



Avaliação microbiológica de fitoterápicos com *Ginkgo biloba* procedentes de farmácias do município de Votuporanga – SP

Microbiological evaluation of herbal drugs with *Ginkgo biloba* available on pharmacies in the city of Votuporanga - SP

Recebido em 13/06/2011

Aceito em 20/08/2011

Anahí Cristina Tamada, Poliani Aparecida Miguel, Christiane Oliveira Jordão*

Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Rua Pernambuco, 4196, Centro, CEP 15500-006, Votuporanga, SP, Brasil

RESUMO

O presente trabalho descreve a análise microbiológica de amostras do fitoterápico *Ginkgo biloba* obtidas de seis farmácias do município de Votuporanga/SP. O objetivo principal foi verificar a carga microbiológica do fitoterápico, pela técnica de Contagem de Unidades Formadoras de Colônia em placa de Petri, segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV, indicada para determinação do número total de bactérias e fungos presentes em produtos manufaturados e matérias-primas não estéreis. A carga bacteriana encontrada variou de 1×10^1 UFC/g a $2,30 \times 10^3$ UFC/g e para fungos foi $< 10^1$ UFC/g a $4,50 \times 10^1$ UFC/g. Concluiu-se, assim, que das amostras analisadas apenas uma teve contagem da carga bacteriana fora dos limites estabelecidos para estes produtos que é de 103 UFC/g ou ml.

Palavras-chave: Análise microbiológica, controle de qualidade, boas práticas de manipulação

ABSTRACT

This paper describes the microbiological analysis of the herbal medicine *Ginkgo biloba* in samples obtained from six pharmacies in the city of Votuporanga, São Paulo State. The main objective was to assess the microbiological analysis of the herbal medicine, using the technique of counting of Colony Forming Units (CFU) in Petri dishes, described in Brazilian Pharmacopoeia IV, that is capable of determining the total number of bacteria and fungi present in manufactured non sterile products and raw materials. The results obtained for bacterial contamination is 1×10^1 CFU/g to 2.30×10^3 CFU/g for fungi and $< 10^1$ CFU/g to 4.50×10^1 CFU/g. It is possible to conclude that one sample are not in agreement with the parameters established for bacterial limits of 103 UFC/g ou ml.

Keywords: Microbiological analysis, quality control, good manipulation practices

INTRODUÇÃO

O termo medicamento, ao longo dos anos, obteve várias definições, mas com o avanço das tecnologias e o aprofundamento de estudos na área farmacêutica, a definição que melhor abrange o conceito é a dada na RDC no. 67 de 08 de outubro de 2007, que dispõe sobre as Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para uso humano em farmácias, que define medicamento como um produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, que contém um ou mais fármacos juntamente com seus excipientes, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (BRASIL, 2007).

Desde o princípio, a humanidade utiliza-se de plantas para amenizar sinais e sintomas das enfermidades que a

acometa. No decorrer dos anos, com estudos científicos mais criteriosos, surgiram os medicamentos fitoterápicos que são obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais (extrato, tintura, óleo, cera, exsudatos, suco, e outros), caracterizados pelo conhecimento da espécie vegetal, de sua eficácia e dos riscos de seu uso, assim como, pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos de fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações dessas com extratos vegetais. Considera-se droga vegetal, uma planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta,

* **Contato:** Christiane Oliveira Jordão, Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Rua Pernambuco, 4196, Centro, CEP 15500-006, Votuporanga, SP, Brasil, e-mail: christiane.jordo@gmail.com

estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, de acordo com a RDC 14 de 31 de março de 2010 que dispõe sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos (BRASIL, 2010).

O conjunto de critérios que caracterizam uma matéria-prima é determinante para a qualidade do medicamento fitoterápico, que é comprovada por ensaios que demonstrem a ausência de efeitos tóxicos e contaminantes nocivos à saúde, determinando a sua segurança. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade. Embora a população de maneira geral, acredite que os medicamentos fitoterápicos não possuam efeitos colaterais, por serem extraídos de fonte natural, estudos apontam que alguns fitoterápicos contêm propriedades tóxicas, podendo interagir com outros medicamentos sendo mais recorrentes em dosagens excessivas, além de produzirem reações alérgicas (Nicoletti et al., 2007).

Atualmente, os fitoterápicos vêm se destacando no mercado mundial, movimentando bilhões de dólares todos os anos com excelentes perspectivas de crescimento. No Brasil, este segmento movimenta cerca de US\$ 550 milhões ao ano, com previsão de dobrar esse valor em 2010. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 80% da população mundial faz uso da fitoterapia e por volta de 82% dos brasileiros utilizam produtos ou medicamentos à base de plantas medicinais. O mercado brasileiro sofre um crescimento anual de cerca de 10%, movimentando principalmente a indústria de importação, já que grande parte da matéria-prima utilizada nos fitoterápicos brasileiros provém do continente Europeu e Asiático. (ABIFISA, 2010).

A prática da fitoterapia como tratamento de patologias é milenar e sua eficácia conhecida por todos. Contudo, a utilização de terapias complementares como a homeopatia, fitoterapia e acupuntura, até poucos anos não estavam à disposição da população brasileira no SUS (Sistema Único de Saúde). De acordo com a Portaria nº 2982/GM/MS, publicada em 2009, incluiu-se para a Assistência Farmacêutica da Atenção Básica, alguns fitoterápicos, que deverão estar nestes estabelecimentos para o atendimento dos pacientes, sendo que a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), é o órgão responsável pela monitoração e fiscalização dos padrões de qualidade dos serviços prestados, bem como dos medicamentos utilizados. O interessante dos medicamentos fitoterápicos no SUS está na prevenção de doenças, além do tratamento de patologias já estabelecidas, o que significa um louvável investimento na saúde da população brasileira. (BRASIL, 2009).

As plantas medicinais são cultivadas de acordo com a lei de oferta e procura. A grande dificuldade é a falta de qualificação dos produtores e fornecedores primários, pois dependem de fatores climáticos, econômicos e técnico-científicos para estabelecer diretrizes de desenvolvimento, voltadas à garantia de acesso seguro e uso racional de plantas medicinal e fitoterápico (Vigo, 2008).

As drogas vegetais podem conter um grande número de fungos e bactérias, geralmente, provenientes do solo, pertencentes à microflora natural de certas plantas ou

mesmo introduzidas durante a sua manipulação. Dependendo das condições de manejo, secagem e armazenamento, microrganismos viáveis podem desenvolver-se, intensificando a contaminação (WHO, 1992 apud SIMÕES, et.al., 2007). A carga microbiana normal é 105 UFC/g ou mL e 103 UFC/g ou mL, para bactérias e fungos, respectivamente, podendo variar de acordo com a natureza do produto vegetal e pelo seu modo de uso. (BRASIL, 2010).

A contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto alterando suas características físico-químicas e, consequentemente, seu efeito terapêutico, tornando-o sem efeito ou muitas vezes, tóxico à saúde. (SIMÕES, et.al, 2007).

Os métodos utilizados para a conservação de produtos que se degradam devido à proliferação de microrganismos são baseados na utilização de processos que inibem seu crescimento e proliferação como a pasteurização, a irradiação gama, a adição de agentes conservantes químicos e outros que criam condições desfavoráveis para o crescimento dos microrganismos. Quando as condições são favoráveis para o crescimento de microrganismos, inicia-se a multiplicação e crescimento, passando por uma série de fases consecutivas, onde estes microrganismos se multiplicam, podendo produzir metabólitos tóxicos, se tornando inadequados, portanto, para o consumo humano (Gava, 1999).

O controle de qualidade visa analisar qualitativamente e quantitativamente, com métodos já estabelecidos, se um produto obedece aos padrões vigentes, embora a aplicação e validação de métodos analíticos físico-químicos para medicamentos fitoterápicos e matérias-primas vegetais sejam escassas na literatura. (ABIFISA, 2010).

Para a realização de análises de qualidade se faz necessário uma técnica de amostragem adequada de maneira que uma amostra retirada de um lote represente o todo, para a confiabilidade do resultado. A Farmacopéia Brasileira não estabelece limites específicos de contaminação microbiana para drogas vegetais, podendo ser aplicáveis os limites estabelecidos para contagem de microrganismos que não necessitem cumprir o teste de esterilidade.

A espécie *Ginkgo biloba* L. pertencente à família Ginkgoaceae. A parte da planta que concentra as substâncias ativas são as folhas, cujos principais constituintes estão enquadrados em cinco grupos majoritários: terpenos, tais como, os diterpenos (gincólídeos), sesquiterpenos (bilobalídeo, triterpenos; flavonóides (flavonas, flavonóis e bisflavonóides); hidrocarbonetos de cadeia longa; derivados do ácido anacárdio (ácidos ginkgólicos) e substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular (Feistel, 1994 apud Simões et.al., 2007; Schulz et al., 2002).

O "EXTRATO DE GINKGO" pode ser encontrado no mercado na forma seca obtido partir de extratos hidroalcolólicos simples que utilizam metanol ou etanol e extratos especiais, obtidos por uma seqüência específica de passos tecnológicos de enriquecimento e purificação (Sticher, 1993 apud Simões et.al., 2007; Schulz et al., 2002). Em estudos analíticos destes extratos observou-se uma maior concentração de substâncias alergênicas e menor concentração de substâncias ativas nos extratos

hidroalcoólicos simples (Hansell, 1990 apud Simões et al., 2007; Schulz et al., 2002).

Preparações contendo Ginkgo aumentam o fluxo sanguíneo, com conseqüente melhora de oferta de oxigênio para as células, protegendo os tecidos dos danos da falta do oxigênio (hipóxia), além de inibir a agregação plaquetária. É indicado em casos onde há um déficit de fluxo sanguíneo cerebral que podem originar problemas de memória, da função cognitiva, tonturas, dor de cabeça, vertigens, zumbidos e estágios iniciais de demência (Alzheimer e demências mistas), além de distúrbios circulatórios e problemas de retina (Schulz et al., 2002)

Este trabalho teve por objetivo realizar análise microbiológica de fitoterápicos contendo extratos padronizados de Ginkgo biloba, que são manipulados e comercializados em Farmácias do município de Votuporanga da região Noroeste do Estado de São Paulo, pelo método de quantificação de bactérias e fungos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram adquiridos frascos do medicamento Ginkgo biloba (extrato padronizado) contendo 150 cápsulas de 80 mg de seis farmácia selecionadas aleatoriamente. Tais estabelecimentos foram codificados como: Farmácia A, Farmácia B, Farmácia C, Farmácia D, Farmácia E e Farmácia F.

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Votuporanga/ SP. O método escolhido para a quantificação de bactérias ou fungos nas amostras de Ginkgo biloba foi o de contagem em placas de Petri pela técnica de "pour plate", segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4ª Edição (F. Bras. IV, 1988). Com este método é possível determinar o número total de bactérias e fungos presentes em produtos manufaturados e matérias-primas não estéreis. Este consiste na contagem da população de microrganismo que apresentem crescimento visível em 4 dias em ágar caseína de soja (Meio I/ bactérias), em temperatura de 30 - 35°C e em ágar Sabouraud dextrose (Meio II/ fungos), em temperatura de 20 - 25°C.

Para o preparo das diferentes amostras utilizaram-se 10 g do conteúdo das cápsulas que foi diluído em solução tampão de fosfato pH 7,2, de modo que o volume final fosse de 100 mL, constituindo-se uma diluição de 10-1. Logo após, realizaram-se as demais diluições (10-2 e 10-3) de forma que não se ultrapassasse o limite de 300 UFC para bactérias e 100 UFC para fungos. Na inoculação das referidas diluições das amostras utilizaram-se placas com diferentes meios de cultura. Para o crescimento de bactérias empregaram-se placas de Petri 100 x 20 mm, adicionando-se a cada uma, 1 ml das amostras a 15-20 ml de Meio I- ágar caseína de soja (Mbiolog Diagnósticos® Ltda) liquefeito a 45°C, utilizando-se a técnica de "pour-plate". As inoculações foram realizadas em duplicata para cada diluição, totalizando-se seis placas para cada farmácia analisada. Estas foram incubadas a 30 - 35 °C, durante quatro dias. Contou-se o número de colônias e calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC), selecionando-se placas com o maior número de colônias, sem que ultrapassassem 300 colônias por placa. Para o crescimento de fungos usou-se o Meio II - ágar

Sabouraud-dextrose (Mbiolog Diagnósticos® Ltda), inoculando-se as amostras pelo mesmo método descrito para bactérias. As placas foram incubadas a 20-25°C, por sete dias. A contagem foi realizada da mesma maneira, porém, o número de colônias não deveria ultrapassar 100 colônias por placa. Todos os procedimentos realizados durante as análises, desde a retirada do pó das cápsulas à inoculação das placas, foram realizados em uma câmara de fluxo laminar (Trox Technik®).

Os resultados foram comparados com os parâmetros estabelecidos na USP30 (NF25, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras das seis farmácias estão dispostos nas Tabelas 1 e 2, representados como a média do número de unidades formadoras de colônias.

Tabela 1. Número médio de bactérias presentes em cada grama ou mililitro das diferentes amostras analisadas, expressos em unidades formadoras de colônia (UFC)

Farmácias	Número Médio de Bactérias (n=2)*
A	1,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
B	5,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
C	4,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
D	2,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
E	2,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
F	2,30 x 10 ³ UFC/g ou ml

* número de vezes que a amostra foi analisada.

Tabela 2. Número médio de fungos presentes em cada grama ou mililitro das diferentes amostras analisadas, expressos em unidades formadoras de colônia (UFC)

Farmácias	Número Médio de Fungos (n=2)*
A	<1,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
B	1,5 x 10 ¹ UFC/g ou ml
C	2,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
D	1,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
E	2,0 x 10 ¹ UFC/g ou ml
F	4,5 x 10 ¹ UFC/g ou ml

* número de vezes que a amostra foi analisada.

Como não há indicação na Farmacopéia Brasileira IV (1988) dos limites permitidos para o número total de bactérias e fungos em produtos manufaturados e matérias-primas não estéreis, considerou-se como referência os critérios estabelecidos na Farmacopéia dos Estados Unidos da América (USP 30, NF25, 2007), pois estabelecem limites mais rigorosos quanto à carga microbiana presente em preparações farmacêuticas de droga vegetal de uso interno como: máximo de 103 UFC/g ou ml para bactérias aeróbias; máximo de 102 UFC/g ou ml para leveduras e bolores. Tomando esses padrões como referência para as análises realizadas no presente trabalho, das seis farmácias que tiveram suas amostras analisadas para quantificação de bactérias, cinco apresentaram-se em conformidade com os limites acima estabelecidos, representando 83,73% das amostras e apenas uma (Farmácia F) apresentou-se em desconformidade, representando 16,67% das amostras. As amostras desse estabelecimento apresentaram contagens bacterianas superiores a 103 UFC/g ou mL, já que o resultado obtido foi de 2,30 x 103 UFC/g.

Já nas contagens para fungos realizadas no presente trabalho obtiveram-se os seguintes resultados: < 101 UFC/g a 4,50x10¹ UFC/g ou mL, assim todas as seis farmácias (100%) tiveram suas amostras em conformidade com os limites estabelecidos pela USP 30, de 102 UFC/g. Com relação à análise bacteriana, estudos semelhantes aos realizados por Santos e cols. (1995) e Bugno e cols. (2005), também considerando os limites máximos de 103 UFC/g, detectaram inconformidades na contagem de bactérias em 33,30% e 58,50% das amostras, respectivamente. No presente estudo somente 16,67% das amostras analisadas apresentaram contagem bacteriana superiores aos limites preconizados na farmacopéia consultada.

Na análise de Fungos, Rocha e cols. (2004) registraram a contaminação por fungos acima dos limites de 102 UFC/g em 45% das amostras; já Bugno e cols. (2005), em pesquisa semelhante, verificaram que 63,10% das amostras de drogas vegetais estavam contaminadas por fungos.

CONCLUSÃO

Conclui-se com os resultados das análises microbiológicas realizadas nos fitoterápicos contendo Ginkgo biloba, produzidos e comercializados nas Farmácias Magistrais do município de Votuporanga/ SP, apresentaram-se, parcialmente, dentro dos limites estabelecidos na USP 30, pois na contagem bacteriana, somente uma amostra, apresentou-se em desacordo. Já na contagem para fungos as seis Farmácias apresentaram-se em conformidade com os limites preconizados nas literaturas utilizadas como referência. No entanto, há a necessidade de intensificar a vigilância quanto as Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais, instituída pela RDC 67/2007 (BRASIL, 2007), já que uma das farmácias estava em desacordo com os parâmetros preconizados. Levando-se em consideração que os Distribuidores de Insumos e Drogas Vegetais possuem obrigatoriedade na emissão de laudo da análise microbiológica, que acompanha o produto, presumivelmente, pode-se concluir que a contaminação se deu por práticas inadequadas no momento da manipulação da droga vegetal para a produção do fitoterápico com Ginkgo Biloba na farmácia de manipulação, comprometendo a qualidade do mesmo, a viabilidade do consumo do produto e a sua ação farmacológica, não garantindo a efetividade da qualidade do tratamento terapêutico.

REFERÊNCIAS

ABIFISA (Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar de Promoção da Saúde). Disponível em: < <http://www.abifisa.org.br/>>. Acesso em junho de 2010.

Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo, Atheneu. 1988.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 67, de 8 de outubro de 2007.

Brasil. Gabinete do Ministro. Ministério da Saúde. 2.982/GM/MS(1), de 26 de novembro de 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 14, de 31 de março de 2010.

Bugno A, Buzzo AA, Nakamura CT. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. Rev. Bras. Ciênc. Farm. 41(4), 491-497, 2005.

Feistel B. Untersuchungen zur analytischen Standardisierung von Ginkgo biloba Extrakten und deren galenischer Zubereitungen. In: Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC., 2007, p 202 e 213-214.

Fischer DCH, Ohara MT, Saito T. Padrão microbiano em medicamentos não estéreis de uso oral: enquadramento de produtos fitoterápicos. Rev. Bras. Farmacogn. 5(1), 29-55, 1996.

Gava AJ. Princípios da tecnologia de alimentos. São Paulo, Nobel, 1999, 283p.

Hansel R. Analytische differenzierung verschiedener Ginkgo extrakte. Bedeutung des Herstellungsverfahrens für die extraktzusammensetzung. In: Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC., 2007, p 202 e 213-214.

Nicoletti MA, Oliveira-Júnior MA, Bertasso CC, Caporossi PY, Tavares APL. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. Infarma, 19 (1/2), 32-40, 2007.

Rocha LO, Soares MMSR, Corrêa CL. Análise da contaminação fúngica em amostras de Cassia acutifolia Delile (Sene) e Peumus boldus (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo. 40(4), 521-527, 2004.

Santos PRV, Oliveira ACX, Tomassini TCB. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo. 31, 35-38, 1995.

Schulz V., Hänsel R, Tyler VE. Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 1ª edição, São Paulo: Manole, 2002. 386p.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre, UFRGS/UFSC, 2007, 821p.

Sticher, O. Quality of Ginkgo preparations In: Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p 202 e 213-214.

United States Pharmacopoeia. (USP) 30, NF 25 ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2007. 83, 93, 586 e 935 p.

Vigo CLS. Cadeia Produtiva de Fitoterápicos: do Produto in Natura ao Fitomedicamento. Revista FÁrmacos e Medicamentos. 53, 50-55, 2008.

WHO. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO/PHARM/92.559.1992 In: Simões, CMO.(Org.).Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre, editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap. p 202 e 213-214.