura da parede celular permite que a bactéria mantenha a pressão osmótica interna. Quando a bactéria é exposta ao antibiótico, este se liga às PBPs na membrana celular bacteriana e enzimas autolíticas são liberadas, degradando a parede celular, ocorrendo morte bacteriana (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

b. Inibição da síntese proteica: aminoglicosídeos e tetraciclina

Esses fármacos penetram a membrana bacteriana através de canais proteicos (porinas), interagem com alvos específicos localizados no ribossomo, interferindo diretamente na síntese proteica (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Os aminoglicosídeos provocam vários tipos de alteração, a mais importante é a leitura incorreta do código genético conduzindo a proteínas não funcionais. As tetraciclina, por sua vez, bloqueiam a síntese proteica porque, quando são fixadas à subunidade 30S, impedem a fixação dos RNA transportadores (t-RNA) ao ribossomo. Dessa forma, não ocorre incorporação de novos aminoácidos e a cadeia peptídica não se forma (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

### c. Inibição na síntese do ácido nucleico: quinolonas e fluoroquinolonas

Provocam efeito bactericida ao inibir a síntese do ácido nucleico por ligação ao RNA polimerase ou inibindo a DNA girase, responsável por promover o enrolamento e desenrolamento da molécula de DNA para que ocupe o menor espaço dentro da célula (LEVINSON, 2010).

### d. Inibição do ácido fólico: sulfonamidas

As sulfonamidas competem com o ácido p-aminobenzóico, impedindo a síntese do ácido fólico necessário a certos micro-organismos, provocando efeito bacteriostático (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

O trimetoprim é frequentemente associado ao sulfametoxazol. Ambos os fármacos atuam na mesma via, porém, em sítios diferentes. As vantagens da combinação são: mutantes bacterianos resistentes a um dos fármacos serão inibidos pelo outro e dois fármacos podem atuar sinergisticamente, isto é, quando utilizados de maneira conjunta, provocam inibição significativamente maior que a soma da inibição causada por cada fármaco separadamente (LEVINSON, 2010).

Trimetoprim-sulfametoxazol tem utilidade clínica no tratamento de infecções do trato urinário (LEVINSON, 2010).

## 3.3.2 Principais mecanismos de resistência bacteriana

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados como primeira escolha em vários processos infecciosos tem limitado as opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções, tanto em âmbito hospitalar quanto na comunidade (MATOS, 2010).

De acordo com Rossi e Andreazzi (2005) e Levinson (2010), vários são os mecanismos que medeiam à resistência bacteriana aos antimicrobianos (figura 5), dentre eles, destacam-se a inativação enzimática, alteração de sítios alvos, redução da permeabilidade celular e bombas de efluxo.

### a. Inativação enzimática

As bactérias produzem enzimas que inativam o fármaco. Esse mecanismo é bastante frequente e está relacionado com a produção de diferentes tipos de enzimas. As enzimas podem ser constitutivas, produzidas independentemente da presença do antibiótico que, quando presente, passa a exercer um efeito seletivo; ou induzíveis, quando certos antibióticos,

ao entrar em contato com a bactéria, desencadeiam ou estimulam a produção enzimática que protegerá a bactéria dos efeitos do antibiótico.

#### b. Alteração de sítios alvos

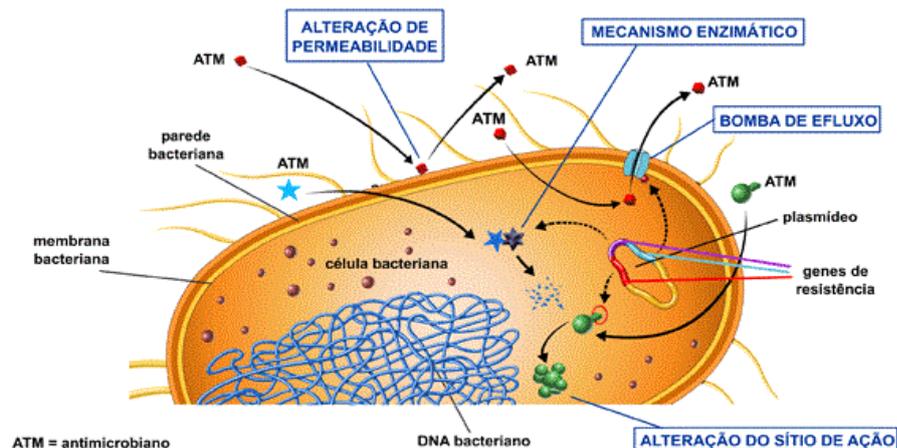
As bactérias sintetizam alvos modificados, contra os quais os fármacos não têm efeito. Tendo em vista que os antibióticos atuam em sítios específicos na bactéria, a alteração desse sítio impede o antibiótico de efetivar a ligação, tornando-se ineficiente contra a bactéria. Essa alteração é físico-química, reduzindo a afinidade da droga pelo sítio e fazendo com que haja perda da atividade antimicrobiana.

#### c. Redução da permeabilidade celular

As bactérias reduzem sua permeabilidade de modo que uma concentração intracelular efetiva do fármaco não é obtida, assim, modificações nas porinas podem reduzir a penetração e consequente ação de diferentes antimicrobianos.

#### d. Bombas de efluxo

As bactérias exportam os fármacos ativamente empregando uma bomba de resistência a múltiplos fármacos (bomba de efluxo) e contribuindo para uma concentração inadequada da droga, resultando na perda da eficácia do antibiótico.



**Figura 5** – Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

Fonte: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mec\\_animacao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm)

**Quadro 1** – Resumo dos mecanismos de resistência bacteriana

Classe	Droga	Alvo	Mecanismo bacteriano de resistência
Aminoglicosídeos	Gentamicina Amicacina	Ribossomos	Inativação enzimática Alteração de sítios alvos Redução da permeabilidade celular
Antibióticos beta-lactâmicos	Penicilinas Cefalosporinas	Parede celular	Inativação enzimática Alteração de sítios alvos
Carbapenêmicos	Imipenem	Parede celular	Inativação enzimática Redução da permeabilidade celular Bombas de efluxo
Inibidores do ácido fólico	Sulfametoxazol Trimetoprim	Metabólitos essenciais	Alteração de sítios alvos Bombas de efluxo
Quinolonas e Fluoroquinolonas	Ácido nalidíxico Ciprofloxacino Norfloxacino Ofloxacino	DNA	Alteração de sítios alvos Bombas de efluxo
Tetraciclina	Tetraciclina	Ribossomos	Alteração de sítios alvos Bombas de efluxo

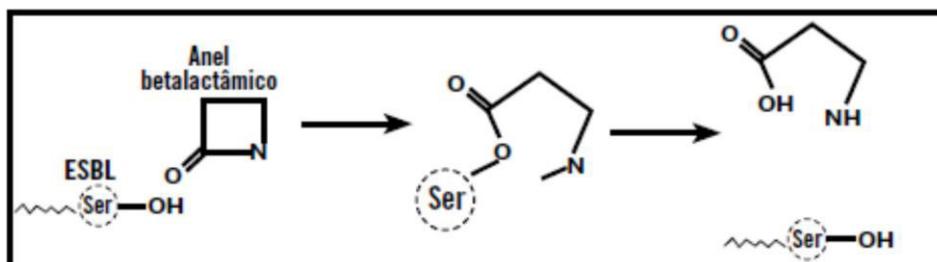
Fonte: Adaptado de ROSSI; ANDREAZZI, 2005.

### 3.3.2.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido

As Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) são definidas como enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações e aztreonam e são inativadas por inibidores específicos, isto é, clavulanato, sulbactam e tazobactam. Já foram caracterizadas mais de 430 ESBL, havendo descrição de muitas delas no Brasil. São frequentemente codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, os quais também carregam genes de resistência a outras classes de antibióticos, de modo que o isolamento de cepas produtoras de ESBL multirresistentes é a principal causa de falha terapêutica, levando ao aumento considerável de morbidade por infecções bacterianas (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Em geral, a expressão dessas enzimas pode ser constitutiva, quando a produção enzimática é independente de um agente indutor; ou induzível, a produção enzimática se manifestará quando a bactéria for exposta ao agente indutor (beta-lactâmico) (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A enzima associa-se não covalentemente ao anel betalactâmico. O anel é, então, atacado pela hidroxila livre do lado do sítio ativo do resíduo de serina, resultando na formação de um grupo acil-éster. A hidrólise finalmente libera a enzima ativa e o antibiótico hidrolisado inativo, formando água e ácido peniciloico. O esquema a seguir baseia-se na preferência de substrato da enzima e na inativação diante de inibidores específicos (BUSH; JACOBY, 2010; SILVA; LINCOPAN, 2012).



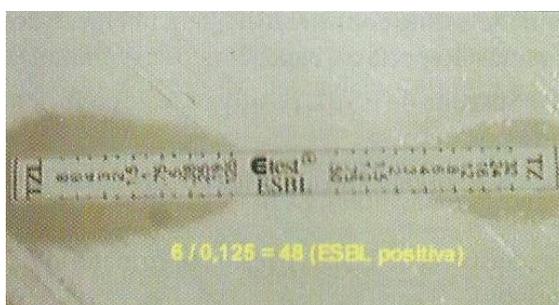
**Figura 6** – Mecanismo de hidrólise do antibiótico beta-lactâmico por ESBL

Legenda: ESBL: beta-lactamase de espectro estendido; Ser: serina.

Fonte: SILVA; LINCOPAN, 2012.

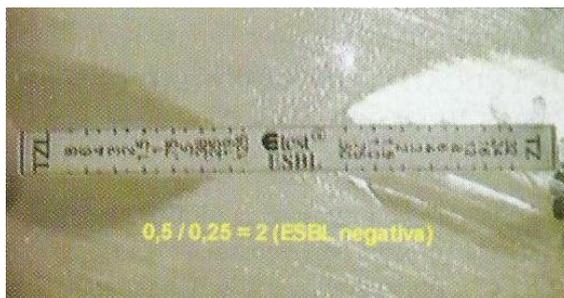
Um dos métodos para identificação fenotípica de ESBL é a utilização de fitas plásticas impregnadas com antibióticos específicos, isto é, com um gradiente de ceftazidima em uma extremidade e ceftazidima associada ao ácido clavulânico na outra extremidade. Baseia-se no reconhecimento da redução na concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico, quando este é associado a um inibidor que indica a produção de ESBL (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A figura 7 apresenta a inibição do micro-organismo na presença do ácido clavulânico, o que caracteriza ESBL positiva. Enquanto na figura 8 não houve inibição do micro-organismo na presença do ácido clavulânico, o que caracteriza ESBL negativa.



**Figura 7** – Etest: linhagem produtora de ESBL

Fonte: ROSSI; ANDREAZZI, 2005.

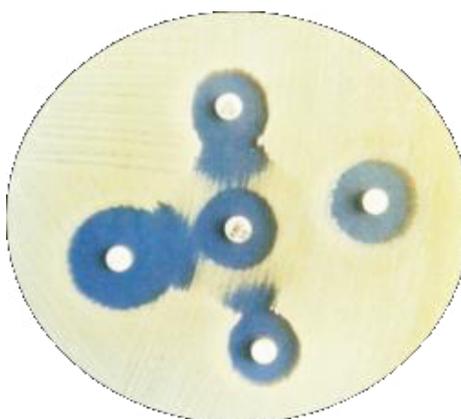


**Figura 8** – Etest: linhagem não produtora de ESBL

Fonte: ROSSI; ANDREAZZI, 2005.

Outro método é o teste de aproximação de discos, em que os discos de cefalosporinas são colocados a uma determinada distância do disco com inibidor (clavulanato, tazobactam e sulbactam), havendo sinergismo entre os substratos e o inibidor; a produção de ESBL é confirmada. A zona de sinergismo é comumente denominada zona fantasma. Geralmente, utilizam-se várias cefalosporinas no teste, incluindo cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e cefepima.

Esta técnica é de fácil realização e acessível a qualquer laboratório de microbiologia clínica. Este método é o mais utilizado na rotina laboratorial pelo baixo custo, fácil acesso à metodologia e pelo tempo de obtenção dos resultados. Para cepas isoladas que demonstram zonas de inibição grandes, o disco deve ser colocado a 30mm de distância e para cepas isoladas com zona de inibição menores, uma distância menor deve ser utilizada (20mm). A determinação desta distância constitui a maior dificuldade do método (SOUZA JÚNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).



**Figura 9** – Presença de zona fantasma (*ghost zone*)

Fonte: SANTOS FILHO, 2006.

O teste do disco combinado também é uma alternativa para a triagem de ESBL. Nesse teste, quando há diferença de 5 mm do diâmetro do halo de inibição entre o disco de

cefalosporina e seu respectivo disco combinado com inibidor, infere-se a produção de ESBL (SILVA; LINCOPAN, 2012).



**Figura 10** – Teste do disco combinado para a identificação de ESBL

CTX: cefotaxima; CLA: ácido clavulânico

Fonte: SILVA; LINCOPAN, 2012.

As ESBL inativam muitas das cefalosporinas de terceira geração, enquanto que os carbapenêmicos são relativamente resistentes a estas enzimas versáteis. As bactérias Gram-negativas têm estado suficientemente cheias de recursos como a produção de betalactamases que inativam antibióticos em forma específica, como o imipenem, que são resistentes à ação da maior parte das outras enzimas (SOUZA JÚNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

### 3.4 Atividade antimicrobiana de produtos vegetais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Segundo Carvalho et al. (2007) plantas medicinais são aquelas que possuem tradição de uso em uma população ou comunidade e são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades. Ao serem processadas para a obtenção de um medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico.

A fitoterapia pode ser historicamente definida como a ciência que trata dos problemas de saúde, utilizando os vegetais, sendo contemporânea ao início da civilização. As plantas são tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de doenças e pragas (LAVABRE, 1993).

A magnitude da biodiversidade brasileira – conjunto de todos os seres vivos com a sua variabilidade genética integral – não é conhecida com precisão tal à sua complexidade, estimando-se mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos. Isso coloca o Brasil como detentor da maior diversidade biológica do mundo (WILSON, 1997).

Apesar de toda a diversidade de espécies existentes, o potencial de uso de plantas como fonte de novos medicamentos é ainda pouco explorado. Entre as milhares de espécies de plantas estimadas no mundo, apenas pequena percentagem tem sido investigada fitoquimicamente, fato que ocorre também em relação às propriedades farmacológicas, nas quais, em muitos casos, existem apenas estudos preliminares. Em relação ao uso médico, estima-se que apenas 5 mil espécies foram estudadas (RATES, 2001). No Brasil, com cerca de 55 mil espécies de plantas, há relatos de investigação de apenas 0,4% da flora (GURIB-FAKIM, 2006).

Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012).

Durante muitos séculos, preparações à base de plantas constituíram os principais tratamentos contra as inúmeras doenças que acometiam a humanidade. Com o avanço científico, muitos produtos naturais foram identificados e isolados, possibilitando tratamentos mais eficazes (ANDRADE, 2013).

As investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas ainda são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as

possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Espera-se que compostos que atinjam nas células alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes (DUARTE, 2006). Entretanto, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos (OSTROSKY et al., 2008).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas são reconhecidas empiricamente há séculos. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antimicrobianos, tais como no Brasil (ARAÚJO, 2010).

Óleos essenciais são substâncias voláteis extraídas de plantas aromáticas, constituindo matérias-primas de grande importância para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia. Tais óleos são obtidos pelos processos de destilação a vapor úmido, extração por solvente ou por pressão, e além de suas propriedades terapêuticas ainda apresenta uma atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON et al., 1995).

Com o aumento dos micro-organismos resistentes às substâncias antimicrobianas já conhecidas, vários extratos de plantas medicinais foram testados com a finalidade de procurar novos compostos com atividade antimicrobiana reconhecida (ROCHA et al., 2013).

### 3.5 Considerações gerais sobre algumas plantas medicinais

**Quadro 2** – Considerações gerais sobre algumas plantas medicinais

Planta	Nomenclatura		Partes utilizadas	Atividades Biológicas	Referências
	Científica	Popular			
	<i>Arnica montana</i>	Arnica	Flores, folhas, rizoma	Analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana.	CUNHA et al., 2004
	<i>Calendula officinalis</i>	Calêndula	Óleo essencial, sementes, folhas, flores	Analgésica, antialérgica, antimicrobiana	LORENZI E MATOS, 2008 SILVA JÚNIOR, 2006

Quadro 2 – Considerações gerais sobre algumas plantas medicinais (Continuação)

	<i>Citrus bergamia</i>	Bergamota	Óleo essencial, cascas, flores	Antimicrobiana, anti-séptica, antidepressiva	CUNHA et al., 2004
	<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim santo	Folhas, rizoma, raízes	Analgésico, antiemético, anti-séptico	DANTAS, 2007
	<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronela	Folhas	Calmante, bactericida, repelente de insetos	ANDRADE et al., 2012 COSTA et al., 2008 MATTOS, 2000
	<i>Echinacea purpurea</i>	Equinácea	Toda a planta	Antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória	LORENZI E MATOS, 2008
	<i>Erythrina mulungu</i>	Mulungu	Casca	Antidepressivo, antimicrobiano, anti-inflamatório	LORENZI E MATOS, 2008 DANTAS, 2007
	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Folhas	Analgésica, bactericida, cicatrizante	DANTAS, 2007 SILVEIRA et al., 2012
	<i>Lavandula officinalis</i>	Lavanda	Óleo essencial, folhas, flores.	Sedativa, analgésica, antimicrobiana	SILVA, 2001 SILVEIRA et al., 2012
	<i>Matricaria chamomilla</i>	Camomila	Folhas, flores	Adstringente, antialérgica, sedativa	CUNHA et al., 2004 DANTAS, 2007
	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira santa	Folhas	Anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica	DANTAS, 2007 ITOKAWA et al., 1991
	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca	Óleo essencial, folhas	Analgésico, bactericida, cicatrizante	CUNHA et al., 2004 NOVACOSK;
	<i>Stryphnodendron barbatimam</i>	Barbatimão	Casca, folhas	Adstringente, antibacteriana, anti-séptica	CRUZ, 1985 DANTAS, 2007
	<i>Thuja occidentalis</i>	Thuya	Ramos	Adstringente, antiasmática, antimicrobiana	CUNHA et al., 2004
	<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	Óleo essencial, caule e casca.	Antimicrobiana, antioxidante, anti-hepatotóxica	ANDRADE et al., 2012 DANTAS, 2007

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Material vegetal**

Foram utilizadas tinturas das plantas: *Arnica montana* (Arnica), *Calendula officinalis* (Calêndula), *Echinacea purpurea* (Equinácea), *Erythrina mulungu* (Mulungu), *Eucalyptus globulus* (Eucalipto), *Matricaria chamomilla* (Camomila), *Maytenus ilicifolia* (Espinheira santa), *Stryphnodendron barbatimam* (Barbatimão) e *Thuya occidentalis* (Thuya); bem como, óleos essenciais das plantas: *Citrus bergamia* (Bergamota), *Cymbopogon citratus* (Capim Santo), *Cymbopogon nardus* (Citronela), *Lavandula officinalis* (Lavanda), *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) e *Zingiber officinale* (Gengibre); obtidos a partir de fabricantes autorizados, mencionados em anexo, onde estão disponíveis os certificados de análises.

### **4.2 Micro-organismos estudados**

Para a realização do estudo foi utilizada a linhagem padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, proveniente da *American Type Culture Collection*, para o controle de qualidade; bem como, linhagens de *E. coli* isoladas de pacientes ambulatoriais atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba – LAC/UEPB e pertencentes à coleção do setor de Microbiologia desta Instituição de Ensino Superior (IES).

### **4.3 Cultivo bacteriano e testes para a confirmação da identificação**

A fim de obter a viabilidade dos micro-organismos, utilizou-se o caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI) e, para o cultivo bacteriano, o meio Ágar EMB, sendo vertidos 25mL/placa de Petri/ 90 x 15mm e preparado de acordo com as recomendações do fabricante.

Também foram realizados os seguintes testes bioquímicos para confirmar a identificação das espécies: Teste da Oxidase, Citrato de Simmons, TSI (Triplíce Sugar Iron), LIA (Lisina Iron Agar), SIM (Sulfeto de hidrogênio, Indol, Motilidade), Fenilalanina, Uréia, MR-VP (para as provas do Vermelho de Metila e Voges Proskauer).

### **4.4 Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos**

Para a realização do estudo do perfil de sensibilidade antimicrobiana foi realizado o antibiograma ou Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), através do método de difusão em disco descrito por Kirby e Bauer, de acordo com as recomendações no CLSI (2013).

Foram incluídos os seguintes antibióticos, fornecidos pelo fabricante DME (Diagnósticos Microbiológicos Especializados): Ampicilina [10µg], Amoxicilina + Ácido clavulânico [30 µg], Cefalotina [30 µg], Cefoxitina [30 µg], Ceftazidima [30 µg], Cefotaxima [30 µg], Cefepima [30 µg], Amicacina [30 µg], Gentamicina [10 µg], Tetraciclina [30 µg], Aztreonam [30 µg], Ciprofloxacino [5 µg], Norfloxacino [30 µg], Ofloxacino [5 µg], Ácido nalidíxico [30 µg], Sulfazotrim [25 µg], Imipenem [10 µg] e Nitrofurantoína [300 µg].

A partir do crescimento em Ágar EMB após 24h/37°C, os inóculos foram preparados repicando-se de duas a quatro colônias em 1mL de solução salina 0,85% estéril, comparando-se a turbidez com o tubo nº 0,5 da escala de McFarland a fim de obter cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Em seguida, fez-se o semeio da suspensão bacteriana, com auxílio de um *swab* estéril, por toda a superfície do Ágar Müller-Hinton, de modo a se obter um crescimento confluyente e uniforme. Após este procedimento, com o auxílio de uma pinça esterilizada, fez-se a inoculação de discos de antibióticos previamente selecionados. As placas foram incubadas à 37°C/24h.

Simultaneamente foi realizado o teste de aproximação entre os discos de cefalosporinas, os quais foram posicionados a 30 mm de distância do disco com inibidor (clavulanato) para a análise da produção de ESBL. Um aumento de 2 mm no halo do antibiótico testado sozinho comparado com a zona de inibição quando combinado com ácido clavulânico ou o surgimento de uma *ghost zone* (zona fantasma), sugere a presença de produção de ESBL (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Os halos de inibição produzidos foram medidos com o auxílio de um halômetro. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos pela média aritmética dos dois ensaios.

## **4.5 Ensaio com produtos vegetais**

### **4.5.1 Preparação do inóculo**

A linhagem padrão de *E.coli* ATCC 25922 foi semeada em Ágar Müller-Hinton e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Decorrido este período, foi realizado o preparo da suspensão bacteriana, transferindo-se uma alçada de colônias da espécie da placa de Petri para um tubo de ensaio estéril com tampa contendo solução salina (0,85%) esterilizada (5mL) e ajustando-se a turbidez com o tubo nº 0,5 da escala de McFarland a fim de obter cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL. O micro-organismo foi inoculado com *swab* estéril, por toda a superfície do Ágar Müller-Hinton.

#### 4.5.2 Determinação da atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após a inoculação dos micro-organismos, foram inseridos discos de papel filtro estéreis previamente impregnados com 20 µL dos referidos extratos e óleos vegetais nas suas formas concentradas (100%) e nas diluições 50; 25; 12,5 e 6,25% com o auxílio de uma pinça esterilizada. Para realizar a diluição foi utilizado álcool 70%, o qual também foi empregado como controle negativo. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C/24h.

Os produtos em estudo foram considerados ativos quando a média dos halos de inibição de crescimento foi igual ou superior a 8 mm de diâmetro (CATÃO et al., 2010).

A CIM foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano, isto é, apresentou halo de inibição do crescimento.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação do perfil fenotípico de linhagens de *Escherichia coli* multirresistentes frente a antimicrobianos tradicionais

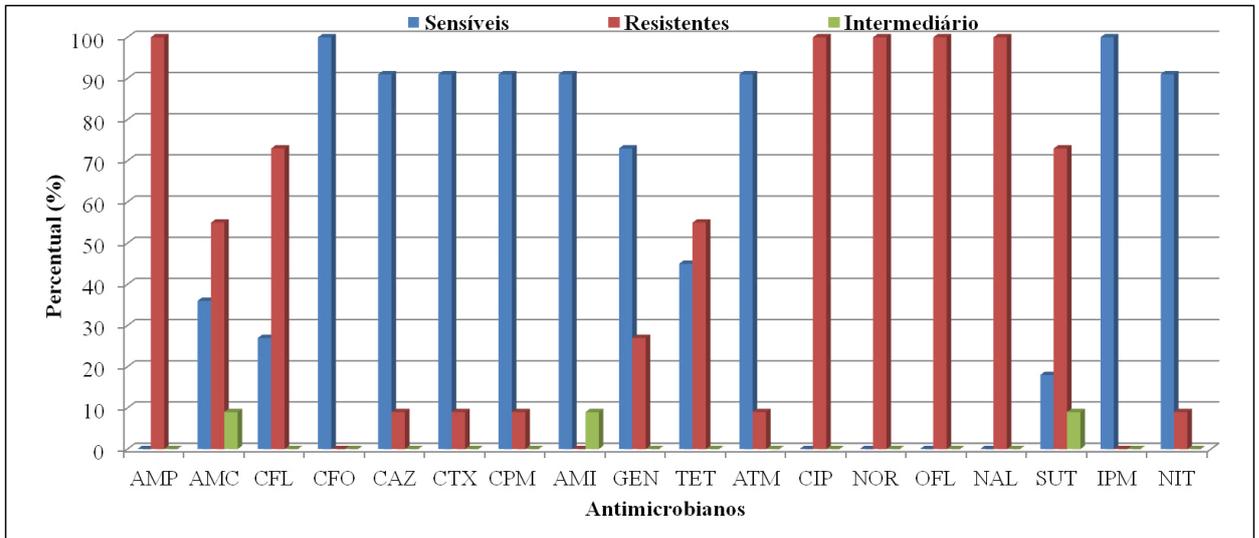
No estudo foram utilizadas 11 linhagens de *E.coli* de origem ambulatorial e a linhagem padrão *E.coli* ATCC 25922, utilizada como controle. A tabela 1 apresenta o comportamento das linhagens frente aos antimicrobianos testados.

**Tabela 1** – Perfil de linhagens de *Escherichia coli* multirresistentes frente a antimicrobianos tradicionais

Antimicrobianos testados	Linhagem Controle	Linhagens de <i>E.coli</i> e comportamento apresentado											Percentual (%) (n=11)	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	R	S
Ampicilina [10µg]	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100	0
Amoxicilina + Ácido clavulânico [30 µg]	S	S	I	R	S	R	R	S	R	S	R	R	55	36
Cefalotina [30 µg]	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	73	27
Cefoxitina [30 µg]	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	100
Ceftazidima [30 µg]	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	9	91
Cefotaxima [30 µg]	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	9	91
Cefepima [30 µg]	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	9	91
Amicacina [30 µg]	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	0	91
Gentamicina [10 µg]	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	27	73
Tetraciclina [30 µg]	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	55	45
Aztreonam [30 µg]	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	9	91
Ciprofloxacino [5 µg]	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100	0
Norfloxacino [30 µg]	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100	0
Ofloxacino [5 µg]	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100	0
Ácido nalidíxico [30 µg]	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100	0
Sulfazotrim [25 µg]	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	73	18
Imipenem [10 µg]	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	100
Nitrofurantoína [300 µg]	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	9	91

Legenda: R = Resistente, I = Intermediário, S = Sensível

O gráfico 1 apresenta a análise do percentual de linhagens de *E. coli* multirresistentes frente a antimicrobianos tradicionais.



**Gráfico 1** – Percentual de linhagens de *E. coli* multirresistentes frente a antimicrobianos tradicionais

Legenda: AMP – Ampicilina; AMC – Amoxicilina + Ácido clavulânico; CFL – Cefalotina; CFO – Cefoxitina; CAZ – Ceftazidima; CTX – Cefotaxima; CPM – Cefepima; AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; TET – Tetraciclina; ATM – Aztreonam; CIP – Ciprofloxacino; NOR – Norfloxacino; OFL – Ofloxacino, NAL – Ácido Nalidíxico; SUT – Sulfazotrim; IPM – Imipenem; NIT – Nitrofurantoína.

Fonte: Dados da pesquisa (2014)

Foi constatada a presença de uma linhagem (linhagem 11) produtora de ESBL, após realização do teste de aproximação dos discos. Observou-se sinergismo no segmento entre os antimicrobianos aztreonam e cefotaxime em relação à amoxicilina com ácido clavulânico, detectando-se a produção de ESBL ao observar o aparecimento de uma zona irregular de inibição (*ghost zone*), conforme apresenta a figura 11.



**Figura 11** – Teste de aproximação dos discos para a detecção de ESBL

Fonte: Dados da pesquisa (2014)

## 5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de produtos vegetais frente à *E.coli* ATCC 25299 e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados obtidos com as tinturas concentradas (100%) demonstraram ausência de atividade antibacteriana frente à linhagem de *E.coli* ATCC 25299, visto que não foi observada a formação de halos de inibição do crescimento ao redor dos discos impregnados com nenhum dos extratos testados.

Em contrapartida, após realizar os ensaios com os óleos essenciais foi possível constatar atividade antibacteriana de quatro deles, obtidos a partir das seguintes plantas: *Cymbopogon citratus* (Capim Santo), *Cymbopogon nardus* (Citronela), *Lavandula officinalis* (Lavanda) e *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca), conforme é observado na figura 12. Os halos de inibição formados variaram entre 12 e 16 mm.



**Figura 12** – *Screening* da atividade antibacteriana de óleos essenciais frente à *E.coli* ATCC 25922

Legenda: 1 – Bergamota, 2 – Citronela, 3 – Gengibre, 4 – Lavanda, 5 – Capim Santo, 6 – Melaleuca.

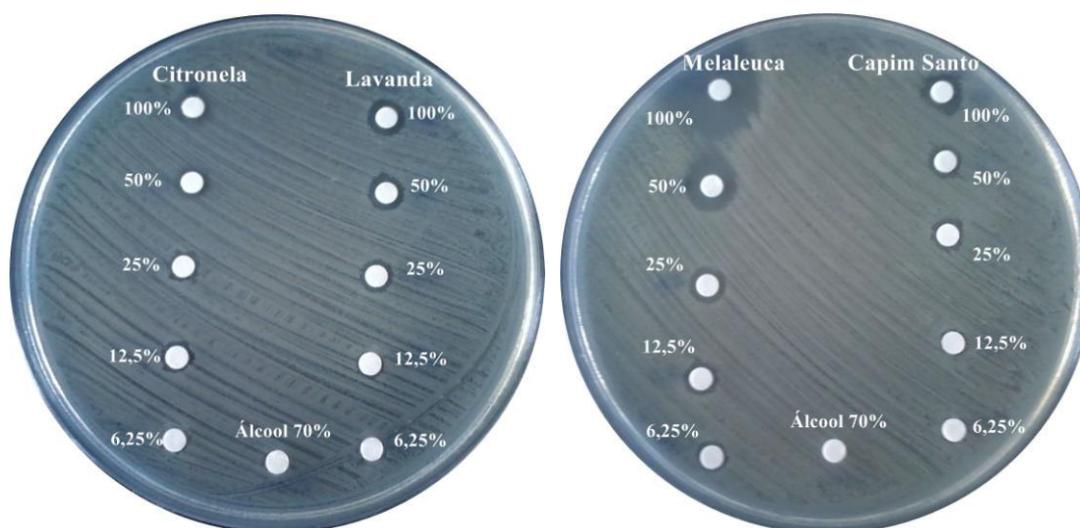
Fonte: Dados da pesquisa (2014)

A tabela 2 apresenta a atividade antimicrobiana e a determinação da CIM dos óleos essenciais ativos frente à *E. coli* ATCC 25299, os quais foram testados nas seguintes concentrações: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. A CIM dos referidos óleos foram definidas como sendo: citronela (12,5%), lavanda e capim santo (25%), melaleuca (6,25%).

**Tabela 2** – Avaliação da determinação da Concentração Inibitória Mínima de óleos essenciais ativos frente à *E. coli* ATCC 25299

Óleos essenciais	Concentrações testadas (%) e média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento (mm)				
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
Citronela	12	10	8	8	0
Lavanda	12	10	8	0	0
Capim Santo	12	10	8	0	0
Melaleuca	16	14	12	10	8

A figura 13 apresenta a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela, lavanda, capim santo e melaleuca, testados em diferentes concentrações, frente à linhagem de *E.coli* ATCC 25299. Foram considerados ativos todos os produtos que apresentaram halos de inibição de crescimento com diâmetro igual ou superior a 8 mm (CATÃO et al., 2010).



**Figura 13** – Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais ativos em diferentes concentrações, frente à *E.coli* ATCC 25299

Fonte: Dados da pesquisa (2014)

## 6 DISCUSSÃO

De acordo com Trabulsi e Altherthun (2005), as bactérias Gram negativas normalmente apresentam uma maior resistência aos antimicrobianos do que as Gram positivas devido à constituição da parede celular. Neste trabalho, as linhagens de *E.coli* apresentaram resistência, pelo menos, a duas classes dos antimicrobianos testados, sendo classificadas como multirresistentes. O perfil destas linhagens evidencia o histórico de uso irracional dos antimicrobianos e confirma essa referência.

O perfil de resistência das amostras de *E. coli* demonstrou que dos 18 antimicrobianos testados, 5 (28%) deles apresentaram ineficácia frente a todas as linhagens analisadas, foram eles: ampicilina, ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino e ácido nalidíxico. As fluoroquinolonas, como norfloxacino e ciprofloxacino são os antimicrobianos mais indicados para as infecções do trato urinário complicadas, contudo, se a utilização não for criteriosa, esses agentes podem pressionar a seleção de linhagens resistentes, como demonstrado neste estudo.

Quanto às cefalosporinas de segunda à quarta geração, 10 (91%) das linhagens demonstraram-se sensíveis a estes antimicrobianos. As cefalosporinas de terceira geração são reconhecidas por sua boa atividade contra micro-organismos Gram negativos. No entanto, é cada vez mais comum a produção de enzimas ESBL, especialmente entre linhagens de *E. coli*. Linhagens produtoras de ESBL são capazes de resistir à ação das cefalosporinas de terceira geração, o que representa um considerável problema para o tratamento (BAERHEIM, 2001; KHAMENEH; AFSHAR, 2009).

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas. O grau de resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana). A superprodução de enzimas induzíveis cromossômicas ou plasmidiais pode inativar também carbapenems como o imipenem, resistentes à degradação por quantidades normais de enzimas. Neste estudo, todas as linhagens testadas foram sensíveis à ação do imipenem (SOUZA JÚNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

É indispensável o desenvolvimento de estudos que busquem conhecer as prevalências de patógenos, bem como o seu perfil de resistência aos antimicrobianos. Tais informações permitem a escolha dos antimicrobianos mais indicados para o tratamento empírico e oferecem maior respaldo ao clínico, a fim de decidir de forma mais segura a terapêutica antimicrobiana adequada.

Os dados encontrados sugerem maior atenção no tratamento clínico, demonstrando que os micro-organismos prevalentes em diversos tipos de infecções já não respondem de modo satisfatório aos antimicrobianos que foram extensivamente utilizados, com agrave iminente.

Dos seis óleos essenciais estudados quatro deles apresentaram atividade inibitória do crescimento na linhagem estudada, os quais foram obtidos a partir das plantas: *Cymbopogon citratus* (Capim Santo), *Cymbopogon nardus* (Citronela), *Lavandula officinalis* (Lavanda), e *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca). Contudo, os óleos essenciais costumam ser empregados em preparações cosméticas.

O uso de óleos essenciais pode ser feito diretamente, ou após a incorporação destes em bases apropriadas nos banhos cosméticos, sobretudo com ação anti-inflamatória e tonificante. Tradicionalmente são usados em afecções dermatológicas diversas e tem sido comprovadas muitas de suas ações. Uma das ações mais estudadas é anti-séptica, que tem sido verificada não só sobre as bactérias patogênicas, mas também sobre fungos responsáveis por micoses. (CUNHA et al., 2004). O óleo essencial mais usado com essa atividade, entre aqueles analisados neste estudo, é o de melaleuca, que apresentou um halo de 16 mm.

Os óleos, freqüentemente, apresentam toxicidade elevada se empregados em grandes doses. Isso é particularmente importante levando-se em consideração quando os óleos vêm a ser empregados com finalidades fitoaromaterápicas.

Os efeitos tóxicos dos óleos voláteis incluem não somente aqueles decorrentes de uma intoxicação aguda, mas também crônica. Além disso, os efeitos tóxicos dos óleos voláteis também podem ocorrer através do uso tópico (fototoxicidade e alergias). Geralmente a toxicidade dos óleos voláteis é dose dependente; entretanto, existem situações, nas quais mesmo o uso de baixas doses pode provocar reações severas, principalmente nos casos de alergias de contato (sensibilização cutânea) e de fototoxicidade. O grau de toxicidade depende, também, da via de administração; a ingestão oral é aquela que provoca maiores riscos se feita sem critérios adequados de dosagem (SIMÕES et al., 2000).

As tinturas estudadas não apresentaram nenhum tipo de atividade antimicrobiana. Possivelmente, porque o método de difusão do disco tem limitações para substâncias com baixa difusibilidade no meio de cultura. Segundo Martins et al. (2010), os extratos de plantas freqüentemente exibem baixas propriedades de difusão. O autor afirma ainda que a técnica de diluição em caldo consiste na melhor maneira de estabelecer a real eficácia de um composto puro, na qual a solubilidade é o requisito que otimiza os resultados. Sendo assim, novos estudos abrangendo outras metodologias podem ser investigados.

Diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão do disco no meio de cultura havendo, portanto, a necessidade de conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa da execução dos ensaios.

Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado dos micro-organismos a serem desafiados e não devem conter substâncias antagônicas à atividade antimicrobiana em estudo. No método de difusão a concentração do ágar e a sua origem podem influenciar os resultados dos ensaios. Além disso, o pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano e com a atividade e a estabilidade das substâncias testadas. (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A suscetibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A padronização desse se faz, portanto, necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. A preparação do inóculo deve ser feita a partir de 3 ou 4 colônias da cultura do micro-organismo desafiado, a fim de evitar a seleção de uma linhagem variante atípica. O padrão de leitura do tubo nº 0,5 da escala McFarland fornece densidade de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL. Alternativamente, o inóculo pode ser ajustado fotometricamente. A inoculação deve ser feita em até 30 minutos após a padronização do inóculo, para que a densidade celular não seja alterada (OSTROSKY, 2009).

A incubação dos micro-organismos deve ser feita a 37°C para o crescimento de bactérias e as placas devem ser incubadas com o cuidado de se manter a temperatura homogênea na estufa.

## 7 CONCLUSÃO

Considerando os fatos expostos nesse estudo, fica evidente a importância de se pesquisar novos antimicrobianos em virtude do aumento na frequência desses micro-organismos como agentes de infecção, tendo como resultado inevitável a disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos convencionais, o que dificulta ainda mais o seu tratamento.

Com o aumento dos micro-organismos resistentes às substâncias antimicrobianas já conhecidas, vários extratos de plantas medicinais foram testados com a finalidade de procurar novos compostos com atividade antimicrobiana reconhecida, no entanto, apesar de toda a diversidade de espécies existentes, o potencial de uso de plantas como fonte de novos medicamentos é ainda pouco explorado.

As tinturas analisadas neste estudo não mostraram atividade frente aos micro-organismos testados. Os óleos essenciais apresentam entre as ações mais pesquisadas a anti-séptica, que tem sido verificada não só sobre as bactérias patogênicas, mas também sobre fungos responsáveis por micoses. Contudo, óleos essenciais geralmente são empregados em preparações cosméticas e não costumam ser indicados para o uso interno devido a sua toxicidade.

Desta forma, o potencial de uso dos produtos vegetais como coadjuvante no tratamento de doenças infecciosas, deve ser melhor elucidado. Sugere-se o desenvolvimento de novos estudos utilizando outros métodos, bem como a utilização de extratos obtidos com outros solventes frente a fungos e outras linhagens bacterianas.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLETT, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.
- ANDRADE, S. R. A. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos sobre cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri***. 19 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia Generalista) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca. vol. 10, p. 112-117. 2007.
- ARAÚJO, N.R.R. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. 99 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
- BAERHEIM, A. Empirical treatment of uncomplicated cystitis. **BMJ**, v. 323, p. 197-8, 2001
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**/Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. n. 31. 156 p. 2012.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Update functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.
- CADONA, J. S.; BUSTAMANTE, A. V.; PARMA, A. E.; LUCCHESI, P. M. A.; SANSONI, A. M. Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina. **Applied Microbiology**, Washington, v.56, n.1 p.449-455, 2013.
- CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 35, p. 421-424, 1995.
- CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano 5, n. 11, jun. 2007.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; FERREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.
- COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M.; FARIAS, M. A. A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.2., n.2, p.11-14, jun. 2008
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: M100-S23**. 2013.

CUNHA, A. P. et al. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2004. 310 p.

DANTAS, I. C. **O raizeiro**. Campina Grande: Editora da Universidade Estadual da Paraíba/EDUEPB, v. 1, 2007. 540 p.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos Produtos Naturais no Brasil. **Multiciência**, v. 7, p. 1-16, 2006.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2009. cap.4, p. 457-474.

FERREIRA, F. S. SANTOS, S. C.; BARROS, T. F.; ROSSI ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade Antibacteriana *in vitro* de extratos de *Rhizophora mangle* L. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. Botucatu, v.13, n.3, 2011.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2005. 1647 p.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HIRSH, D. D. **Microbiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Granabara Koogan SA, p. 63-69. 2003.

ITOKAWA, H. SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MOTIRA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3713-3716, 1991.

KHAMENEH, Z. R.; AFSHAR, A. T. Antimicrobial susceptibility pattern of urinary tract pathogens. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 20, n. 2, 2009. Disponível em: [http://www.sjkd.org/temp/SaudiJKidneyDisTranspl202251-5225138\\_143051.pdf](http://www.sjkd.org/temp/SaudiJKidneyDisTranspl202251-5225138_143051.pdf). Acesso em 16 out. 2014.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Record; 1993.

LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 632 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MARTINS, C.H.G; SOUZA, F. R.; FONSECA, C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; AMBRÓSIO, S. R.; CUNHA, W. R. Determinação *in vitro* da atividade antibacteriana dos extratos brutos da casca e da polpa farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Revista Investigação**, v. 10, n.1 p. 37-43, 2010.

MATOS, J. O. **Distribuição clonal de cepas de *Escherichia coli* isoladas Infecções do Trato urinário adquiridas na Comunidade**. 2010 48 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

MATTOS, S. H. **Estudos fitoterápicos da *Mentha arvensis* L. var. Holmes como produtora de mentol no Ceará.** 2000. 98 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MOURA, L. A.; FERNANDES, M. G. A incidência de infecções urinárias causadas por *E. coli*. **Revista Olhar Científico** – Faculdades Associadas de Ariquemes. v. 01, n.2, ago./dez. 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A.. **Microbiologia médica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009. 3370 p.

NOVACOSK, R; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica.** n. 21, fev./mar., 2006.

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem.** V. 10, n. 1. p. 189-197. 2008. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/v10n1a17.htm>. Acesso em 30 ago. 2014.

OSTROSKY, E. A. **Avaliação da eficácia e segurança do extrato de folhas de *R. rosaefolius* Sm. visando a aplicação como conservante em produtos cosméticos.** 2009. 174 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTA, M. K.; LIMA, M. E.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 18, n.2, p. 301-307, 2008.

PINTO, J. A. P.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

RATES, S. M. K. Plants as source of drougs. **Toxicon,** n. 39, p. 603-613, 2001.

ROCHA, E. A. L. S. S. et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 34, n. 3, p. 351-355, 2013.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana:** interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.

SANTOS FILHO. L. **Manual de microbiologia.** 4. ed. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2006. 320 p.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 48. n. 2. p. 91-99, 2012.

SILVA JUNIOR, A. A. **Essentia herba.** Florianópolis: EPAGRI, v. 2. 2006. 633p

SILVA, A. R. **Tudo sobre aromaterapia:** como usá-la para melhorar sua saúde física, emocional e financeira 2. ed. São Paulo: Editora ROCA Ltda, 2001.

SILVA, F. R. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Annona Muricata L.* (Annonaceae).** 2011. 17 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

SILVA, M. F. ***Escherichia coli* e a resistência antibiótica:** Uma análise do padrão de evolução da resistência da *Escherichia coli* aos antibióticos no distrito de Castelo Branco. 2009. 22 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã – Portugal, 2009. Disponível em: [http://www.fcsaude.ubi.pt/thesis/upload/118/804/midana\\_silvapdf.pdf](http://www.fcsaude.ubi.pt/thesis/upload/118/804/midana_silvapdf.pdf)> Acesso em: 01 set. 2014.

SILVEIRA, S. M.; CUNHA Jr, A.; SCHEUERMANN, G. N.; CECCHI, F. L.; VERRUCK, S.; KROHN, M.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Rev Inst AdolfoLutz.** São Paulo, v. 71, n. 3, p. 471-80, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SOUZA JÚNIOR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab,** v. 63, p. 152-174. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 894 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

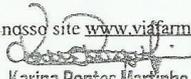
VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. **Medicinal plants; safe cure?** Química Nova, v. 28, p. 519-528, set. 2005.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde,** São Paulo, v.33, n.4, p.406-414, 2009.

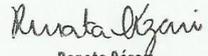
WILSON, E. O. A situação atual da diversidade biológica. In: **Biodiversidade.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 3-24.



## ANEXO 1. ÓLEO ESSENCIAL DE BERGAMOTA

 <b>SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS</b> <small>Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1</small> <b>LTDA</b>		
<b>CERTIFICADO DE ANÁLISES</b>		
<b>PRODUTO:</b>	<b>OLEO ESSENCIAL BERGAMOTA 0.050</b>	
	<b>KG</b>	
<b>FABRICANTE:</b>	AROMAX	
<b>PAÍS DE ORIGEM:</b>	BRASIL	<b>PROCEDÊNCIA:</b> BRASIL
<b>LOTE:</b>	140307200	<b>LOTE INTERNO:</b> 048958
<b>FABRICAÇÃO:</b>	06/03/2014	<b>VALIDADE:</b> 06/03/2015
<b>CAS:</b>	N/A	
<b>DCB:</b>	N/A	
<b>DCI:</b>	N/A	
<b>GRUPO:</b>	COSMETICO	
# ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE #		
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Densidade	0.850 a 0.862 g/cmü (20 ø)	0,854
Aparencia	Limpido	De acordo
Odor	Caracteristico	De acordo
Sabor	Caracteristico	De acordo
Cor	Incolor a amarelo	Amarelo
Sensorial	Conforme	De acordo
Índice de refracao	1.464 a 1.476 (20 øC)	1.470
Observacao: Este lote foi fabricado conforme boas praticas de fabricacao, livre de materiais estranhos.		
<b>REF.BIBLIOGRÁFICA:</b> O PRODUTO SEGUE ANALISE DO FABRICANTE. <b>ARMAZENAMENTO:</b> MANTER HERMET. FECHADO / AO ABRIGO DA LUZ <b>CONCLUSAO:</b> APROVADO		
<b>RUA LABATUT, 403 - IPIRANGA - CEP: 04214-000 - SÃO PAULO / SP</b>		
Visite nosso site <a href="http://www.viafarmanet.com.br">www.viafarmanet.com.br</a>  <b>Karina Pontes Martinho</b> Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263		
<small>A assinatura é válida somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.</small>		
<small>É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nosso Controle de Qualidade pelo telefone: (11) 2067-5713</small>		

## ANEXO 2. ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA

 <b>CERTIFICADO DE ANÁLISES</b> <small>Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1</small>		PAG: 1
PRODUTO: 91-OLEO DE CITRONELA FÁBRICA FABRICANTE: 25.089 FABRICANTE: CASA SIENA PAÍS DE ORIGEM: BRASIL PROCEDÊNCIA: BRASIL CLIENTE: GRAL COM. PROD. FARM. E HOME N.º A.S.: 8000-29-1 DATA DE ANÁLISE: 01/02/2010		LOTE_INTERNO: 033148  FABRICAÇÃO...: 01/2010 N.FISC: 13544 VALIDADE....: 01/2012 QTD: 0,500
ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE		RESULTADOS
TESTES	ESPECIFICACOES	
Aspecto	Líquido	De acordo
Cor	Incolor a levemente amarelo	De acordo
Odor	Característico	De acordo
I. Refração (20°C)	1.455 a 1.475	1.471
Densidade aparente	0.820 a 0.990g/mL	0:872
Solubilidade	Sol. em palmitato de isopropila, isoparafina, álcool benzílico, óleo mineral	De acordo
Obs: Poderá haver alterações coloridas naturais		dos componentes
ENSAIOS REALIZADOS PELA VIA FARMA-ORDEM DE FRACIONAMENTO: 40084		RESULTADOS
TESTES	ESPECIFICACOES	REFERENCIA
Aparência	Líquido	De acordo
Cor	Incolor a levemente amarelado	Lev. amarelado
Odor	Característico	De acordo
Densidade aparente	0.820 a 0.990g/ml	0,874
I. de refração	1.455 a 1.475	1,473
Solubilidade	Sol. em palmitato de isopropila, isoparafina, e óleo mineral	De acordo
REF. BIBLIOGRAFICA: O PRODUTO SEGUE ANÁLISE DO FABRICANTE		
(*) Os ensaios assinalados foram realizados em Laboratório Terceirizado.		
ARMAZENAMENTO: EMBALAGEM FECHADA/AO ABRIGO DA LUZ/LOCAL SECO E AREJADO.		
ADV. SEGURANÇA: NÃO SE APLICA		
CONCLUSÃO.: APROVADO		
ESTE DOCUMENTO É UMA COPIA DO ORIGINAL ! SE HOUVER DUVIDA ENTRE EM CONTATO C/ NOSSO DEPTO. TÉCNICO.		
 <b>Karina Pontes Martinho</b> <small>Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263</small>		 <b>Renata Cézar</b> <small>Farmacêutica Responsável pelo Controle de Qualidade CRF-SP: 34.899</small>
<small>As assinaturas são válidas somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.            É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nossa farmacêutica do Controle de Qualidade pelo Telefone: (11) 2067-5713</small>		

## ANEXO 3. ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA



**CERTIFICADO DE ANÁLISES**

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1



### SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA

#### CERTIFICADO DE ANÁLISES

---

<b>PRODUTO:</b>	<b>OLEO ESSENCIAL LAVANDA 0.050 KG</b>	
<b>FABRICANTE:</b>	AROMAX	<b>PROCEDÊNCIA:</b> BRASIL
<b>PAÍS DE ORIGEM:</b>	BRASIL	<b>LOTE INTERNO:</b> 048760
<b>LOTE:</b>	140102382	<b>VALIDADE:</b> 23/01/2016
<b>FABRICAÇÃO:</b>	23/01/2014	
<b>CAS:</b>	N/A	
<b>DCB:</b>	N/A	
<b>DCI:</b>	N/A	
<b>GRUPO:</b>	COSMETICO	

---

**# ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE #**

TESTES	ESPECIFICAÇÕES RESULTADOS	
Índice refracão	1,455 a 1,465 (20 °C) 1,458	
Densidade	0,880 a 0,930 (20 °C) 0,883	
Aspecto	Limpido	De acordo
Odor/ Sabor	Característico	De acordo
Cor	Incolor a amarelo	Lev. amare
Sensorial	Conforme padrao	De acordo

Observacao: Este lote foi fabricado conforme boas praticas de fabricacao, livre de materiais estranhos.

---

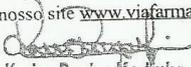
**REF. BIBLIOGRÁFICA:** O PRODUTO SEGUE ANÁLISE DO FABRICANTE.  
**ARMAZENAMENTO:** MANTER HERMET. FECHADO / AO ABRIGO DA LUZ  
**CONCLUSÃO:** APROVADO

---

**RUA LABATUT, 403 - IPIRANGA - CEP: 04214-000 - SÃO PAULO / SP**

---

Visite nosso site [www.viafarmanet.com.br](http://www.viafarmanet.com.br)

  
**Karina Pontes Martinho**  
 Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263

A assinatura é válida somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.  
 É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nosso Controle de Qualidade pelo telefone: (11) 2067-5713

## ANEXO 4. ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM SANTO (LEMONGRASS)



Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

# SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA

## CERTIFICADO DE ANÁLISES

PRODUTO:	<b>OLEO ESSENCIAL LEMONGRASS 0.050</b>	
	<b>KG</b>	
FABRICANTE:	AROMAX	
PAÍS DE ORIGEM:	BRASIL	PROCEDÊNCIA: BRASIL
LOTE:	140205450	LOTE INTERNO: 048940
FABRICAÇÃO:	18/02/2014	VALIDADE: 18/02/2015
CAS:	N/A	
DCB:	N/A	
DCI:	N/A	
GRUPO:	COSMETICO	

### # ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE #

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Densidade	0,907 a 0,919 (20 °C)	0,919
Índice de refração	1,413 a 1,425 (20 °C)	1,424
Aspecto	Limpido	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Cor	Levemente amarelo a amarelo	Am. claro
Sensorial	Conforme padrão	De acordo
Sabor	Característico	De acordo

REF. BIBLIOGRÁFICA: O PRODUTO SEGUE ANÁLISE DO FABRICANTE.  
ARMAZENAMENTO: MANTER HERMET. FECHADO / AO ABRIGO DA LUZ  
CONCLUSÃO: APROVADO

RUA LABATUT, 403 - IPIRANGA - CEP: 04214-000 - SÃO PAULO / SP

Visite nosso site [www.viafarmanet.com.br](http://www.viafarmanet.com.br)

Karina Pontes Martinho  
Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263

A assinatura é válida somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.  
Não manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nosso Controle de Qualidade pelo telefone: (11) 2067-5713

## ANEXO 5. ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE



# SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA

## CERTIFICADO DE ANÁLISES

**PRODUTO:** OLEO ESSENCIAL GENGIBRE 0.050 KG  
**FABRICANTE:** AROMAX  
**PAÍS DE ORIGEM:** BRASIL  
**LOTE:** 140101588  
**FABRICAÇÃO:** 05/02/2014  
**CAS:** N/A  
**DCB:** N/A  
**DCI:** N/A  
**GRUPO:** COSMETICO

**PROCEDÊNCIA:** BRASIL  
**LOTE INTERNO:** 048761  
**VALIDADE:** 05/02/2016

### # ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE #

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Densidade	0.828 - 0.840 (20 °C)	0.828
Índice de refração	1.393 - 1.405 (20 °C)	1.396
Cor	Amarelo claro a amarelo escuro	Amar. clar
Sensorial	Conforme	De acordo
Sabor	Característico	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Aspecto físico	Limpido a turvo	Lev. turvo

Obs.: Este lote foi fabricado conforme as Boas Práticas de  
 Fabricação  
 livre de materiais estranhos.

**REF. BIBLIOGRÁFICA:** O PRODUTO SEGUE ANÁLISE DO FABRICANTE.  
**ARMAZENAMENTO:** MANTER HERMET. FECHADO / AO ABRIGO DA LUZ  
**CONCLUSÃO:** APROVADO

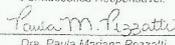
RUA LABATUT, 403 - IPIRANGA - CEP: 04214-000 - SÃO PAULO / SP

Visite nosso site [www.viafarmanet.com.br](http://www.viafarmanet.com.br)

  
 Karina Pontes Martinho  
 Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.585

A assinatura é válida somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.  
 É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nosso Controle de Qualidade pelo telefone: (11) 2067-6718

## ANEXO 6. ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA

Vigilância Sanitária CEVS 353870901-519-000001-1-6 M.S. 1.05.983-7	CONTROLE DE QUALIDADE Laudo de Análise    Flores e ervas Com. Farm. Ltda. - Estrada Vicinã Bellini, 175 - Piracicaba - SP CNPJ: 00.602.210/0001-50 E-mail: florien@florien.com.br Website: www.florien.com.br Fone: (19) 3429-1199	Farmacêutica Responsável:  Dra. Paula Mariana Pezzetti CRF-SP 35044																																				
 EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA.																																						
<b>INFORMAÇÕES GERAIS</b>																																						
Nosso Lote : 051469 Nomenclatura : ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA Nome científico : Melaleuca alternifolia Origem : Inglaterra	Parte utilizada : Brotos e folhas Esterilização : Não houve Manufatura : 01/2013 Lote de origem : TKPZ130116	Validade/ fornecedor: 01/2016 Validade/ nosso lote : 01/2016 Método de secagem : NA																																				
<b>ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS</b> NA																																						
<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>																																						
Cor : Levemente amarelado	Odor : Característico	Sabor: Característico																																				
<b>CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS</b>																																						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Aspecto</th> <th>Especificação</th> <th>Resultado</th> <th>Especificação</th> <th>Resultado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Elementos estranhos :</td> <td>Líquido oleoso</td> <td>De acordo</td> <td>pH :</td> <td>De 4 a 7 5,5</td> </tr> <tr> <td>Umidade :</td> <td>Ausente</td> <td>De acordo</td> <td>Solubilidade :</td> <td>Insolúvel em água</td> </tr> <tr> <td>Cinzas totais :</td> <td>NA</td> <td>NA</td> <td>Densidade :</td> <td>De 0,85 a 0,95 g/mL</td> </tr> <tr> <td>Cinzas insolúveis :</td> <td>NA</td> <td>NA</td> <td>Líquido extrator :</td> <td>NA</td> </tr> <tr> <td>Metais pesados :</td> <td>NA</td> <td>NA</td> <td>Teor alcoólico :</td> <td>NA</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>Resíduo seco :</td> <td>NA</td> </tr> </tbody> </table>	Aspecto	Especificação	Resultado	Especificação	Resultado	Elementos estranhos :	Líquido oleoso	De acordo	pH :	De 4 a 7 5,5	Umidade :	Ausente	De acordo	Solubilidade :	Insolúvel em água	Cinzas totais :	NA	NA	Densidade :	De 0,85 a 0,95 g/mL	Cinzas insolúveis :	NA	NA	Líquido extrator :	NA	Metais pesados :	NA	NA	Teor alcoólico :	NA				Resíduo seco :	NA			
Aspecto	Especificação	Resultado	Especificação	Resultado																																		
Elementos estranhos :	Líquido oleoso	De acordo	pH :	De 4 a 7 5,5																																		
Umidade :	Ausente	De acordo	Solubilidade :	Insolúvel em água																																		
Cinzas totais :	NA	NA	Densidade :	De 0,85 a 0,95 g/mL																																		
Cinzas insolúveis :	NA	NA	Líquido extrator :	NA																																		
Metais pesados :	NA	NA	Teor alcoólico :	NA																																		
			Resíduo seco :	NA																																		
<b>TESTES DE IDENTIFICAÇÃO</b> NA																																						
1-Identificação por colorimetria 2-Espectrometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros																																						
<b>CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS</b>																																						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Análise</th> <th>Especificação</th> <th>Resultado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Contagem padrão em placas :</td> <td>&lt; 100 ufc/g</td> <td>Máx. 10.000 ufc/g De acordo</td> </tr> <tr> <td>Bolores e leveduras :</td> <td>&lt; 10 ufc/g</td> <td>Máx. 100 ufc/g ou ml De acordo</td> </tr> <tr> <td>Contagem de enterobactérias :</td> <td>&lt; 10 ufc/g</td> <td>Máx. 100 ufc/g ou ml De acordo</td> </tr> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> (coliformes) :</td> <td>Ausente</td> <td>Ausência De acordo</td> </tr> <tr> <td><i>Staphylococcus aureus</i> :</td> <td>Ausente</td> <td>Ausência De acordo</td> </tr> <tr> <td><i>Pseudomonas aeruginosas</i> :</td> <td>Ausente</td> <td>Ausência De acordo</td> </tr> <tr> <td><i>Salmonella</i> sp :</td> <td>Ausente</td> <td>Ausência De acordo</td> </tr> </tbody> </table>	Análise	Especificação	Resultado	Contagem padrão em placas :	< 100 ufc/g	Máx. 10.000 ufc/g De acordo	Bolores e leveduras :	< 10 ufc/g	Máx. 100 ufc/g ou ml De acordo	Contagem de enterobactérias :	< 10 ufc/g	Máx. 100 ufc/g ou ml De acordo	<i>Escherichia coli</i> (coliformes) :	Ausente	Ausência De acordo	<i>Staphylococcus aureus</i> :	Ausente	Ausência De acordo	<i>Pseudomonas aeruginosas</i> :	Ausente	Ausência De acordo	<i>Salmonella</i> sp :	Ausente	Ausência De acordo														
Análise	Especificação	Resultado																																				
Contagem padrão em placas :	< 100 ufc/g	Máx. 10.000 ufc/g De acordo																																				
Bolores e leveduras :	< 10 ufc/g	Máx. 100 ufc/g ou ml De acordo																																				
Contagem de enterobactérias :	< 10 ufc/g	Máx. 100 ufc/g ou ml De acordo																																				
<i>Escherichia coli</i> (coliformes) :	Ausente	Ausência De acordo																																				
<i>Staphylococcus aureus</i> :	Ausente	Ausência De acordo																																				
<i>Pseudomonas aeruginosas</i> :	Ausente	Ausência De acordo																																				
<i>Salmonella</i> sp :	Ausente	Ausência De acordo																																				
<b>TEOR DE PRINCÍPIO ATIVO</b>																																						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Especificação</th> <th>Resultado</th> <th>Método utilizado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Especificação	Resultado	Método utilizado																																			
Especificação	Resultado	Método utilizado																																				
1-Identificação por colorimetria 2-Espectrometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros																																						
<b>CONCLUSÃO DA ANÁLISE</b> Aprovado	<b>DATA DA ANÁLISE</b> 20/01/2014	<b>DATA DA IMPRESSÃO</b>																																				
<b>QBS</b>																																						
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>																																						
ALONSO, Jorge. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. 1. ed. Rosario: Corpus Libros, 2004. CUNHA, A. Proença et al. Plantas e produtos vegetais em cosmética e																																						
• AS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PRESENTES NESTE LAUDO ATENDEM AOS LIMITES ESTABELECIDOS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE E SUA VALIDADE SERÁ DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMAZENADO EM LOCAIS INADEQUADOS. • "NA" CORRESPONDE A TESTE NÃO APLICÁVEL. • A ALTERAÇÃO DE COR PODERÁ OCORRER POR SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL.																																						

## ANEXO 7. TINTURA DE ARNICA

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Código do Produto: TINTURA ARNICA Nota Fiscal: 58127  
 Nome Comercial do Produto: TINTURA ARNICAE  
 Nome Científico: ARNICAE  
 Procedência: 11/2013  
 Data de Fabricação: 11/2018  
 Data de Validade: 7067 - (339)  
 Número de Lote do Fabricante: 22  
 Emissão: 17/04/2014

**ENL**  
**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
 Sua farmácia mais completa  
 Autorização de Funcionamento  
 M.S.1.04.882-1

Extrato vegetal (Tintura)  
 Materia-prima usada como intermediária.  
 Não destinada ao isolamento de substâncias puras.  
 MATERIA-PRIMA  
 DESCRICAO  
 Nome popular : Arnica  
 Nomenclatura botânica: Arnica montana (Linnaeus)  
 Família botânica : Compositae (Asteraceae)  
 Parte utilizada : Capitulos florais  
 Lote : 3  
 Analise : 3  
 EXTRATO  
 DESCRICAO  
 Forma farmacêutica : Tintura  
 Relacao Droga:Extrato: 1:5 (20,00%p/V)  
 Solucao extrativa : Etanol 70øGL  
 Operacao extrativa : Percolacao simples  
 Cada 10,00mL de Tintura de Arnica, devem corresponder aos componentes  
 solúveis de 2,00g da materia-prima seca.

ANALISE QUALITATIVA	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
<b>ANALISES</b>		
<b>CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS</b>		
Liquido de cor castanho-amarelada, de odor agradável ligeiramente aromático e com sabor amargo e ardente.		
Aspecto	Liquido	Liquido
Cor	Castanho-amarelado	Castanho-a.
Odor	Aromático suave	Aromático s
	Agradável	Agradável
	Amargo	Amargo
Sabor	Ardente	Ardente
<b>CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS</b>		
pH	5,00 a 7,00	
Densidade aparente	0,870 a 0,980g/mL	0,870g/mL
<b>PROSPECÇÃO FITOQUIMICA</b>		
Flavonoides (Quercetina)	Presença	Presença
Alcaloides	Presença	Presença
Oleo essencial	Presença	Presença
<b>Compostos fenólicos (CCD)</b>		
Acido cafeico	Rf corresponde	Corresponde
Rutina	Rf corresponde	Corresponde
Acido clorogênico	RF corresponde	Corresponde
<b>TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE</b>		
Titulo etanolico	60øGL a 70øGL	Corresponde
Residuo seco	1,00% a 6,00% m/V	

Pagina 1 de 2

Thais Cardoso Pimenta  
 Farmacêutica Responsável L.C.Q  
 CRF: SP 65.673

Marco Aurélio M. de Sousa  
 Químico Responsável  
 CRQ: 04235302

Ely A.R. Martins  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF: SP 974

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP: 14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 7. TINTURA DE ARNICA (CONCLUSÃO)

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b> 58127		
<b>Código do Produto:</b>	TINTURA ARNICA	<b>Nota Fiscal:</b>
	TINTURA ARNICAE	
<b>Nome Comercial do Produto:</b>		
<b>Nome Científico:</b>	11/2013	
<b>Procedência:</b>	11/2018	
<b>Data de Fabricação:</b>	7067	- (339)
<b>Data de Validade:</b>		
<b>Em Nome de Lote do Fabricante:</b>		



**EML**  
**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
Sua farmácia mais completa

Autorização de Funcionamento  
M.S.1.04.882-1

**PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS**

Contagem total de:

Bactérias aeróbias	VMP 10.000UFC/mL	Ausencia
Fungos	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia
Leveduras	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia

EMPREGO OFICINAL. Em preparacoes farmaceuticas

CATEGORIA. Materia-prima usada como intermediaria

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes de vidro neuto, ambar, bem fechados, ao abrigo do calor e da luz (15°C a 25°C).

NOTA. A formacao de ligeiro sedimento durante a armazenagem e aceitavel, desde que, a composicao do extrato vegetal nao sofra alteracoes signifivativas (F.B.V. Parte I, pagina 205)

REFERENCIAS

Farmacopeia Brasileira quinta edicao. Parte I (5.2.5); (5.2.12); (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.3) e (5.5.3.1.5).

Farmacopeia Brasileira quinta edicao. Parte II, pagina 646 (Droga)

Farmacopeia Homeopatica Brasileira, terceira edicai, paginas 166/167/168 e pagina 56 (10.1.1.2).

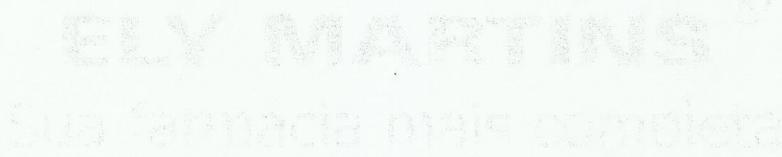
Farmacopeia Brasileira primeira edicao, pagina 900

Instrucao Normativa numero 5 (5)

CONCLUSAO. Os resultados analiticos correspondem com as especificacoes das referencias citadas ((PRODUTO APROVADO))

COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL

CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA





Thais Cardoso Pimenta  
Farmacêutica Responsável L.C.Q  
CRF: SP 65.673



Marco Aurélio M. de Sousa  
Química Responsável  
CRQ: 04235302

Pagina 2 de 2



Ely A.R. Martins  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF: SP 974

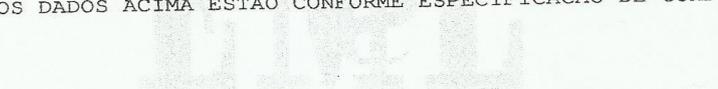
www.elymartins.com.br  
Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP  
controle@elymartins.com.br

## ANEXO 8. TINTURA DE BARBATIMÃO

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		61925
Código do Produto: TBAR	Nota Fiscal:	
TINTURA BARBATIMAO		
Nome Comercial do Produto:	TINTURA STRYPHODENDRON BARB	
Nome Científico:	BRASIL	
Procedência:	07/2014	
Data de Fabricação:	07/2019	
Data de Validade:	7103 - ( 2 )	
Número de Lote do Fabricante:	7103 - ( 2 )	
Emissão: 06/08/2014	<b>22</b> <i>anos</i>	
 <b>ELY MARTINS®</b> Sua farmácia mais completa		
Autorização de Funcionamento M.S.1.04.882-1		
ANÁLISE E.F:		
OF:		
Extrato vegetal (Tintura)		
Materia-prima usada como intermediária.		
Nao destinada ao isolamento de substancias puras.		
MATERIA-PRIMA		
DESCRICAO		
Nome popular	: Barbatimao	
Nomenclatura botanica	: Stryphnodendron barbatimam (Martius)	
Familia botanica	: Fabaceae	
Parte utilizada	: Cortex seco	
Lote	: 054	
Análise	: 100413/02	
EXTRATO		
DESCRICAO		
Forma farmaceutica	: Tintura	
Relacao Droga:Extrato	: 1:5 (20,00%p/V)	
Solucao extrativa	: Etanol 70øGL	
Operacao extrativa	: Percolacao simples	
Cada 10,00mL de Tintura de Barbatimao, devem corresponder aos componente soluveis de 2,00g da materia-prima seca.		
ANÁLISE QUALITATIVA		RESULTADOS
CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS		
Liquido vermelho-pardo-escuro, ou Vermelho-morango, quando diluido em agua. De odor nao particular e com sabor adstringente.		
Aspecto	Liquido-limpido	Liquido-limpido
Cor	Vermelho-pardo-escuro	Vermelho-pardo-escuro
Cor (diluido em agua)	Vermelho-morango	Vermelho-morango
Odor	Nao definido	Nao definido
Sabor	Adstringente	Adstringente
CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS		
pH	5,50 a 6,50	5,40
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,901g/mL
PROSPECCAO FITOQUIMICA		
Taninos	Presenca	Presenca
Flavonoides	Presenca	Presenca
Alcaloides	Presenca	Presenca
Saponinas	Presenca	Presenca
Resinas	Presenca	Presenca
Antraquinonas	Presenca	Presenca
TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE		
Titulo etanolic	60øGL a 70øGL	Corresponde
Residuo seco	1,00% a 6,00%p/V	2,58%p/V
		
Thais Cardoso Pimenta Farmacêutica Responsável L.C.Q CRF: SP 65.673		Ely A.R. Martins Farmacêutica Responsável Técnico CRF: SP 974
		Pagina 1 de 2
Marco Aurélio M. de Sousa Químico Responsável CRF: 04235302		
www.elymartins.com.br Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP controle@elymartins.com.br		

## ANEXO 8. TINTURA DE BARBATIMÃO (CONCLUSÃO)

<b>CERTIFICADO DE ANALISE</b>		61925
<b>Código do Produto:</b>	TBAR	<b>Nota Fiscal:</b>
<b>Nome Comercial do Produto:</b>	TINTURA BARBATIMAO	 <b>EML</b> <b>ELY MARTINS®</b> Sua farmácia mais completa Autorização de Funcionamento M.S.1.04.862-1
<b>Nome Científico:</b>	TINCTURA STRYPHODENDRON BARB	
<b>Procedência:</b>	BRASIL	
<b>Data de Fabricação:</b>	07/2014	
<b>Data de Validade:</b>	07/2019	
<b>Número de Lote do Fabricante:</b>	7103 - ( 2 )	
<b>Emissao:</b>	06/08/2014	
<b>PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS</b>		
Contagem total de:		
Bactérias aeróbias	VMP 10.000UFC/mL	Ausencia
Fungos	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia
Leveduras	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia
EMPREGO OFICIAL. Em preparacoes farmaceuticas.		
CATEGORIA. Materia-prima usada como intermediaria.		
EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO. Em frascos de vidro neutro, ambar, hermeticamente fechados, ao abrigo do calor e da luz (15°C a 25°C).		
NOTA. A formacao de ligeiro sedimento durante a armazenagem e aceitavel, desde que, a composicao do extrato vegetal, nao sofra modificacoes significativas.(F.B.V. Parte I pagina 205).		
REFERENCIAS		
Farmacopeia Brasileira, quinta edicao, Parte I, (5.2.5); (5.2.12); (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2); (5.5.3.1.5)		
Farmacopeia Brasileira, quarta edicao, Parte II (176).		
Farmacopeia Brasileira, primeira edicao, paginas 117 e 902.		
Farmacopeia Homeopatica Brasileira, terceira edicao, (10.1.1.2) pag 56.		
Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento. Simoes, C.M.O. et al, paginas 319 e 643.		
CONCLUSAO. Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas.(PRODUTO APROVADO).		
COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL.		
CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA		

  
**ELY MARTINS®**  
 Sua farmácia mais completa

 Thais Cardoso Pimenta Farmacêutica Responsável L.C.Q CRF: SP 65.673	 Marco Aurélio M. de Sousa Química Responsável CRQ: 04235302	Pagina 2 de 2  Ely A.R. Martins Farmacêutica Responsável Técnica CRF: SP 974
--	--	---

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 9. TINTURA DE CALENDULA

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		61925
Código do Produto: TCAL	Nota Fiscal:	
Nome Comercial do Produto: TINTURA CALENDULA		
Nome Científico: TINCTURA CALENDULA OFFICINALIS		
Procedência: BRASIL		
Data de Fabricação: 06/2014		
Data de Validade: 06/2019		
Número de Lote do Fabricante: 7088	- ( 2 )	
Emissao: 06/08/2014	<b>22</b>	
		
<p>Extrato vegetal (Tintura)  Materia-prima usada como intermediária  Nao destinada ao isolamento de substancias puras.  MATERIA-PRIMA</p>		
DESCRICAO		
Nome popular	: Calendula	
Nomenclatura botanica	: Calendula officinalis (Linnaeus)	
Familia botanica	: Asteraceae	
Parte utilizada	: Flor estabilizada (capitulo floral)	
Lote	: 018	
Analise	: 120413/04	
EXTRATO		
DESCRICAO		
Forma farmaceutica	: Tintura	
Relacao Droga/Extrato:	1:5p/V (20,00%p/V)	
Solucao extrativa	: Etanol 70øGL	
Operacao extrativa	: Percolacao simples	
Cada 10,00mL de Tintura de Calendula, devem corresponder aos componentes soluveis de 2,00g da materia-prima seca.		
ANALISE QUALITATIVA	PECIFICACOES	RESULTADOS
ANALISES		
CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS	Liquido castanho-amarelado, de odor ligeiramente nauseoso e com sabor acre e levemente amargo.	
Aspecto	Liquido-limpido	Liquido-limpido
Cor	Castanho-amarelada	Castanho-amarelada
Odor	Aromatico	Aromatico
Sabor	Acre	Acre
	Amargo suave	Amargo suave
CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS		
pH	5,50 a 6,50	5,59
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,872g/mL
PROSPECACAO FITOQUIMICA		
Saponinas	Presenca	Presenca
Flavonoides	Presenca	Presenca
Taninos	Presenca	Presenca
Resinas	Presenca	Presenca
Oleo essencial	Presenca	Presenca
Alcaloides	Presenca	Presenca
TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE		
Titulo etanolic	60øGL a 70øGL	Corresponde
Residuo seco	1,00% a 6,00%p/V	3,10%p/V
PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS		
Contagem total de:		
  		
Thais Cardoso Pimenta Farmacêutica Responsável L.C.Q. CRF: SP 65.673	Marco Aurélio M. de Sousa Química Responsável CRQ: 04235302	Pagina 1 de 2 Ely A.R. Martins Farmacêutica Responsável Técnica CRF: SP 974
<a href="http://www.elymartins.com.br">www.elymartins.com.br</a> Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP controle@elymartins.com.br		

## ANEXO 9. TINTURA DE CALENDULA (CONCLUSÃO)

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Código do Produto: TCAL Nota Fiscal: 61925

Nome Comercial do Produto: TINTURA CALENDULA  
 Nome Científico: TINTURA CALENDULA OFFICINALIS  
 Procedência: BRASIL  
 Data de Fabricação: 06/2014  
 Data de Validade: 06/2019  
 Número de Lote do Fabricante: 7088 - ( 2)

**EML**  
**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
 Sua farmácia mais completa  
 Autorização de Funcionamento  
 M.S. 1.04.882-1

Emissao: 06/08/2014	VMP 10.000UFC/mL	Ausencia
Bacterias aerobias	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia
Fungos	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia
Leveduras	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia

EMPREGO OFICINAL. Em preparacoes farmaceuticas.  
 CATEGORIA. Materia-prima usada como intermediaria.  
 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO. Em frascos de vidro neutro, ambar, hermeticamente fechados, ao abrigo do calor e da luz. (15°C a 25°C).  
 NOTA. A formacao de ligeiro sedimento durante a armazenagem e aceitavel, desde que, a composicao do extrato vegetal, nao sofra modificacoes significativas. (F.B.V. Parte I, pagina 205).  
 REFERENCIAS  
 Farmacopeia Francesa.  
 Farmacopeia Homeopatica Brasileira, terceira edicao, pagina 198 e (10.1.1.2), pagina 56.  
 Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento, Simoes, C.M.O. et all, quinta edicao, pagina 316.  
 Farmacopeia Brasileira, quinta edicao, parte I, (5.2.5); (5.2.12); (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2) e (5.5.3.1.5).  
 Farmacopeia Brasileira quinta edicao, parte II, pagina 712.  
 Formulário Fitoterapico, pagina 72.  
 CONCLUSAO. Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas (PRODUTO APROVADO).  
 COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL.  
 CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA

**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
 Sua farmácia mais completa

Thais Cardoso Pimenta  
 Farmacêutica Responsável L.C.Q  
 CRF: SP 65.673

Marco Aurélio M. de Sousa  
 Químico Responsável  
 CRQ: 04235302

Ely A.R. Martins  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF: SP 974

Pagina 2 de 2

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP: 14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 10. TINTURA DE CAMOMILA

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

51861

**Código do Produto:** TCAM **Nota Fiscal:**

**Nome Comercial do Produto:** TINTURA CAMOMILA

**Nome Científico:** MATRICARIAE

**Procedência:** 09/2013

**Data de Fabricação:** 09/2018

**Data de Validade:** 7053 - (339)

**Número de Lote do Fabricante:**

Emissao: 21/10/2013

**EML**  
**ELY MARTINS®**  
Sua farmácia mais completa

Autorização de Funcionamento  
M.S.1.04.882-1

ANALISE 092013/01

Extrato vegetal (Tintura)

Materia-prima usada como intermediária.

Nao destinada ao isolamento de substancias puras.

**MATERIA-PRIMA**

**DESCRICAO**

**Nomes comuns** : Camomila-vulgar; Camomila-alema

**Nomenclatura botanica:** Matricaria chamomilla (Linnaeus)

: Matricaria recutita (Linnaeus)

**Familia botanica** : Asteraceae

**Parte utilizada** : Capitulo floral seco e estabilizado

**Lote** : 019

**Análise** : 060813/01 e 4058

**EXTRATO**

**DESCRICAO**

**Forma farmaceutica** : Tintura

**Relacao Droga:Extrato:** 1:5 (20,00p/V)

**Solucao extrativa** : Etanol 70øGL

**Operacao extrativa** : Percolacao simples

Cada 10,00mL de Tintura de Camomila, devem corresponder aos componentes soluveis de 2,00g da materia-prima seca.

**ANALISE QUALITATIVA ESPECIFICACOES RESULTADOS**

**CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS**

Liquido limpido, pardo-esverdeado, de odor aromatico particular e com sabor amargo e aromatico.

<b>Aspecto</b>	Liquido-limpido	Liquido-limpido
<b>Cor</b>	Castanho-esverdeada	Castanho-esverd.
<b>Odor</b>	Aromatico	Aromatico
	Caracteristico	Caracteristico
<b>Sabor</b>	Amargo	Amargo
	Aromatico	Aromatico

**CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS**

pH	4,50 a 6,50	5,80
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,910g/mL

**PROSPECCAO FITOQUIMICA**

Oleo essencial	Presenca	Presenca
Flavonoides	Presenca	Presenca
Cumarinas	Presenca	Presenca
Alfa bisabolol'	Presenca	Presenca
Azuleno	Presenca	Presenca

**TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE**

Título etanólico	60øGL a 70øGL	Corresponde
Residuo seco	1,00% a 6,00p/V	5,89p/V

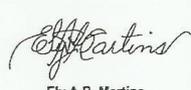
**PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS**

21/10/18

Pagina 1 de 2

  
Thais Cardoso Pimenta  
Farmacêutica Responsável L.C.Q.  
CRF: SP 65.673

  
Marco Aurélio M. de Sousa  
Química Responsável  
CRQ: 04235302

  
Ely A.R. Martins  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF: SP 974

www.elymartins.com.br  
Rua Domingos Padovan, 1440 - (16) 2101.0190 - Jardim Anhanguera - 14092-040 - Ribeirão Preto - SP  
controle@elymartins.com.br

## ANEXO 10. TINTURA DE CAMOMILA (CONCLUSÃO)

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		51861
<b>Código do Produto:</b> TCAM	<b>Nota Fiscal:</b>	
<b>Nome Comercial do Produto:</b> TINTURA CAMOMILA		
<b>Nome Científico:</b> MATRICARIAE		
<b>Procedência:</b> 09/2013		
<b>Data de Fabricação:</b> /2018		
<b>Data de Validade:</b> 7053	- (339)	
<b>Número de Lote do Fabricante:</b>		

Emissão: 21/10/2013

Contagem total de:

Bactérias aeróbias	VMP 10.000UFC/mL	Ausencia
Fungos	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia
Leveduras	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia

EMPREGO OFICINAL. Em preparacoes farmaceuticas.

CATEGORIA. Materia-prima usada como intermediaria.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em frascos de vidro neutro, neutro, ambar, hermeticamente fechados, protegidos do calor e da luz (15°C a 25°C).

NOTA. A formacao de ligeiro sedimento durante a armazenagem e aceitavel, desde que, a composicao do extrato vegetal, nao sofra modificacoes significativas. F.B.V. Parte I, pagina 205.

REFERENCIAS

Farmacopeia Brasileira quinta edicao. Parte I (5.2.5); (5.2.12); (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2) e (5.5.3.1.5).

Farmacopeia Brasileira segunda edicao, pagina 814

Farmacopeia Homeopatica Brasileira, terceira edicao, pagina 204 (planta inteira florida).

Farmacopeia Homeopatica Brasileira, terceira edicao (10.1.1.2) pg 56

Farmacopeia Brasileira, quarta edicao. Parte II (13). Droga vegetal.

Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento, Simoes, C.M.O et al.

CONCLUSAO. Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas (PRODUTO APROVADO).

COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL

CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA



**ELY MARTINS®**  
Sua farmácia mais completa

Autorização de Funcionamento  
M.S.1.04.882-1



Thais Cardoso Pimenta  
Farmacêutica Responsável L.C.Q.  
CRF: SP 65.673



Marco Aurélio M. de Sousa  
Química Responsável  
CRQ: 04235302



Ely A.R. Martins  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF: SP 974

Pagina 2 de 2

www.elymartins.com.br  
Rua Domingos Padovan, 1440 - (16) 2101.0190 - Jardim Anhanguera - 14092-040 - Ribeirão Preto - SP  
controle@elymartins.com.br

## ANEXO 11. TINTURA DE ESPINHEIRA SANTA

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

Código do Produto: TINTURA ESPINHEIRA-SANTA Nota Fiscal: 58127  
 Nome Comercial do Produto: TINTURA MAYTENUS ILICIFOLIA  
 Nome Científico: BRASIL  
 Procedência: 09/2013  
 Data de Fabricação: 09/2018  
 Data de Validade: 7048 - (339)  
 Número de Lote do Fabricante:  
 Emissão: 17/04/2014

**EML**  
**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
 Sua farmácia mais completa

Autorização de  
 Funcionamento  
 M.S.1.04.882-1

Extrato vegetal (Tintura)  
 Materia-prima usada como intermediária  
 Não destinada ao isolamento de substâncias puras

## MATERIA-PRIMA

## DESCRICAO

22  
 Nomes populares : Espinheira-santa; Espinheira-divina; Cancorosa  
 Nomenclatura botânica : Maytenus ilicifolia (Martius)  
 Família botânica : Celastraceae  
 Parte utilizada : Folha seca  
 Lote : 050  
 Analises : 4006 e 010813/03

## EXTRATO

## DESCRICAO

Forma farmacêutica : Tintura  
 Relacao Droga:Extrato : 1:5 (20,00%p/V)  
 Solucao extrativa : Etanol 70øGL  
 Operacao extrativa : Percolacao simples  
 Cada 10,00mL de Tintura de Espinheira-santa, devem corresponder ao  
 componentes soluveis de 2,00g da materia-prima seca.

## ANALISE QUALITATIVA ESPECIFICACOES RESULTADOS

## CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS

Liquido limpido verde-escuro, levemente amarelado, com odor  
 característico e de sabor suave, levemente adstringente.

Aspecto	Liquido limpido	Liq. limp.
Cor	Verde-amarelada	Verde-amarela
Odor	Característico	Caract. Sabor
Sabor	Adstringente-suave	Corresponde

## CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS

pH	5,00 a 6,50	5,50
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,900g/mL

## PROSPECCAO FITOQUIMICA

Taninos	Presenca	Presenca
Flavonoides	Presenca	Presenca
Resinas	Presenca	Presenca
Saponinas	Presenca	Presenca
Alcaloides	Presenca	Presenca
Catequinas	Rf 0,84 aprox.	Corresponde
Isocatequinas	Rf 0,64 aprox.	Corresponde

## TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE

Titulo etanolic	60øGL a 70øGL	Corresponde
Residuo seco	1,00% a 6,00%p/V	5,50%p/V

## PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

Contagem total de:		
Bacterias aerobias	VMP 10.000UFC/mL	Ausencia



Thais Cardoso Pimenta  
 Farmacêutica Responsável L.C.Q  
 CRF: SP 65.673



Marco Aurélio M. de Sousa  
 Químico Responsável  
 CRQ: 04235302



Ely A.R. Martins  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF: SP 974

Página 1 de 2

## ANEXO 11. TINTURA DE ESPINHEIRA SANTA (CONCLUSÃO)

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		58127
<b>Código do Produto:</b>	TINTURA ESPINHEIRA-SANTA	<b>Nota Fiscal:</b>
	TINCTURA MAYTENUS ILICIFOLIA	
<b>Nome Comercial do Produto:</b>		
<b>Nome Científico:</b>	09/2013	
<b>Procedência:</b>	09/2018	
<b>Data de Fabricação:</b>	7048	- (339)
<b>Data de Validade:</b>		
<b>Nome do Laboratório Fabricante:</b>		



**ELY MARTINS®**  
Sua farmácia mais completa

Fungos	VMP 1.000UEC/mL	Ausencia	Autorização de Funcionamento M.S.1.04.882-1
Leveduras	VMP 1.000UEC/mL	Ausencia	

**EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO:** Em frasco de vidro neutro, ambar, hermeticamente fechado, ao abrigo do calor e da luz (15°C a 25°C).

**REFERENCIAS**  
 Farmacopeia Brasileira quinta edicao. Parte I (5.2.5); (5.2.12); (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); )5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2); (5.5.3.1.5)  
 Farmacopeia Brasileira quinta edicao. Parte II pagina 920.  
 Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento. Simoes, C.M.O et al  
 Farmacopeia Homeopatica Brasileira terceira edicao (10.1.1.2) pag. 56

**NOTA:**  
 A formacao de leve sedimentacao durante o armazenamento, e aceitavel, desde que, a composicao do extrato vegetal, nao sofra alteracoes significativas. F.B.II. Parte I, pagina 205.  
**EMPREGO OFICINAL.** Em preparacoes farmaceuticas.  
**CATEGORIA.** Materia-prima usada como intermediaria.  
**CONCLUSAO.** Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas (PRODUTO APROVADO)  
**COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL**  
**CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA**



**ELY MARTINS®**  
Sua farmácia mais completa



Thais Cardoso Pimenta  
Farmacêutica Responsável L.C.Q  
CRF: SP 65.673



Marco Aurélio M. de Sousa  
Química Responsável  
CRQ: 04235302



Ely A.R. Martins  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF: SP 974

Pagina 2 de 2

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 12. TINTURA DE EUCALIPTO

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Código do Produto: TEUC Nota Fiscal: 61925

Nome Comercial do Produto: TINTURA EUCALYPTO

Nome Científico: TINTURA EUCALYPTUS GLOBULUS

Procedência: BRASIL

Data de Fabricação: 10/2013

Data de Validade: 10/2018

Número de Lote do Fabricante: 7057 - (339)

missao: 06/08/2014

**EML**  
**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
Sua farmácia mais completa

Autorização de Funcionamento  
M.S. 1.04.882-1

22  
anos

ANÁLISE 102013/01

extrato vegetal usado como intermediária

ao destinado ao isolamento de substâncias puras

ATERIA-PRIMA

ESCRICAO

Nome comum : Eucalipto

Materia-prima : Eucalyptus globulus (La Billardiere)

Familia : Myrtaceae

Materia utilizada : Folha seca e estabilizada

EXTRATO

ESCRICAO

Forma farmaceutica : Tintura

Relacao Droga: Extrato: 1:5p/V (20,00%p/V)

Solucao extrativa : Etanol 70oGL

Operacao extrativa : Percolacao simples

ANÁLISE QUALITATIVA ESPECIFICACOES RESULTADOS

CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS

Liquido limpo castanho-esverdeado, com odor e sabor pronunciado das

folhas.

Aspecto	Liquido-limpido	Liquido-limpido
Cor	Castanho-esverdeada	Castanho-esv.
Odor	Caracteristico forte	Caract. forte
Sabor	Caracteristico forte	Caract. forte

CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS

pH	4,50 a 6,50	5,37
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,901g/mL

PROSPECCAO FITOQUIMICA

Resinas	Presenca	Presenca
Taninos	Presenca	Presenca
Oleo essencial	Presenca	Presenca
Flavonoides	Presenca	Presenca

TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE

Titulo etanólico	60oGL a 70oGL	Corresponde
Residuo seco	1,00%p/V a 6,00%p/V	4,45p/V

PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

Contagem total de Bacterias aerobia	VMP 10.000UFC/mL	Ausencia
Fungos	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia
Leveduras	VMP 1.000UFC/mL	Ausencia

EMPREGO OFICINAL. Em preparacoes farmaceuticas.

CATEGORIA. Materia-pprima usada como intermediaria.

NOTA. A formacao de ligeiro sedimento durante a armazenagem, e aceitavel, desde que, a composicao do Extrato vegetal, nao sofra modificacoes significativas. F.B.V. Parte I, pagina 205.

Pagina 1 de 2

Thais Cardoso Pimenta  
Farmacêutica Responsável L.C.Q.  
CRF: SP 65.673

Marco Aurélio M. de Sousa  
Química Responsável  
CRQ: 04235302

Ely A.R. Martins  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF: SP 974

www.elymartins.com.br  
Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP: 14.140-000 - Cravinhos - SP  
controle@elymartins.com.br

## ANEXO 12. TINTURA DE EUCALIPTO (CONCLUSÃO)

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		61925
Nome do Produto:	TEUC	Nota Fiscal:
Nome Comercial do Produto:	TINTURA EUCALYPTO	
Nome Científico:	TINTURA EUCALYPTUS GLOBULUS	
Procedência:	BRASIL	
Data de Fabricação:	10/2013	
Data de Validade:	10/2018	
Número de Lote do Fabricante:	7057	- (339)



**EML**  
ELY MARTINS®  
Sua farmácia mais completa

Autorização de Funcionamento  
M.S.1.04.892-1

Emissão: 06/08/2014

**EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO**  
Em frasco de vidro neutro, ambar, hermeticamente fechado, ao abrigo do calor e da luz (15°C a 25°C).

*22 anos*

**REFERENCIAS**  
Farmacopeia Brasileira, quinta edicao. Parte I (5.2.1); (5.2.10); (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2); (5.5.3.1.3)  
Farmacopeia Brasileira quarta edicao. Parte II (27)  
Farmacopeia Brasileira segunda edicao, pagina 923.  
Farmacognosia, Da Planta ao Medicamento, Simoes C.M.O. et al.  
Farmacopeia Homeopatica Brasileira, terceira edicao (10.1.1.2), pag.36

**CONCLUSAO.** Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas (PRODUTO APROVADO).

COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL

CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA



**ELY MARTINS®**  
Sua farmácia mais completa

 Thais Cardoso Pimenta Farmacêutica Responsável L.C.Q. CRF: SP 65.673	 Marco Aurélio M. de Sousa Química Responsável CRQ: 04235302	 Ely A.R. Martins Farmacêutica Responsável Técnica CRF: SP 974
---	--	--

Pagina 2 de 2

www.elymartins.com.br  
Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP  
controle@elymartins.com.br

## ANEXO 13. TINTURA DE EQUINACEA

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Código do Produto: TEQU 61925 Nota Fiscal:

Nome Comercial do Produto: TINTURA EQUINACEA  
 Nome Científico: TINTURA EQUINACEA PURPUREA L  
 Procedência: BRASIL  
 Data de Fabricação: 05/2014  
 Data de Validade: 05/2019  
 Número de Lote do Fabricante: 7075 - ( 2 )

Emissao: 06/08/2014

**EML**  
**ELY MARTINS**  
 Sua farmácia mais completa  
 Autorização de Funcionamento  
 M.S. 1.04.882-1

Extrato vegetal (Tintura)  
 Materia-prima usada como intermediária  
 Não destinada ao isolamento de substâncias puras  
 MATERIA-PRIMA  
 DESCRICAO  
 Nome popular : Equinacea ou Echinacea  
 Nomenclatura botânica: Echinacea purpurea (L) Moench  
 Família botânica : Asteraceae  
 Parte utilizada : Planta inteira  
 Lote : 008  
 Analises : 3973 e 120713/02

EXTRATO  
 DESCRICAO  
 Forma farmacêutica : Tintura  
 Relacao Droga:Extrato: 1:5p/V (20,00%p/V)  
 Solucao extrativa : Etanol 70øGL  
 Operacao extrativa : Percolacao simples  
 Cada 10,00mL de Tintura de Equinacea, devem corresponder aos componentes soluveis de 2,00g da materia-prima seca.

ANALISE QUALITATIVA	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
<b>CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS</b>		
Líquido límpido verde-amarelado ou castanho-esverdeado, de odor aromático suave característico e com sabor agradável.		
Aspecto	Líquido límpido	Liq. límpido
Cor	Esverdeada ou Castanho-esverdeada	Esverdeada
Odor	Aromático	Aromático
Sabor	Característico	Característico
	Característico	Característico
	Agradável	Agradável
<b>CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS</b>		
pH	5,00 a 6,50	5,98
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,963g/mL
<b>PROSPECCAO FITOQUIMICA</b>		
Flavonoides	Presença	Presença
Alcaloides	Presença	Presença
Oleo essencial	Presença	Presença
Equinacosídeos	Rf corresponde	Corresponde
Cinarina	Rf corresponde	Corresponde
<b>TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE</b>		
Título etanólico	60øGL a 70øGL	Corresponde
Resíduo seco	1,00% a 6,00%p/V	1,50%p/V
<b>TESTES DE SEGURANCA BIOLOGICA</b>		

22  
anos

Thais Cardoso Pimenta  
 Farmacêutica Responsável L.C.Q  
 CRF: SP 65.673

Marco Aurélio M. de Sousa  
 Químico Responsável  
 CRF: 04235302

Ely A.R. Martins  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF: SP 974

Pagina 1 de 2

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 13. TINTURA DE EQUINACEA (CONCLUSÃO)

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Código do Produto: TEQU 61925 Nota Fiscal:

Nome Comercial do Produto: TINTURA EQUINACEA  
 Nome Científico: TINTURA EQUINACEA PURPUREA L  
 Procedência: BRASIL  
 Data de Fabricação: 05/2014  
 Data de Validade: 05/2019  
 Número de Lote do Fabricante: 7075 - ( 2)

**EML**  
**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
 Sua farmácia mais completa  
 Autorização de Funcionamento M.S.1.04.882-1

Emissão: 06/08/2014  
 Contagem total de microorganismos: **22**  
 Bactérias aeróbias VMP 10.000UFC/mL Ausência  
 Fungos VMP 1.000UFC/mL Ausência  
 Leveduras VMP 1.000UFC/mL Ausência

CATEGORIA. Materia-prima usada como intermediária.  
 EMPREGO OFICINAL. Em preparações farmacêuticas.  
 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO. Em frasco de vidro neutro, ambar, hermeticamente fechado, protegido da luz e do calor (15°C a 30°C).  
 NOTA. A formação de ligeiro sedimento durante a armazenagem, é aceitável, desde que, a composição do extrato vegetal, não sofra alterações significativas. F.B.V. Parte I, página 205.

REFERENCIAS  
 Farmacopeia Brasileira, quinta edição. Parte I, (5.2.5); (5.2.12); (5.2.17.1) (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2); (5.5.3.1.5).  
 Farmacopeia Homeopática Brasileira, terceira edição, página 56 (10.1.1.2) e página 218.  
 Farmacopeia Francesa.  
 WHO Monographs on Selected Medicinal Plants.  
 Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento. Simoes, C.M.O et all  
 CONCLUSAO. Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas (PRODUTO APROVADO).  
 COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL.  
 CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA

**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
 Sua farmácia mais completa

Pagina 2 de 2

Thais Cardoso Pimenta  
 Farmacêutica Responsável L.C.O.  
 CRF: SP 65.673

Marco Aurélio M. de Sousa  
 Químico Responsável  
 CRQ: 04235302

Ely A.R. Martins  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF: SP 974

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP: 14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 14. TINTURA DE MULUNGU

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

Código do Produto: TINTURA MULUNGU Nota Fiscal: 58127  
 Nome Comercial do Produto: ERYTRINA MULUNGU  
 Nome Científico: BRASIL  
 Procedência: 09/2013  
 Data de Fabricação: 09/2018  
 Data de Validade: 7049 - (339)  
 Número de Lote do Fabricante:  
 Emissao: 17/04/2014

**EML**  
**ELY MARTINS®**  
 Sua farmácia mais completa

Autorização de  
 Funcionamento  
 M.S.1.04.882-1

Extrato vegetal (Tintura)  
 Materia-prima usada como intermediária.  
 Não destinada ao isolamento de substâncias puras.  
 MATERIA-PRIMA

## DESCRICAO

Nome popular : Mulungu  
 Nomenclatura botânica: Erythrina mulungu (Martius)  
 Família botânica : Fabaceae  
 Parte utilizada : Cortex seco  
 Lote : 049  
 Análise : 4004 e 020813/02

## EXTRATO

## DESCRICAO

Forma farmacêutica : Tintura  
 Relação Droga:Extrato: 1:5 (20,00%p/V)  
 Solução extrativa : Etanol 70ØGL  
 Operação extrativa : Percolação simples  
 Cada 10,00mL de Tintura de Mulungu, devem corresponder aos componentes  
 solúveis de 2,00g da matéria-prima seca.

## ANÁLISE QUALITATIVA

## ESPECIFICAÇÕES

## RESULTADOS

## CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS

Líquido pardacento ou pardo-amarelado, de odor especial desagradável  
 (lembra maresia) e com sabor fracamente amargo.

Aspecto	Líquido-limpido	Líquido-limpido
Cor	Parda ou Pardo-amarelada	Pardo-amarelada
Odor	Especial	Especial
Sabor	Lembra maresia	Lembra maresia
	Amargo suave	Amargo suave

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

pH	5,00 a 6,50	6,00
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,896 g/mL

## PROSPECCAO FITOQUÍMICA

	Presença	Presença
Alcaloides	Presença	Presença
Saponinas	Presença	Presença
Oleo essencial	Presença	Presença
Flavonoides	Presença	Presença
Taninos	Presença	Presença
Resina	Presença	Presença

## TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE

Título etanólico	60ØGL a 70ØGL	Corresponde
Resíduo seco	1,00% a 6,00%p/V	2,46%p/V

## PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

Contagem total de:

Thais Cardoso Pimenta  
 Farmacêutica Responsável L.C.Q.  
 CRF: SP 65.673

Marco Aurélio M. de Sousa  
 Químico Responsável  
 CRQ: 04235302

Página 1 de 2

Ely A.R. Martins  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF: SP 974

## ANEXO 14. TINTURA DE MULUNGU (CONCLUSÃO)

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b> 58127		
<b>Código do Produto:</b>	TINTURA MULUNGU	<b>Nota Fiscal:</b>
	TINCTURA ERYTRINA MULUNGU	
<b>Nome Comercial do Produto:</b>	BRASIL	
<b>Nome Científico:</b>	09/2013	
<b>Procedência:</b>	09/2018	
<b>Data de Fabricação:</b>	7049	- (339)
<b>Data de Validade:</b>		
<b>Emissão:</b>	17/04/2014	
<b>Número de Lote do Fabricante:</b>		

Bacterias aerobias	VMP 10.000UEC/mL	Ausencia
Fungos	VMP 1.000UEC/mL	Ausencia
Leveduras	VMP 1.000UEC/mL	Ausencia

REFERENCIAS

Farmacopeia Brasileira quinta edicao. Parte I (5.2.5); (5.2.12); (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2); (5.5.3.1.5)

Farmacopeia Homeopatica Brasileira terceira edicao (10.1.1.2) pag 56

Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento. Simoes, C.M.O et al.

Farmacopeia Brasileira primeira edicao, paginas 592 e 941

Farmacopeia Brasileira segunda edicao pagina 592

EMPREGO OFICINAL. Em preparacoes farmaceuticas.

CATEGORIA. Materia-prima usada como intermediaria.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO. Em frascos de vidro neutro, ambar, hermeticamente fechados, ao abrigo do calor e da luz (15°C a 25°C).

NOTA. A formacao de ligeiro sedimento durante a armazenagem e aceitavel, desde que, a composicao do extrato vegetal, nao sofra modificacoes significativas. F.B. quinta edicao, parte I, pagina 205.

CONCLUSAO. Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas. (PRODUTO APROVADO).

COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL

CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA



ELY MARTINS  
Sua farmácia mais completa

 Thais Cardoso Pimenta Farmacêutica Responsável L.C.Q CRF: SP 65.673	 Marco Aurélio M. de Sousa Químico Responsável CRQ: 04235302	Pagina 2 de 2  Ely A.R. Martins Farmacêutica Responsável Técnica CRF: SP 974
--	--	---

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP: 14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 15. TINTURA DE THUIA

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Código do Produto: TTHU 61925  
 Nota Fiscal:

Nome Comercial do Produto: TINTURA THUIA  
 Nome Científico: TINTURA THUYA OCCIDENTALIS L  
 Procedência: BRASIL  
 Data de Fabricação: 07/2014  
 Data de Validade: 07/2019  
 Número de Lote do Fabricante: 7102 - ( 2 )

**EML**  
**ELY MARTINS**<sup>®</sup>  
 Sua farmácia mais completa  
 Autorização de Funcionamento  
 M.S. 1.04.882-1

Emissao: 06/08/2014

**22**  
*anos*

ANALISE 160714/01  
 Extrato vegetal (Tintura)  
 Materia-prima usada como intermediaria.  
 Nao destinada ao isolamento de substancias puras.  
**MATERIA-PRIMA**  
**DESCRICAO**  
 Nomes populares : Tuia; Cipreste; Pinheiro-do-canada.  
 Nomenclatura botanica : Thuya occidentalis (Linnaeus)  
 Familia botanica : Cupressaceae  
 Parte utilizada : folha e ramos jovens secos  
 Lote : 10/4  
 Analise : 031213/02

**EXTRATO**  
**DESCRICAO**  
 Forma farmaceutica : Tintura  
 Relacao Droga: Extrato : 1:5p/V (20,00%p/V)  
 Solucao extrativa : Etanol 70%GL  
 Operacao extrativa : Percolacao simples  
 Cada 10,00mL de Tintura de Tuia, devem corresponder aos componentes  
 soluveis de 2,00g da materia-prima seca.

ANALISE QUALITATIVA	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
<b>CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS</b>		
Liquido limpido pardo-esverdeado-claro, com odor caracteristico e de sabor resinoso, picante, balsamico e canforaceo.		
Aspecto	Liquido-limpido	Liquido-limpido
Cor	Castanho-esverdeada	Castanho-esverd.
Odor	Caracteristico	Caracteristico
Sabor	Resinoso	Resinoso
	Balsamico	Balsamico
<b>CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS</b>		
pH	5,00 a 6,50	5,44
Densidade	0,870 a 0,980g/mL	0,891g/mL
<b>PROSPECCAO FITOQUIMICA</b>		
Resinas	Presenca	Presenca
Oleo essencial	Presenca	Presenca
Taninos	Presenca	Presenca
Glicosideos	Presenca	Presenca
C.C.D	Rfs 0,45/0,60/0,70/0,80 e 0,95	Correspondem
<b>TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE</b>		
Titulo etanolico	60%GL a 70%GL	Corresponde
Residuo seco	1,00% a 6,00% p/V	5,85%p/V
<b>PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS</b>		
Contagem total de:		
Bacterias aerobicas	VMP 10.000UFC/mL	Ausencia

Pagina 1 de 2

Thais Cardoso Pimenta  
 Farmacêutica Responsável L.C.Q.  
 CRF: SP 65.673

Marco Aurélio M. de Sousa  
 Químico Responsável  
 CRQ: 04235302

Ely A.R. Martins  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF: SP 974

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br

## ANEXO 15. TINTURA DE THUIA (CONCLUSÃO)

<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		61925
<b>Código do Produto:</b> TTHU	<b>Nota Fiscal:</b>	
<b>Nome Comercial do Produto:</b> TINTURA THUIA		
<b>Nome Científico:</b> TINCTURA THUYA OCCIDENTALIS L		
<b>Procedência:</b> BRASIL		
<b>Data de Fabricação:</b> 07/2014		
<b>Data de Validade:</b> 07/2019		
<b>Número de Lote do Fabricante:</b> 7102	- ( 2 )	



**ELY MARTINS®**  
Sua farmácia mais completa

Autorização de Funcionamento  
M.S.1.04.882-1

Emissão: 06/08/2014

Fungos	VMP 1.000UEC/AL	Ausencia
Leveduras	VMP 1.000UEC/AL	Ausencia

*22 anos*

**REFERENCIAS**

Farmacopeia Brasileira quinta edicao. Parte I (5.2.5 ; (5.2.12 ; (5.2.17.1); (5.2.19); (5.4.1.1); (5.4.3.2.2); (5.5.3.1.2); (5.5.3.1.5).

Farmacopeia Homeopatica Brasileira, terceira edicao, pagina 329.

Farmacognosia. Da Planta ao Medicamento. Simoes, C.M.O et al.

Farmacopeia Francesa.

EMPREGO OFICINAL. Em preparacoes farmaceuticas.

CATEGORIA. Materia-prima usada como intermediaria.

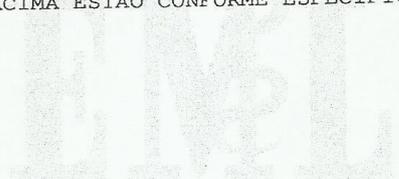
EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO. Em frascos de vidro neutro, ambar, hermeticamente fechados, ao abrigo do calor e da luz. (15°C a 25°C)

NOTA. A formacao de ligeiro sedimento durante a armazenagem e aceitavel, desde que, a composicao do extrato vegetal, nao sofra modificacoes significativas. F.B.V. Parte I pagina 205.

CONCLUSAO. Os resultados analiticos correspondem com as referencias citadas. (PRODUTO APROVADO).

COPIA FIEL DO CERTIFICADO ORIGINAL

CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTAO CONFORME ESPECIFICACAO DE COMPRA



**ELY MARTINS®**  
Sua farmácia mais completa

 Thais Cardoso Pimenta Farmacêutica Responsável L.C.Q. CRF: SP 65.673	 Marco Aurélio M. de Sousa Química Responsável CRQ: 04235302	Pagina 2 de 2  Ely A.R. Martins Farmacêutica Responsável Técnica CRF: SP 974
---	--	---

www.elymartins.com.br  
 Rua Vereador Miguel Cury, nº 22 - Galpão 2 - Parque Industrial - CEP:14.140-000 - Cravinhos - SP  
 controle@elymartins.com.br