UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle de Farmacêuticos

Estudo da aplicabilidade do processo de descontaminação de drogas vegetais empregando óxido de etileno

Lucilia Cristina Satomi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2003

Lucilia Cristina Satomi

Estudo da aplicabilidade do processo de descontaminação de drogas vegetais empregando óxido de etileno

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
orientador/ presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo,

Aos meus pais, Ana e Yoshio

A quem devo a existência, a formação e orientação de vida

À Prof. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Pela amizade, dedicação, ensinamentos, confiança
e exemplo de trabalho a ser seguido

AGRADECIMENTOS

Ao Nilson Reinaldo Shiozawa Satomi pelo apoio, compreensão e ajuda.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

Ao Rodrigo Hayakawa pelo apoio, carinho, paciência e compreensão.

À grande amiga Renata Rabelo Soriani pela amizade, incentivo e apoio constante em todos os momentos.

À amiga Prof. Dra. Nádia Bou Chacra pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos amigos do CONFAR pela amizade, ensinamentos e apoio.

À amiga Marly Neves Assunção pelo apoio e amizade.

Aos amigos e professores da disciplina de Controle de Qualidade Biológico pelos ensinamentos valiosos.

À FAPESP pelo suporte material, que permitiu a realização deste trabalho.

A todos que de diferentes maneiras apoiaram e colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

I. Introdução 01

II. Revisão de Literatura 03

1. Histórico do emprego de fitoterápicos 03
2. Histórico e características gerais 07
   - 2.1 Alcachofra 07
   - 2.2 Camomila 08
   - 2.3 Ginkgo biloba 09
   - 2.4 Guaraná 11
3. Padrões microbianos em fitoterápicos 12
4. Emprego do óxido de etileno na descontaminação de drogas vegetais 16
5. Óxido de etileno, aspectos gerais 18
6. Ação antimicrobiana do óxido de etileno 19
7. Produtos de degradação 21
8. Aspectos toxicológicos 23

III. Objetivos 28

IV. Material e Método 30

1. Material 31
2. Inspeção visual das drogas vegetais antes do processo de fracionamento das amostras para os fornecedores A, B e C 31
3. Material de embalagem 31
4. Avaliação da Qualidade sanitária das amostras 31
   - 4.1 Preparo da amostra 32
   - 4.2 Validação da técnica 32
   - 4.3 Método de contagem microbiana em meio sólido (semeadura da amostra em profundidade) 33
   - 4.4 Pesquisa de Patogênicos Específicos 34
     - 4.4.1 Enriquecimento em meios de cultura não seletivos 34
     - 4.4.2 Enriquecimento em meio seletivo para pesquisa de *Salmonella* sp. 34
     - 4.4.3 Isolamento em meio de diferenciação 35
     - 4.4.4 Identificação Presuntiva 36

5. Determinação da umidade relativa 37
5.1 Preparo da amostra 37
5.2 Pré umidificação antes do processo de descontaminação (Condicionamento ambiental) 37
5.3 Perda por dessecação: Método Gravimétrico 38
6. Descontaminação por óxido de etileno 38
6.1. Preparo de material e definição de parâmetros 38
6.2. Processo de descontaminação 38
6.3. Processo de aeração 39
7. Análise de resíduos de óxido de etileno e seus derivados 39
7.1. Preparo das soluções padrão 39
7.1.1. Óxido de etileno 39
7.1.2. Etilenoglicol 40
7.1.3. Etilenocloridrina 40
7.2. Validação do método de extração de residuais de óxido de etileno e seus derivados 40
7.3. Método de detecção de resíduos de óxido de etileno 41
8. Análise de eficácia antimicrobiana do processo 42
9. Análise dos princípios ativos naturais 42
9.1 Camomila 42
9.2 Ginkgo biloba 44
9.3 Guaraná 46
9.4 Validação de metodologia de análise de determinação das alterações dos princípios ativos naturais por HPLC. 47
9.4.1. Determinação da linearidade 47
9.4.2. Determinação da exatidão e Precisão 48
V. Resultados 49
VI. Discussão 104
VII. Conclusão 122
VIII. Referência Bibliográfica 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características constantes nos certificados de análise de Alcachofra (*Cynara scolimus* L.) enviados pelos Fornecedores A, B e C. 51

Tabela 2. Características constantes nos laudos de análise de Camomila (*Matricaria recutita* L.) enviados pelos Fornecedores A, B e C. 52

Tabela 3. Características constantes nos laudos de análise de Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) enviados pelos Fornecedores A, B e C. 53

Tabela 4. Características constantes nos laudos de análise de Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.) enviados pelos Fornecedores A, B e C. 54

Tabela 5. Descrição do material de embalagem das amostras conforme recebidas dos fornecedores A, B, C 55

Tabela 6. Descrição macroscópica das amostras de alcachofra (*Cynara scolimus* L.) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C. 56

Tabela 7. Descrição macroscópica das amostras de camomila (*Matricaria recutita* L.) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C. 57

Tabela 8. Descrição macroscópica das amostras de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C. 58

Tabela 9. Descrição macroscópica das amostras de guaraná (*Paullinia cupana H.B.K.*) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C. 59

Tabela 10. Descrição de material estranho encontrados nas amostras de drogas vegetais recebidas dos fornecedores A, B, C 60

Tabela 11. Dados obtidos na validação da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente à Alcachofra (*Cynara scolimus* L.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $5,1 \times 10^6$ UFC/g. 61

Tabela 12. Dados obtidos na validação da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente à Camomila (*Matricaria recutita* L.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $7,2 \times 10^4$ UFC/g. 61

Tabela 13. Dados obtidos na validação técnica da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente ao Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $5,4x10^3$ UFC/g. 62

Tabela 14. Dados obtidos na validação técnica da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente ao Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $4,5x10^4$ UFC/g. 62

Tabela 15. Dados obtidos na validação técnica da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno de $6,1 \times 10^2$ UFC/g de Aspergillus *flavus*, nas drogas vegetais provenientes do fornecedor B. 63

Tabela 16. Resultados obtidos na determinação de contaminação bacteriana, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), não submetidos a processos de descontaminação. 64

Tabela 17. Resultados obtidos na determinação de contaminação fúngica, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), não submetidos a processos de descontaminação. 64

Tabela 18. Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de alcachofra (*Cynara scolimus* L.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C). 65

Tabela 19. Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de camomila (Matricaria recutita L.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C). 66

Tabela 20. Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de ginkgo biloba (Ginkgo biloba L.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C). 67

Tabela 21. Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de guaraná (Paullinia cupana H.B.K.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C). 68

Tabela 22. Resultados obtidos na determinação de contaminação bacteriana, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno. 69

Tempo de exposição de 30 minutos.

Tabela 23. Resultados obtidos na determinação de contaminação fúngica, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação po óxido de etileno. Tempo de exposição de 30 minutos. 69

Tabela 24. Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação bacteriana, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 30 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo. 70

Tabela 25. Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação fúngica, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 30 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo. 71

Tabela 26. Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B e C) submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno com tempo de exposição de 30 minutos. 72

Tabela 27. Resultados obtidos na determinação de contaminação bacteriana, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno. Tempo de exposição de 60 minutos. 73

Tabela 28. Resultados obtidos na determinação de contaminação fúngica, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação po óxido de etileno. Tempo de exposição de 60 minutos. 73

Tabela 29. Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação bacteriana, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de 74

descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 60 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo.

Tabela 30. Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação fúngica, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 60 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo. 75

Tabela 31. Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B e C) submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno com tempo de exposição de 60 minutos. 76

Tabela 32. Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais antes do processo de Pré – umidificação segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição. 77

Tabela 33. Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais após o processo de Pré – umidificação (30°C / 50-70% UR / 48 horas) segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição. 77

Tabela 34. Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais após processo de descontaminação de por óxido de etileno, ciclo de 30 minutos de exposição, segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição. 78

Tabela 35. Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais após processo de descontaminação de por óxido de etileno, ciclo de 60 minutos de exposição, segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição. 78

Tabela 36. Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Alcachofra (*Cynara scolimus* L.) 79

Tabela 37. Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Camomila (*Matricaria recutita* L.) 80

Tabela 38. Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) 81

Tabela 39. Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.) 82

Tabela 40. Porcentagem de recuperação (Exatidão) referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Drogas vegetais 83

Tabela 41. Relação entre concentrações crescentes de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocliridrina e resultados equivalentes a estas em área (mV;min), bem como seus desvios padrões e desvios padrões relativos. 84

Tabela 42. Concentração (ppm) de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor A, submetidas a 30 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente 85

Tabela 43. Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor B, submetidas à 30 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente 86

Tabela 44. Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor C, submetidas à 30 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente 87

Tabela 45. Concentração (ppm) de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor A, submetidas a 60 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente 88

Tabela 46. Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor B, submetidas à 60 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente 89

Tabela 47. Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor C, submetidas à 60 minutos de exposição ao agente 90

descontaminante, após aeração a temperatura ambiente

Tabela 48. Resultados obtidos na determinação da exatidão e prescisão dos métodos de análise de extratos provenientes de drogas vegetais do fornecedor C por CLAE. 91

Tabela 49. Concentração dos marcadores de drogas vegetais em amostras provenientes de três fornecedores (A, B e C), não submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno. 92

Tabela 50. Concentração dos marcadores de drogas vegetais em amostras provenientes do fornecedor C, antes e após ciclo de exposição de 30 e 60 minutos ao óxido de etileno. 93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Observação macroscópica de 100 g de cada amostra de alcachofra (*Cynara scolimus* L.) proveniente dos fornecedores A, B e C. 94

Figura 2. Observação macroscópica de 50 g de cada amostra de camomila (*Matricaria recutita* L.) proveniente dos fornecedores A, B e C. 95

Figura 3. Observação macroscópica de 100 g de cada amostra de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) proveniente dos fornecedores A, B e C. 96

Figura 4. Observação macroscópica de 100 g de cada amostra de guraná (*Paullinia cupana* H.B.K.) proveniente dos fornecedores A, B e C. 97

Figura 5. Curva de calibração de determinação residual de Óxido de etileno por cromatografia gasosa 98

Figura 6. Curva de calibração de determinação residual de Etilenoglicol por cromatografia gasosa 98

Figura 7. Curva de calibração de determinação residual de Etilenocloridrina por cromatografia gasosa 99

Figura 8. Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Alcachofra (*Cynara scolimus* L.). 99

Figura 9. Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Camomila (*Matricaria recutita* L.). 100

Figura 10. Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.). 101

Figura 11. Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.). 101

Figura 12. Curva de calibração de Apigenina – 7 – glucoside determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 102

Figura 13. Curva de calibração de Flavonóides Glicosídeos determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 102

Figura 14. Curva de calibração de Cafeína determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 103

Resumo

O consumo de plantas medicinais no país tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas. Dados da Organização mundial de Saúde estimam que 80% da população mundial usam plantas medicinais como alternativa terapêutica. No entanto, pouca informação se encontra disponível sobre os constituintes dos mesmos, bem como sobre o potencial de riscos à saúde humana. Assim, questões relacionadas à qualidade dessas drogas apresentam fundamental importância. Em função de sua origem, a carga microbiana detectada em drogas vegetais pode ser considerada normalmente elevada, oferecendo riscos potenciais ao usuário. Desta forma, a avaliação de sua qualidade sanitária bem como a utilização de processos descontaminantes constituem-se em etapas importantes no que se refere ao aspecto de segurança ao consumidor.

Portanto o objetivo deste trabalho foi a determinação dos níveis de contaminação, a pesquisa de indicadores patogênicos; além da eficácia da exposição de 30 e 60 minutos ao gás óxido de etileno, a determinação de residuais tóxicos e a verificação de possíveis alterações nos níveis de marcadores em amostras de *Matricaria recutita* L., *Cynara scolimus* L., *Paulinia cupana* H.B.K. e *Ginkgo biloba* L. proveniente de três fornecedores diferentes.

Todas as drogas vegetais analisadas continham elevados níveis de bactérias e fungos, na ordem de 10^5 ufc/g, além de terem sido detectados microrganismos patogênicos nas amostras estudadas. Entretanto após a exposição destas por 30 e 60 minutos ao gás óxido de etileno, observou-se a eliminação de cerca de 90% e 99,8% respectivamente. No que se refere aos patógenos específicos a exposição de 30 minutos foi capaz de eliminá-los completamente.

Os níveis residuais de óxido de etileno nas drogas vegetais analisadas, foram reduzidos a índices aceitáveis após 14 dias de aeração ambiental, já os níveis de etilenoglicol e etilenocloridrina mantiveram-se dentro do limite da sensibilidade do método adotado.

Com relação à análise de principios ativos naturais, não houve alteração nas concentrações dos marcadores das drogas vegetais camomila, ginkgo biloba e guaraná analisadas mesmo após ciclo de exposição de 60 minutos ao gás óxido de etileno.

Sendo assim verifica-se a necessidade da adoção de métodos de descontaminação microbiana com o intuito de fornecer um produto mais seguro para o consumo humano visto que estes são por vezes consumidos por enfermos, idosos e crianças com a saúde comprometida. Pode-se concluir também que o processo de descontaminação de drogas vegetais por óxido de etileno é um processo eficaz e seguro, desde que sejam adotados os requisitos de segurança necessários que infelizmente, nem sempre são adotadas no mercado nacional

Abstract

The consumption of medicinal plants has significantly increased in Brazil in the last decades. Data from the World Health Organization estimate that 80% of the world population use medicinal plants as a therapeutic alternative. However, little information is available about their components and their potential risks to human health. Thus every subject related to the quality of those drugs is of fundamental importance. Due to their natural origin, the bioburden detected in vegetal drugs often be considered high, what is a potencial risk to their consumers. These can have their safety assure; however, through the evaluation of the drugs microbial quality and the use of decontamination processes.

Therefore the aim of this work was the determination of the microbial contamination levels and the research of pathogenics microorganisms; besides the efficacy of a 30 to 60 minutes exposure to ethylene oxide of bacteria, moulds and yeasts and also the determination of toxic residues and the verification of possible alterations in the levels of marker compounds in samples of *Matricaria recutita* L., *Cynara scolimus* L., *Paulinia cupana* H.B.K. and *Ginkgo biloba* L., deriving from three different suppliers.

All the analyzed medicinal plants presented high levels of bacteria, moulds and yeasts, around 10^5 ufc/g, and pathogenic microorganisms have also been detected in the samples. However after their exposure ethylene oxide exposition for 30 and 60 minutes, an elimination of about 90% and 99,8%, respectively, was observed. The presence of the pathogenic microorganisms was completely eliminated after 30 minutes of exposure to gas.

The residual levels of ethylene oxide in the analyzed medicinal plants were reduced to acceptable levels after 14 days of environmental aeration. As for the ethylene glicol and ethylene chlorhidrin levels, these were within the sensibility limits of the adopted method.

No alteration was observed in chamomile, ginkgo biloba and guaraná, regarding the marker compounds concentration, even after a 60 minutes cycle exposure to ethylene oxide gas.

The results led us to the conclusion that microbial decontamination methods are necessary in order to provide safer products to consumers, as they are often consumed by sick people, among which several elders and children. We can also conclude that the decontamination process of medicinal drugs through ethylene oxide is an effective and safe process, provided the necessary safety requirements are adopted, what doesn't always happen.

Introdução

I- INTRODUÇÃO

O consumo de drogas vegetais tem crescido de forma consistente nas últimas décadas, inclusive no Brasil. O valor dos produtos naturais derivados das plantas medicinais para a sociedade e para a economia do Estado é incalculável. Um em cada quatro produtos vendidos nas farmácias é fabricado a partir de materiais extraídos de plantas, a venda oficial desses medicamentos no mundo atinge cerca de 20 bilhões de dólares/ano (GARCIA E COLABORADORES). No entanto, pouca informação se encontra disponível sobre os constituintes dos mesmos, bem como sobre o potencial de riscos à saúde humana.

Assim, questões relacionadas à qualidade dessas drogas apresentam fundamental importância. Em função de sua origem, a carga microbiana detectada em drogas vegetais pode ser considerada normalmente elevada, oferecendo riscos potenciais ao usuário. Desta forma, a avaliação de sua qualidade sanitária constitui etapa obrigatória no que se refere ao aspecto de segurança ao consumidor.

Diferentes métodos têm sido utilizados atualmente na descontaminação de drogas vegetais, porém, devem ser comprovadas a eficácia e segurança de tais processos além de garantida a estabilidade da droga vegetal, mantendo-se desta forma, suas propriedades terapêuticas e a segurança ao consumidor.

Há que se lembrar da biodiversidade que caracteriza o Brasil, e que certamente se constitui em condição favorável para que se viabilize à faixa mais carente, tratamentos terapêuticos utilizando fitoterápicos. Embora aumentando o número de adeptos desta prática, grande parte do consumo, infelizmente, ocorre por automedicação e sem nenhuma preocupação quanto a procedência e qualidade da droga vegetal e do medicamento fitoterápico. O assunto merece portanto estudos de natureza técnico-científica, de forma a adquirir consistência e tornar-se coerente com a fase de desenvolvimento do país.

Revisão de Literatura

II- REVISÃO DE LITERATURA

1. Histórico do emprego de fitoterápicos

A utilização de plantas como medicamentos pela humanidade é tão antiga quanto a história do homem. O processo de evolução da "arte da cura" se deu de forma empírica, em processos de descobertas por tentativas, de erros e acertos (MORS, 1982; GOTTLIEB & KAPLAN, 1989). Neste processo os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de gêneros vegetais, bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal, do reconhecimento do habitat e da época da colheita (LEVI-STRAUSS 1989). Após a identificação, vieram as técnicas de extrair sucos, secar folhas e raízes, triturar sementes e de conservação, que iriam iniciar a configuração de um corpo teórico-prático do conhecimento que constituiu a medicina do homem primitivo. Este processo foi lento e demorado, e no seu decorrer a intuição aliada aos ensaios vagarosamente converteram a experiência do saber em memória coletiva, como forma de repasse às gerações seguintes o conhecimento acumulado e, desta forma, preservá-lo (GARCIA E COLABORADORES).

O estudo terapêutico data da antigüidade, e conforme registros de escavações arqueológicas em "Peking man" na China, os homens na pré história viviam muito pouco, acredita-se que naquela época um terço da população morria na adolescência e que apenas 2% vivia até a quinta ou sexta década (HUANG, 1993). As causas de vida tão efêmera eram inúmeras: predadorismo, desastres naturais e enfermidades, por vezes transmitidas de pais para filhos, dentre outras. Com a evolução o homem foi aprendendo a combater seus inimigos naturais, e a natureza foi sem dúvida seu maior aliado, podendo mesmo criar-se a simbologia de ter sido ela o primeiro médico, a primeira farmácia e o primeiro hospital a que o homem recorreu.

Os primeiros escritos sobre ervas com poder curativo foram encontrados em placas de barro babilônicas, datadas de 3000 anos A.C., as quais apresentavam relatos do emprego de tais vegetais nos cerimoniais de magia

e medicina (SÁ, 1998). Culturas paralelas procederam também a registros de ervas medicinais.

Na China o cultivo de plantas medicinais foi iniciado por Sheu-ing. Nas obras do imperador Cho-Chin-Kei (AZUGARAY & AZUGARAY, 1983), são mencionadas as virtudes do Ginseng, do ruibarbo, do acônito e da cânfora. O imperador Huang Ti, e seus membros do gabinete desenvolveram técnicas para diagnosticar doenças e para a utilização de ervas no seu tratamento(HUANG, 1993).

No Egito havia o cultivo de diversas ervas, e outras eram levadas até lá por expedições. Com estas plantas foram preparados purgantes, vermífugos, diuréticos, cosméticos, tendo sido o emprego de ervas aromáticas extensivo à preparação de alimentos, assim como nas práticas utilizadas no ritual de mumificação (AZUGARAY & AZUGARAY, 1983). O egiptólogo alemão Greorg Ebers encontrou em 1873 um rolo papiro que se pode, posteriormente, constatar ser o primeiro tratado egípcio conhecido. Ao decifrá-lo foi surpreendido pela frase: "Aqui começa o livro relativo à preparação de remédios para todas as partes do corpo humano" (TESKE & TRENTINI, 1995)

Assírios e hebreus, ao que se sabe, também cultivavam diversas plantas úteis. Os primeiros preparavam com as mesmas águas aromáticas, tinturas e ungüentos, enquanto os hebreus utilizavam, em rituais e sacrifícios religiosos, plantas como a mirra, o incenso, etc. A Índia é, de outro lado, considerada por alguns autores como o "Eldorado dos medicamentos ativos", tamanha a riqueza e exuberância de sua flora medicinal (AZUGARAY & AZUGARAY, 1983).

Já Hipócrates (400-377 a.C.), também chamado "Pai da Medicina", reuniu em "Corpus Hippocraticum" todos os conhecimentos médicos de seu tempo, indicando para cada enfermidade, o remédio vegetal e tratamento adequados (AZUGARAY & AZUGARAY, 1983, SHEALY, 1998). No início da era Cristã, Dioscórides inventariou no seu tratado "De matéria Médica", mais de 500 drogas de origem vegetal e animal.

O grego Galeno ligou o seu nome ao que se denomina "farmácia galênica", onde plantas deixam de ser usadas na forma de pó, passando a constituir preparações, nas quais são empregados solventes como o álcool, água ou vinagre, com o objetivo de conservar e concentrar os componentes ativos, permitindo o preparo de ungüentos, emplastos e outras formas galênicas (TESKE & TRENTINI, 1995).

O Renascimento, com a valorização do experimento científico e da observação direta, assim como as grandes viagens para as Índias e a América, deram origem a um período de progresso no conhecimento das plantas e de suas aplicações (SÁ, 1998).

No Brasil, desde o descobrimento, os colonizadores observavam e registraram o uso freqüente de ervas pelos índios. O pesquisador Piso relatou, em Pernambuco, o emprego preferencial de ervas pelos índios, acreditando inclusive que, muitas vezes, o tratamento terapêutico adotado por estes mostrou-se superior àquele europeu (SÁ, 1998).

Esse conjunto de conhecimentos resistiu por milênios. Atualmente em todos os países, tanto desenvolvidos quanto em desenvolvimento, as plantas são utilizadas como agentes de tratamento; grande parte dos medicamentos originam-se de produtos naturais, em especial das plantas. Entre as 20 drogas mais vendidas nos EUA em 1998, apenas sete não eram derivadas de produtos naturais, tendo estes, ainda assim, participado em algum momento da história farmacológica desses (FERREIRA, 1998).

O tratamento à base de ervas conta com um grande número de seguidores, a Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população deste planeta de algum modo, utiliza plantas medicinais como medicamentos (GARCIA E COLABORADORES); destacando-se aqueles elementos pertencentes à camada mais carente da sociedade, principalmente devido ao baixo custo que este tratamento proporciona. A preocupação que poucos têm, entretanto, é quanto à qualidade do produto a ser consumido. Por um lado observa-se a falta de informação da população, que muitas vezes confunde a medicina popular com a medicina científica, de

outro a conservação e comercialização indevida destes produtos, seja também por desconhecimento ou por desejo de lucro fácil.

2. Histórico e características gerais

2.1. Alcachofra

Originária do Norte da África, a alcachofra é cultivada desde a antigüidade. No apogeu de sua civilização, os gregos e romanos a utilizavam como alimento e produto dietético. Atualmente é considerada como um medicamento hepatoprotetor, sendo cientificamente comprovado que promove o reestabelecimento dos hepatócitos. (POLUNIN, 1992).

Quando seca em condições adequadas (ampla ventilação a baixa temperatura), as folhas de alcachofra mantém sua coloração original: verde acinzentado no topo e um pouco mais clara na base (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998).

A alcachofra é conhecida desde os tempos remotos como colerégico. Experimentalmente, *in vivo* a cinarina desempenha atividade no fluxo biliar em ratos, e *in vitro* promove a proteção em hepatócitos de ratos perante a toxicidade ao tetracloreto de carbono (BRUNETON, 1999).

Há uma forte evidência de que a fitoterapia com extratos de alcachofra seja benéfica no tratamento de hiperlipoproteinemia. Um estudo clínico fase III realizado por Englisch e colaboradores em 2000 em três hospitais na Rússia concluiu que pacientes que consumiram um total de 1800 mg/dia de extrato de alcachofra tiveram uma significante redução nos níveis de LDL e colesterol total após seis meses de tratamento quando comparados com os tratados com placebo (ENGLISCH E COLABORADORES, 2000).

Estudo realizado por Gebhardt em 1998 avaliou a inibição da biossíntese de colesterol em culturas de hepatócitos de ratos e os resultados indicaram que os extratos de alcachofra reduzem a biossíntese de colesterol hepático em meio fisiologicamente favorável pela inibição indireta da hidroximetilglutaril-CoA-resutase (HMGCoA-redutase) via inibição e/ou

estimulação da inibição dos mecanismos regulatórios após administração por longos períodos (GEBHARDT, 1998). Por outro lado o extrato de alcachofra também estimula a transformação de colesterol em ácidos biliares (GEBHARDT, 1995).

A propriedade de estimuladora da secreção biliar da alcachofra são amplamente conhecidas, Kraft em 1997 verificou que o extrato aumenta o volume de fluxo biliar em 90 a 150% (KRAFT, 1997). Outro estudo mostrou que uma dose única admnistrada de 1,92 g promoveu um aumento da secreção de 127,3%, 151,5% após 30 e 60 minutos respectivamente. Este aumento de secreção e o subsequente aumento da síntese de ácidos biliares (GEBHARDT, 1995) somados aos efeitos anteriormente citados levam a diminuição do colesterol sanguíneo.

Os componentes ativos são os ácidos e os alcoóis fenólicos. Os primeiros são os ácidos cafeoquínicos, em média 1% da planta fresca, dentre eles o ácido 1,5 dicafeoquínico, mais conhecida como cinarina. Os segundos são os ácidos málico, succínico, láctico, fumárico e cítrico, que na somatória representam 0,8% também da planta fresca. (BRUNETON, 1999).

2.2. Camomila

A camomila, conhecida cientificamente como *Matricaria recutita* L. (anteriormente chamada de *Matricaria chamomilla* L.), é uma planta herbácea anual, originária da Europa, porém cultivada em todo o mundo. Os egípcios dedicavam a camomila ao sol e adoravam-na mais do que a qualquer outra erva, pelas suas propriedades curativas. Na Grécia, a camomila florescia abundantemente, distinguindo-se desde a antigüidade pelo seu aroma peculiar. O nome Matricária deriva do latim "mater" ou talvez "matrix" - útero, por ser utilizada em doenças femininas (POLUNIN, 1992).

Degustada desde os tempos antigos como um saboroso chá, foi designada na Europa como planta medicinal desde 1987 e é utilizada no tratamento de inúmeras doenças, de espasmos gastro intestinais a irritações

de pele. Estima-se que cerca de um milhão de copos de chás de camomila são consumidos diariamente no mundo (KINGHORN & BALANDRIN, 1993).

Utilizada interna e externamente por suas atividades antiinflamatórias, antiespasmódicas, antibacterianas e levemente sedativas, é comercializada na forma de tinturas, ungüentos e chás (POLUNIN, 1992).

2.3. Ginkgo biloba

Somente em 1998, os americanos despenderam cerca de 4 bilhões de dólares em drogas vegetais, tendo sido o Ginkgo biloba líder no ranking dos mais vendidos (BRADLY E COLABORADORES, 2000). O ginkgo biloba, assim como seus usos medicinais foram descritos na Matéria Médica Chinesa há aproximadamente 5000 anos. Nativo da China, é amplamente utilizado como árvore ornamental na Austrália, sudeste da Ásia, Europa, Japão e Estados Unidos, onde também é comercialmente cultivado.(DEFEUDIS, 1991; WHO, 1999)

É proveniente das folhas bipartidas em dois lóbulos da árvore de Ginkgo, forma de vida vegetal primitiva, datando de mais de 200 milhões de anos atrás, na era Paleozóica. Esta então evoluiu até tornar-se uma árvore propriamente dita, provida de raízes, tronco, ramos e folhas. É o último sobrevivente de uma flora desaparecida, remanescente das ginkgognáceas. Como último descendente da grande família, o *Ginkgo biloba* representa não apenas uma espécie mas também uma família, uma ordem e uma classe botânica. Por tudo isto, esta árvore representa uma espécie de fóssil vivo, conforme mencionado pelo naturalista Charles Darwin. (BANOV E COLABORADORES, 1999).

Além desta planta ter impressionado pela sua resistência a infestações por insetos, por bactérias como *Echerichia coli, Erwinia amylovora, Pseudomonas phaseoli* e *Bacillus pumilos*, além de alguns tipos de vírus e fungos que normalmente infectam as plantas, o Ginkgo biloba possui elevada tolerância à poluição urbana e às ações mutagênicas das radiações.

Não foi sem motivo que sobreviveu à explosão da bomba atômica em Hiroshima (BANOV E COLABORADORES, 1999).

Os extratos de Ginkgo biloba foram introduzidos na medicina em 1965, através das pesquisas do médico-farmacêutico alemão Willmar Schwabe. A folha de *Ginkgo* contém muitos ingredientes ativos, incluindo alcóois, aldeídos, cetonas, ácidos, esteróides, catequinas, flavonóides, terpenos, ginkgolideos entre outros (BANOV E COLABORADORES, 1999; WHILE E COLABORADORES, 1996). A composição química e as ações terapêuticas do extrato padronizado de Ginkgo biloba, EGb 761, foi resumido por DeFeudis. (DE FEUDIS, 1991). Dentre as partes utilizadas do Ginkgo biloba encontramos os grãos de pólem, sementes, frutos, troncos e folhas, das quais têm se extraído a maioria dos princípios ativos de ação terapêutica. A Farmacopéia Chinesa recomenda o emprego de Ginkgo biloba para o tratamento de coração e pulmões. Estudos recentes comprovaram a sua atuação em situações de alteração de fluxo sanguíneo e na arterosclerose cerebral. (BANOV E COLABORADORES, 1999; WHO, 1999). Sabe-se que o Ginkgo biloba tem conhecidas propriedades antioxidantes (RONG E COLABORADORES, 1996), na Europa este produto está em expansão sendo amplamente prescrito para problemas relacionados com insuficiência cerebral e vascular, deficiências cognitivas a outras doenças relacionadas com a idade (WHITE E COLABORADORES, 1996).

As possíveis ações farmacológicas da maioria destes compostos não são conhecidas ainda. Provavelmente o mais bem conhecido componente do Ginkgo é a ginkgolide B, um antagonista do FAP (Fator Ativador de Plaquetas), este composto pode ser responsável pelos efeitos imunológicos registrados (WHITE E COLABORADORES, 1996). Outros estudos demostraram os efeitos famacológicos das folhas de Ginkgo perante o Sistema Nervoso Central. Níveis de aminas biogênicas em cérebro de ratos foram significativamente aumentados após 7 dias de administração. A serotonina em particular, teve seu nível elevado na maioria das partes do cérebro (PETKOV E COLABORADORES, 1993). O uso prolongado desta droga também tem efeitos positivos de antiansiedade e anti estresse em

humanos (PORSOLT E COLABORADORES, 1990). Baseados em estudos similares uma patente foi aprovada para o uso de bilobalide, ou Ginkgo biloba enriquecido com este composto para tratamento para ansiedade e depressão (NOLDNER & CHATTERJEE, 1993). Estudos mais recentes sugerem que o Ginkgo produz redução da esquemia cerebral pela inibição da formação de óxido nítrico quando administrado em camundongos. (CALAPAI E COLABORADORES, 2000).

2.4. Guaraná

A cafeína proveniente de espécies vegetais tem sido consumida e apreciada pelo homem em todo o mundo há centenas de anos. Roberts e Barone acreditam que seu uso remonta à era paleolítica. Sua presença em inúmeros vegetais, caracterizados por levada incidência em diversas regiões do mundo, costuma ser apontada como uma das causas de sua grande utilização. Os astecas antes do descobrimento da América, empregavam as sementes de *Theobroma cacao* L.. para confeccionarem alimentos, as folhas de *Thea sinensis* L. são há milênios empregadas pelos asiáticos no preparo de chás e o café, bebida feita com as sementes das várias espécies do gênero Coffea, amplamente consumida em todo o mundo e principal fonte de cafeína da dieta americana, foi introduzido pelos africanos e difundido em todo mundo pelos árabes (MOUSINHO, 1984).

Bebidas antigas da América do sul contendo cafeína incluem o Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K..), o Yoco (da casca de *Paullinia yoco* L.) e o mate (de *Llex paraguaniensis*). (NICOLETTI E ORSINE, 1997).

O guaraná, conhecido científicamente como *Paullinia cupana* H.B.K. , é umas das espécies de maior potencial econômico na Amazônia. Seu cultivo data da época pré colombiana e era efetuado por diversas tribos indígenas; seu uso tem persistido durante séculos por índios da tribo Santerê-Maué, que vivem na região Amazônica (HENMAN, 1982). Seu emprego foi muito difundido dentre os colonizadores, sendo hoje amplamente utilizado na forma de bebidas, xaropes, pós e comprimidos (MOUSINHO, 1984). É um

produto exportado para vários países, dentre estes grandes potências como Japão e Estados Unidos.

Entre os seus constituintes químicos, a planta contém bases xantínicas como a cafeína, teofilina e a teobromina, sendo estes dois últimos encontrados na casca, flores e folhas, mas ausente nas sementes (MATTEI, 1998/ HENMAN 1982).

O guaraná tornou-se popular também pelos seus usos terapêuticos, caracterizando-se como estimulante do sistema nervoso central (em caso de estresse físico e intelectual), como antidiarréico e como agente diurético. As bases xantínicas entretanto não explicam todo este potencial terapêutico. Saponinas e altas concentrações de taninos são também encontradas na planta, assim como substâncias que promovem ação antioxidante (MATTEI, 1998).

3. Padrões microbianos em fitoterápicos

O meio científico tem manifestado uma grande preocupação quanto à qualidade microbiana dos produtos de origem natural, existindo inúmeros relatos e publicações a respeito do assunto. Os microrganismos mais freqüentemente detectados como contaminantes foram os bacilos Gram-positivos esporulados, bacilos Gram-negativos aeróbicos e anaeróbicos facultativos ou oxidativos (FISCHER, 1992).

Negreti (FISCHER, 1992) na verificação de pureza microbiana de drogas vegetais brutas e de produtos extrativos, comprovou a presença de cargas microbianas altas nas drogas brutas, sendo que 50% das 350 amostras analisadas apresentaram contagem bacteriana superior a 10^3/g.

Härtling (FISCHER, 1992), em 1983 , analisou 20 amostras de chás. As contagens bacterianas e fúngicas variaram respectivamente, de 25 a 1,2 x 10^6/g e de 0 a 2,6 x 10^3/g, tendo sido isoladas enterobactérias apartir de 11 das amostras, sendo que 7 destas apresentaram carga superior a 100/g.

Na Índia onde grande parte da população faz uso das plantas para tratamento de doenças, Roy e Chourasia (FISCHER, 1992), em 1989, fizeram levantamento da microflora presente em 5 drogas vegetais nativas, e verificaram na maioria dos casos a presença predominante de *Aspergillus flavus*, dentre outros contaminantes. O nível de aflatoxina B_1 na maior parte das amostras contaminadas excedeu o limite de tolerância de 20μg/kg, fixado pela OMS.

No Brasil, em 1992 Fischer analisou 84 lotes de especialidades farmacêuticas de uso oral na forma de pó, cápsula e comprimido comercializados em farmácias, drogarias, lojas de produtos naturais e supermercados da cidade de São Paulo, constatando que, segundo dados analíticos obtidos e padrões sanitários então vigentes, 59,5% das amostras deveriam ter sido rejeitadas.

Em 1998, Araújo analisou amostras de 15 drogas vegetais comercializadas em feiras do município de São Paulo e constatou que, frente aos limites da Federação Internacional Farmacêutica, 27% destas estavam em desacordo, elevando-se o percentual para 36% se considerados os limites das Farmacopéia Européia e Britânica de 1993 (ARAUJO, 1998).

Considerados insumos farmacêuticos, as drogas vegetais apresentam de forma inerente, pela sua origem, uma elevada contagem microbiana, por vezes patogênica. Atualmente as monografias farmacopêicas incluem requisitos específicos em função da origem das matérias primas, visando evitar a transmissão de doenças a partir da terapia medicamentosa. As primeiras citações sobre limites microbianos aplicados a produtos farmacêuticos e seus insumos ocorreram de forma vaga na 11ª e 12ª edições e com algumas modificações na 13ª edição da Farmacopéia Americana. Vale lembrar que o primeiro insumo farmacêutico com especificação relativa a pureza microbiana foi a Gelatina, na 12ª edição deste compêndio (USP XI, USP XII, USPXIII).

No Formulário Nacional de 1970 (NF XIII) e na 18º edição da Farmacopéia correspondente do mesmo ano é apresentada a seguinte expressão: "Drogas vegetais e animais deverão estar, o máximo possível, isentas de microrganismos, sendo que os patogênicos não deverão estar presentes" (NATIONAL FORMULARY, 1970).

Em maio de 1978, através de uma resolução da sua XXXI Assembléia Geral, a Organização Mundial de Saúde, órgão das Nações Unidas, determinou o início de um programa mundial com o fim de avaliar e utilizar os métodos da medicina popular, proporcionando por conseguinte a elaboração de estudos e padrões a serem seguidos (Pinto, Kaneko & Ohara, 2000).

A Farmacopéia Americana XVIII, no capítulo sobre "Atributos microbiológicos de produtos farmacêuticos não estéreis" cita um monitoramento com maior ênfase a matérias primas de origem animal e botânica, principalmente aquelas que permitem o crescimento microbiano e que não se tornam estéreis durante os processos subsequentes. Na Farmacopéia Americana XIX, o mesmo capítulo inclui considerações sobre esta mesma categoria, sugerindo-se que os produtos contendo estas matérias primas deveriam ser rotineiramente testados quanto à presença de patógenos específicos. Na Farmacopéia Americana XXIII e no NF constam 50 monografias de matérias primas com especificações quanto a qualidade microbiana, nestas o limite de microrganismos viáveis e indesejáveis variam entre 10^2 e 10^3/g (mL) (USP XXIII). Segundo a USP XXIV nas monografias para a camomila e ginkgo biloba os limites microbianos aceitos são de 10^4 UFC/g para bactérias, 10^2 UFC/g para a contagem total de bolores e leveduras além de ausência de *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (USP, 1999).

Em 1980, Lenoble e colaboradores sugeriram normas para as espécies vegetais destinadas ao consumo na forma de chá: para bactérias aeróbicas mesófilas, o limite era de $5x10^5$/g, enquanto que para fungos, de $5x10^2$/g e para enterobactérias, de $5x10^4$/g (FISCHER, 1992).

Especificamente quanto as drogas vegetais e fitoterápicos a Portaria nº 123 de 19 de outubro de 1994, na Norma Técnica para Registro de Fitoterápicos, estabelece a seguinte especificação: "menos que 10^3/g de total de viáveis; menos que 10^4/g de leveduras ou fungos; menos que 10^3/g de enterobactérias; ausências de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e fungos da família *Aspergillus*". No entanto, essa especificação não foi mantida na Portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, mencionando que a pesquisa de contaminantes microbianos e biológicos deve estar de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde ou de acordo com a Farmacopéia Brasileira (BRASIL LEIS E DECRETOS, 1995).

A mais recente regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária com relação aos fitoterápicos é a RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000.(BRASIL LEIS E DECRETOS, 2000) que menciona em seu capítulo Registro do Medicamento Fitoterápico Novo que a pesquisa de contaminantes microbianos devem estar de acordo com critérios farmacopêicos ou com as recomendações da Organização Mundial da Saúde.

A qualidade microbiana deve ser definida a partir de a diferentes fatores, dentre estes o principal consiste no fato de ser o produto consumido por pessoas debilitadas, por vezes inclusive imunodeprimidas.

Com a preocupação quanto a conservação e consumo de produtos assim contaminados, buscou-se formas de diminuir estas altas contagens microbianas. O avanço da tecnologia mostra técnicas eficazes para tratamento de insumos de origem vegetal. Estes são materiais por vezes isentos de umidade, seus princípios ativos na maior parte das vezes termossensíveis e há questionamentos quanto a eficácia do processo de descontaminação e toxicidade decorrente de resíduos oriundos ou decorrentes destes processos.

Alfa e colaboradores procederam a um estudo comparativo entre três diferentes processos de esterilização a baixas temperaturas: plasma,

peróxido de hidrogênio, e óxido de etileno, tendo sido este último o mais eficaz.(ALFA E COLABORADORES, 1996)

Atualmente os processos mais utilizados para descontaminação de drogas vegetais envolvem a irradiação gama e o tratamento químico por Óxido de Etileno; foram comparados por Bolander e colaboradores em 1995, com a comprovação da eficácia de ambos (BOLANDER, 1995).

4. Emprego do óxido de etileno na descontaminação de drogas vegetais

O processo de irradiação gama tem sido aplicado muitas vezes para desinfecção de produtos médico-hospitalares, porém com limitações de compatibilidade de certos materiais. Outro importante campo de aplicação para este tipo de processamento aplica-se os alimentos e fitoterápicos. A forma de irradiação mais explorada tem sido a radiação ionizante que promove efeitos diretos e indiretos, estes decorrentes da reação de estruturas celulares com íons carregados. Este processo, embora de elevada eficácia antimicrobiana, promove intensas alterações no nível molecular, incorporando riscos potenciais elevados. Há a necessidade de verificação de incompatibilidades e cuidadoso estudo de estabilidade, inclusive com verificação toxicológica, pois este processo pode acarretar o risco de alterações químicas, além de sensoriais, indesejáveis (OLIVEIRA, 2000; ITO E COLABORADORES, 1999).

Em 1973, o governo brasileiro estabeleceu uma regulamentação sobre irradiação de alimentos. Atualmente, há cerca de 20 produtos autorizados para irradiação e outros 17 estão aguardando estudos para possível liberação . Porém devido ao alto custo das instalações, equipamentos e manutenção do processo, há no Brasil apenas uma empresa que presta serviços de irradiação.

Uma alternativa interessante consiste no emprego de tratamento químico utilizando o óxido de etileno, agente antimicrobiano usado há anos, tendo sido Cotton e Roark (PHILLIPS & KAYE, 1949) os primeiros a notarem

sua atividade biológica, em 1928. Eles descobriram ser o agente um poderoso inseticida, e que sua mistura ao dióxido de carbono acarretava aumento no efeito pesticida, ao mesmo tempo que diminuía o poder explosivo do gás. Nos anos seguintes o uso de óxido de etileno como fumigante de insetos rapidamente se difundiu.

O óxido de etileno é um gás utilizado em muitos países para descontaminação de produtos de origem vegetal, principalmente os contaminados com bactérias patogênicas como a *Salmonella* na Nova Zelândia, E.U.A e Canadá. Por outro lado, na Europa este agente foi banido considerando-se sua toxicidade ocupacional e aos consumidores. (FOWLES, J., 2001; FOWLES 1999).

A patente referente à atividade antibacteriana do óxido de etileno foi solicitada em 1929 e obtida em 1936 por Schrader e Bossert (PHILLIPS & KAYE, 1949). Na patente os autores diziam que "pestes e germes de todos os tipos" eram destruídos pelo uso de óxido de alquileno em conjunto com CO_2, porém não foram apresentados dados técnicos.

Em 1933, Gross e Dixon (PHILLIPS & KAYE, 1949) afirmavam em sua patente "Métodos de Esterilização", aprovada em 1937, evidências experimentais de que o óxido de etileno era um eficaz esterilizante. O interessante é que nesta patente, os autores também citam uma teoria do mecanismo de ação da esterilização por óxido de etileno, além de apresentarem uma teoria de que na presença de umidade, parte do óxido de etileno é convertida em etilenoglicol, conversão considerada por eles como indispensável para o processo esterilizante.

A principal aplicação comercial na época vislumbrada, prendeu-se à esterilização ou descontaminação de especiarias, visto que havia sido atribuída à presença de microrganismos a principal causa da deterioração de alimentos (PINTO, 1991).

Griffith e Hall em sua patente solicitada em 1937 (PHILLIPS & KAYE, 1949) e depois revisada em 1940 e 1943, apresentaram o uso de câmara de vácuo com óxido de etileno para esterilizar especiarias e outros materiais.

Patentes similares foram apresentadas pelos mesmos autores para esterilização de pancreatina e materiais coloidais.

Baerwald (PHILLIPS & KAYE, 1949) em 1944 apresentou a eficácia da esterilização de frutas secas e outros alimentos embalados em celofane ou materiais similares.

Phillips e Kaye (KAYE, 1949; KAYE & PHILLIPS, 1949; PHILLIPS, 1949; PHILLIPS &KAYE, 1949) elaboraram uma série de trabalhos, iniciando com uma revisão bibliográfica, e a seguir apresentando a possibilidade de esterilização de materiais que não suportariam métodos convencionais. Em seguida informaram sobre o efeito do óxido de etileno provocando a morte de esporos de *Bacillus globigii*, além de apresentarem resultados em condições experimentais a baixas temperaturas de trabalho. Os esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* foram inicialmente mencionados por Mrak e Fisher (PHILLIPS & KAYE, 1949) e mais tarde por Kereluk e colaboradores (KERELUK E COLABORADORES, 1970) como os microrganismos comprovadamente com características mais resistentes a este processo, tendo sido por este motivo escolhidos como sensores dos monitores biológicos.

Pinto e colaboradores publicaram trabalhos em 1992 (PINTO & CRUZ, 1996), estudando o emprego do *Bacillus subtilis* var *niger* como monitores biológicos em diferentes suportes. Mais tarde, em 1996 (PINTO & SAITO, 1992), estudaram distintos corpos de prova e meios de esporulação do mesmo, comprovando sua eficácia nas situações descritas.

5. Oxido de Etileno, aspectos gerais

O principal uso do óxido de etileno é na indústria química, onde é empregado na produção de poliéster, detergentes, etilenoglicol e filmes plásticos. Devido ao seu grande espectro antimicrobiano e seu poder de difusão através de diversos tipos de materiais, dentre estes filmes plásticos, ele também é, em menor escala, utilizado na desinfecção e esterilização de materiais. É registrado como pesticida pelo *Enviromental Protection Agency*

(EPA), e amplamente empregado na indústria de alimentos como agente fumigante. No Brasil, o Ministério da Saúde enquadra o óxido de etileno como saneante, quando usado como descontaminante ou como agente esterilizante. (PINTO & AMOEDO, 2002)

Também chamado de epoxi etano e óxido de dimetileno, o óxido de etileno é um éter cíclico que reage com muitos compostos, entre os quais álcoois, aminas, ácidos orgânicos e amidas (BLOCK, 1983; PINTO & AMOEDO, 2002). Em pressão atmosférica e temperatura ambiente, o óxido de etileno ($(CH_2)_2O$) é um gás incolor com odor característico, não perceptível pela maioria das pessoas. Apresenta peso molecular é 44,0, e a baixas temperaturas é um líquido com ponto de ebulição a pressão atmosférica de 10,8 °C (RUSSEL E COLABORADORES, 1982).

O óxido de etileno na forma líquida ou gasosa é solúvel em polímeros sintéticos, couro, borracha, plásticos, podendo causar irritações na pele (RUSSEL E COLABORADORES, 1982). É também solúvel em água a 10°C e na presença desta reage formando etilenoglicol, já na presença de água e íons cloro reage formando um composto chamado etileno cloridrina.

Seus vapores, não sua forma líquida, são inflamáveis e explosivos a concentrações a partir de 3% no ar (PINTO & AMOEDO, 2002) entretanto estas propriedades podem ser contornadas utilizando as chamadas misturas esterilizantes nas quais o óxido de etileno é diluído em CO_2 ou fluorocarbonos (KAYE, 1949; OLIVEIRA, 2000). Devido a questões ecológicas os fluorocarbonos estão sendo substituídos por hidroclorofluorcarbonos, resultando em misturas contendo de 10 a 12% de óxido de etileno, também com características de não explosivos e compatíveis com a preservação da estratosfera. (OLIVEIRA, 2000).

6. Ação antimicrobiana do óxido de etileno

Phillips em 1977 comprovou que óxido de etileno inativa todos os tipos de microrganismos incluindo vírus e esporos de bactérias, e que estes

últimos são 5 a 10 vezes mais resistentes ao processo que as células vegetativas (BLOCK, 1983).

O modo de ação deste agente esterilizante se dá por deslocamento "in vivo", envolvendo uma reação nucleófila do sitio ativo biológico com a molécula do óxido de etileno, resultando alquilação ao nível molecular. Estes sítios ativos são principalmente grupos sulfidrila, amino, carboxila, fenoxila e hidroxila de ácidos núcleicos, proteínas, péptides, aminoácidos, e enzimas de células microbianas além de, em uma menor escala, vitaminas, carbohidratos e hormônios, causando a morte e/ou injúria celular (BLOCK, 1983; GUNTHER, 1980).

Pode-se ainda inferir que tais efeitos variem de acordo com a extensão da reação, podendo ser um efeito estático (quando a alquilação inibe a germinação do esporo até que um auto reparo ocorra espontaneamente), mutagênico (se a reação com óxido de etileno alterar o código de aminoácido ou produzir deficiências no mecanismo de síntese de proteínas) ou ainda tóxico (quando resultado da alquilação do ácido nucléico numa extensão suficiente para impedir a síntese protéica, e ocasionar a morte. (PINTO & AMOEDO, 2002)

Winaro e Stumbo em 1971, mostraram que o efeito letal do óxido de etileno em esporos de *Clostridium botulinum* tipo A, vem da dupla alquilação da trifosfato guanina e trifosfato adenina do DNA celular (WINARO E STUMBO, 1971).

Existem restrições ao seu emprego na área de alimentos, especiarias e mesmo fitoterápicos devido à possível destruição, principalmente, de vitaminas e aminoácidos que pode se estender a outras substâncias (PINTO, 1991).

Dentre os fatores que determinam a eficácia do processo de descontaminação com óxido de etileno estão a temperatura do processo, a concentração do gás, a pressão da câmara, a porosidade do material de embalagem, tempo de exposição, o tempo de aeração e a umidade relativa (PINTO, 1991) sendo este último de fundamental importância, pois

microrganismos que tenham sido equilibrados sob níveis de umidade, ou mesmo que retenham alguma atividade de água, são mortos com relativa facilidade pelo óxido de etileno. Acredita-se que a reação química orgânica ocorra com a formação de um complexo ativado, e a água influencia esta ativação, tornando-se evidente sua importância como meio de reação. É também óbvio que água deve estar presente, como meio de reação, ao se considerar como solvente de entidades biológicas, as quais devem estar ionizadas para que entrem em estado de transição como o gás. Ainda, ao se considerar que este agente e o sítio biológico a ser atingido devem ser envolvidos em reação do tipo covalente, esta deve ocorrer em solvente polar, característica a qual a água possui. (PINTO & AMOEDO, 2002)

A água possui ainda outra função, pertinente a concentrar o agente esterilizante na superfície do microrganismo. Em uma atmosfera contendo água em estado de vapor e óxido de etileno, mesmo que ocorrendo poucas colisões, este se dissolve na fase líquida sobre o microrganismo, concentrando-se e aumentando efetivamente a disponibilidade do agente esterilizante, assim aumentando a velocidade de morte microbiana. (PINTO & AMOEDO, 2002)

7. Produtos de degradação

O processo empregando óxido de etileno pode originar resíduos tóxicos difíceis de serem eliminados. O agente ativo reage na presença de água e/ou íons cloro e bromo, formando principalmente etilenoglicol e etileno cloroidrina, que são os produtos de degradação usualmente pesquisados em processos desta natureza.

Chaigneau e Muraz em 1993, após desinfecção por óxido de etileno de 16 especiarias, observaram uma rápida perda de residual de óxido de etileno e etilenoglicol em poucos dias. Entretanto a presença de etileno cloroidrina permaneceu por mais de 6 meses (CHAGNEAU & MURAZ, 1993).

A evolução no sentido de exigências mais rigidas quanto a níveis de resíduos tem ocorrido simultaneamente a desenvolvimentos metodológicos que compatibilizam com tais limites de detecção.

Assim, em 1989 Nogueira e colaboradores utilizaram a água como solvente extrator de óxido de etileno e seus derivados em seringas de plástico, conseguindo com essa técnica resultados satisfatórios (NOGUEIRA E COLABORADORES, 1989).

Wojcik-O'neill e Ello em 1990 realizaram um estudo comparativo de dois diferentes tipos de solventes extratores para a determinação de residual de óxido de etileno em correlatos hospitalares. Eles utilizaram um método alternativo à extração aquosa, sugerida pela Associação para o Avanço da Instrumentação Médica (AAMI), empregando o ácido clorídrico 10%, que provoca a reação do óxido de etileno com íons cloreto resultando em etileno clorihidrina. Os resultados obtidos foram equivalentes entre os dois métodos. Entretanto, não se tem localizado na bibliografia disponibilizada informação quanto à detecção de resíduos em fitotarápicos. Quanto à metodologia analítica mais adequada, acredita-se que também para detecção de resíduos deste grupo de natureza complexa deva-se trabalhar com a cromatografia gasosa (WOJCIK-O'NEILL & ELLO, 1990).

O primeiro autor a empregar a cromatografia foi Ramsey em 1905 (MACNAIR & BONELLI, 1968), para separar misturas de gases e vapor. Estes experimentos iniciais usavam absorção seletiva, ou dessorção a partir de absorventes sólidos como o carvão ativo. No ano seguinte Tswett (MACNAIR & BONELLI, 1968) obteve discretas bandas coloridas numa coluna cromatográfica, desta descoberta adotou-se o nome "cromatografia" que significa literalmente "grafia colorida", que não se aplica aos métodos atualmente utilizados. Seguindo a sugestão de Martin e Synge em um estudo que mais tarde rendeu-lhes um Prêmio Nobel, James e Martin introduziram a cromatografia gás-líquida em 1952.

Embora vários métodos tenham sido desenvolvidos para a determinação dos níveis de óxido de etileno, envolvendo por exemplo a colorimetria e

gravimetria, a cromatografia gasosa (CG) tem sido normalmente preferida por ser mais rápida e sensível. Vários métodos para análises em CG de solventes extratores têm sido reportados. Uma sofisticação deste procedimento consiste na cromatografia gasosa por "head space", como descrita por Romano em 1973 (KAYE & NEVELL, 1985)

A cromatografia gasosa foi utilizada por alguns autores para detectar resíduos de óxido de etileno e seus derivados em produtos secos (JENSEN, 1998; SPITZ & WEINBERGER, 1971; WINARO & STUMBO, 1971). Jensen em 1988 trabalhou com 204 produtos alimentícios. Este autor converteu os resíduos em etilenoiodoidrina, determinado então com detector de captura de elétrons em sistema de cromatografia gasosa (JENSEN, 1998).

Dentre as vantagens de se trabalhar com cromatografia a gás estão a velocidade de obtenção de resultados, a alta resolução, resultados quali e quantitativos, a sensibilidade do processo além da simplicidade de operação e compreenção (MCNAIR & BONELI, 1968; SPITZ & WEINBERGER, 1971).

8. Aspectos toxicológicos

Apesar do óxido de etileno ser utilizado em uma menor escala para esterilização em hospitais e indústrias, é nesta aplicação que se dispõe de conhecimento quanto a exposição ocupacional, principalmente pelo fato de o processo ser realizado freqüentemente em locais impróprios, sob condições inadequadas de segurança (OLIVEIRA, 2000).

No que se refere a descontaminação de fitoterápicos, nos Estados Unidos o limite residual em drogas vegetais é 50 ppm, embora base científica para tal não ter sido encontrada. Até 2000 o mesmo limite era adotado na Austrália, entretanto seguindo as considerações de um estudo preparado pelo *New Zealand Institute of Environmental and Scientific Research* (ESR) de título *Cancer Risk Assessment of Ethylene Oxide Residues in New Zealand Spices* o limite máximo residual foi alterado para 20 ppm (ANZFA, 2000). Atualmente no Brasil não existe qualquer regulamentação sobre controle no teor de óxido de etileno.

Tendo por base informações verbais, assim como constatações de procedimentos sendo desenvolvidos de drogas submetidas à descontaminação, neste caso o risco ocupacional é ainda maior. Isto, além de ser decorrente da inexistência de normatização específica, decorre do tipo de embalagens utilizadas, ou mesmo de sua ausência, o que após aeração do material descontaminado leva a maior exposição dos operadores. As grandes quantidades de materiais, muitas vezes de baixo valor agregado, desestimula o produtor quanto a providências de instalações sofisticadas, com transferências automatizadas e providas de controles operacionais remotos. Peca-se também nos controles em geral, entre estes os de resíduos nos produtos e ambientes.

A toxicidade do óxido de etileno, anteriormente admitida no nível de 50 ppm de exposição diária, teve seu limiar de aceitação reduzido, pois devido a sua reatividade com hidrogênio ativo e agentes nucleófilos, o óxido de etileno, torna-se um gás altamente mutagênico e carcinogênico (OSHA, 1995).

Apesar de ter um limiar de odor por volta de 700 ppm, uma exposição no nível de de 200 ppm pode causar irritação nos olhos e no sistema respiratório superior. Exposição de humanos a altos índices de óxido de etileno resulta em lesões na pele, irritação nas mucosas, náuseas, vômitos, dor de cabeça, convulsões e morte. Contato com materiais tratados com óxido de etileno não adequadamente aerados para remoção de seus resíduos de processo pode causar escamação da pele (ELLENHORN E COLABORADORES, 1997). Estudos laboratoriais têm mostrado também tumores linfóides, mesoteliais, subcutâneos, pituitários e cerebrais, além de metaplasia nas células estomacais (FOWLES, 2001).

A exposição momentânea ou crônica ao óxido de etileno pode causar disfunções no sistema nervoso, o que sugere uma reversível neuropatia sensorial, além de deficiência neurofisiológica. Com relação ao sistema reprodutivo humano, o óxido de etileno assim como o seu produto de degradação, o etilenoglicol podem causar danos testiculares nos homens;

nas mulheres, pode causar abortos espontâneos, além de má formação fetal (ELLENHORN E COLABORADORES, 1997).

O resíduo de óxido de etileno diminue rapidamente, entretanto resíduos de etileno cloridrina persistem por longos períodos de tempo (ANZFA, 2000). Este derivado do óxido de etileno tem seu limite de exposição de 1 ppm e a dose fatal para adultos tanto por ingestão quanto por inalação é de 1 a 2 mL. É convertido no organismo presumidamente a ácido clorídrico, causando edema pulmonar, danos vasculares, inibição direta do músculo cardíaco, depressão no sistema nervoso central, além de danos nas funções hepáticas e renais (DREISBACH & ROBERTSON, 1987). Um estudo comparativo da toxicidade *in vitro* de óxido de etileno e etileno cloridrina demostra que esta última é aproximadamente 20 vezes menos mutagênica que o óxido de etileno na mesma concentração em bactérias, Benson e Teta em 1993 encontraram potencial aumento de câncer pancreático, lynfopoiético e hematopoiético em 278 trabalhadores, de em média 36 anos, expostos ocupacionalmente por cerca de 5 anos a este agente. O Programa Nacional de Toxicologia Americano (National Toxicology Program) classificou a etilenocloridrina como fraco mutagênico, porém seu subproduto, o 2-cloroacetaldeído formato pela oxidação hepática, é classificado como altamente carcinogênico. (FOWLES, 2001).

A principal manifestação aguda causada pela etileno cloridrina é a falência respiratória e circulatória, não ocasionando envenenamento crônico. Os sintomas aparecem cerca de 1 a 4 horas após a ingestão, inalação ou absorção cutânea e incluem náuseas, vômitos, dor de cabeça, dores abdominais, excitabilidade, delírios, respiração lenta, queda da pressão sangüínea, contração muscular, cianose e coma (DREISBACH & ROBERTSON, 1987). A legislação canadense permite um limite máximo residual de 1500 ppm de etileno cloridrina em fitoterápicos baseado em estudos de fumigações realizadas pelo *American Spice Trade Association* (ASTA) (ANZFA, 2000).

Já o etilenoglicol, segundo derivado de maior importância, tem seu limite de exposição no valor de 50 ppm. Distribui-se pela água do organismo, sendo metabolizado pelo ácido oxálico, do qual decorrem os efeitos tóxicos. Pode ocasionar danos cerebrais e renais, por mecanismos desconhecidos (DREISBACH & ROBERTSON, 1987).

As principais manifestações de envenenamento por etilenoglicol se desenvolvem após ingestão em doses altas, semelhantes à intoxicação por álcool, evoluindo rapidamente a vômitos, cianose, dores de cabeça, taquicardia, hipotensão, edema pulmonar, e inconsciência com convulsões além de, por vezes, hipoglicemia. Pode ocorrer morte em poucas horas por falência respiratória, ou nas primeiras 24 horas por edema pulmonar. Pacientes que estiveram em coma prolongado ou convulsões podem apresentar danos irreversíveis ao cérebro. No caso de envenenamento crônico por inalação pode ocorrer inconsciência induzida e linfocitose (DREISBACH & ROBERTSON, 1987).

Em 1994 a Agência Nacional de Pesquisas para o Câncer alterou a classificação do óxido de etileno do grupo 2A (provavelmente carcinogênico para humanos), para grupo 1 (carcinogênico para humanos) devido ao aumento das evidências epidemiológicas e ocupacionais da capacidades deste gás de promover tumores em animais de laboratório e humanos por mecanismos genotóxicos comuns (IARC, 1994).

O Ministério da Saúde, em abril de 1999, estabeleceu na Portaria Interministerial nº 482 (BRASIL LEIS E DECRETOS, 1999), limite de tolerância de óxido de etileno concentrado no ambiente de trabalho em 1,8 mg/m^3 ou 1 ppm de concentração no ar, para uma carga horária de 8 horas; e estabeleceu também a concentração máxima permitida para exposição em períodos de até 15 minutos, em 9 mg/m^3 ou 5 ppm, limites que condizem com os internacionais recomendados pela OSHA (Occupational Safety & Health Administratiom) nos Estados Unidos (OSHA, 1995). Esta portaria entretanto não abrange o processo quando aplicado a fitoterápicos,

permanecendo esta situação totalmente normas legislação, de qualquer natureza.

Objetivos

III- OBJETIVOS

Os objetivos principais do trabalho proposto consistem em:

- Determinar os níveis de qualidade e de contaminantes microbianos em amostras representativas de alcachofra (*Cynara scolimus* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.), ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.), no aspecto quantitativo e quanto à presença de microrganismos indicadores patogênicos;

- estudar o efeito do tratamento com óxido de etileno em tempos distintos (zero, 30 e 60 minutos), sobre a carga microbiana das drogas vegetais acima discriminadas;

- estudar a segurança e eficácia do processo de descontaminação das drogas vegetais empregando óxido de etileno;

- determinar concentrações residuais do óxido de etileno e seus produtos de degradação, após de tempos de aeração de 3, 7, e 14 dias;

- determinar alterações provocadas pelo agente de descontaminação, nos princípios ativos de alcachofra (*Cynara scolimus* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.), ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.), respeitando as composições inicialmente presentes de grupamentos ativos, após os distintos tempos de tratamento: zero, 30 e 60 minutos.

Material e Método

IV- MATERIAL E MÉTODO

1. Material

O objeto de estudo é constituído das seguintes drogas vegetais: guaraná, alcachofra, ginkgo biloba e camomila. Estas foram obtidas de fornecedores locais, em quantidades de cerca de 1 Kg por amostra, por sua vez em triplicata de cada uma das três fontes distintas, perfazendo 9 Kg de cada espécie de droga vegetal. Após embaladas em sacos plásticos, as três réplicas de cada droga foram submetidas à descontaminação por óxido de etileno a distintos intervalos de tempo.

2. Inspeção visual das drogas vegetais antes do processo de fracionamento das amostras dos fornecedores A, B e C.

As drogas vegetais foram visualmente inspecionadas, utilizando-se como parâmetros de inspeção as informações descritas em monografias de compêndios oficiais (USP XXVI, 1999/FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) e no capítulo referente a "Determinação de Material Estranho" da Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

3. Material de embalagem:

Foram utilizadas embalagens de filmes plásticos (polietileno-poliester-polietileno), providas de "air-vents" em Tyvek®, numa área de aproximadamente 1000 cm^2 (35 x 35 cm) com porosidade Gurley de aproximadamente 200 segundos. A superfície total de embalagem perfaz área de 2000 cm^2.

4. Avaliação da qualidade sanitária das amostras

A qualidade sanitária foi avaliada quantificando a biocarga das drogas vegetais envolvidas no estudo, trabalho precedido pela validação da técnica de contagem, conforme descrito na USP XXVI e no ítem 4.2. Investigou-se

adicionalmente a presença de indicadores patogênicos específicos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp e *Escherichia coli.*

4.1. Preparo da amostra:

Alcachofra: As folhas de alcachofra foram fragmentadas em liqüidificador, marca Walita®, provido de facas denteadas, modelo Delta eletrônico, previamente esterilizado. A trituração foi durante 5 minutos em rotação média, trabalhando-se com técnica asséptica.

Camomila: As flores de camomila foram fragmentadas manualmente, com a utilização de luvas estéreis, em ambiente biolimpo e com cuidados de assepsia.

Ginkgo biloba: As folhas foram fragmentadas com a utilização de pinça e tesouras estéreis, de maneira a obter-se como resultado final fragmentos menores que 3 mm^2, em ambiente biolimpo e com cuidados de assepsia.

Guaraná: As sementes de guaraná foram pulverizadas em liqüidificador marca Walita®, previamente esterilizado, provido de facas denteadas, modelo Delta eletrônico. A trituração foi durante 3 minutos em rotação média, trabalhando-se com técnica asséptica.

4.2. Validação da técnica

Na preparação da amostra, após verificar sua representatividade, deve-se investigar a presença de compostos antimicrobianos, inerentes à sua natureza, capazes de interferir no resultado final. A eventual constatação de tais interferentes estaria induzindo a procedimento de inativação, conforme compêndio oficial (USP XXVI, 2003), empregando substâncias específicas nos meios de cultura e diluentes utilizados para a contagem microbiana e para a pesquisa de patógenos específicos.

As amostras foram submetidas a diluições seriadas decimais. A cada uma das diluições, foi adicionado 1mL da suspensão de cada uma das cepas dos microrganismos indicados para o desafio (*S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* sp. e o fungo *Aspergillus niger* ATCC 16404), contendo aproximadamente 100 unidades formadoras de colônias (UFC). Após agitação, alíquotas de 1,0 mL de cada uma das amostras constituídas pelas drogas vegetais inoculadas com as distintas cepas microbianas foram semeadas, em triplicatas, para placas de Petri contendo meio ágar caseína-soja. Seguiu-se incubação a 37°C por 72 horas.

Para a comprovação da eficiência da técnica e da não interferência da amostra sobre os resultados, o teste foi acompanhado por controle, no qual alíquotas de 1mL da suspensão de cada um dos microrganismos foram adicionadas em 9mL de solução de água peptonada 0,1% p/v, seguindo-se o mesmo procedimento de contagem microbiana anteriormente descrito.

4.3. Método de contagem microbiana em meio sólido (semeadura da amostra em profundidade).

As amostras após serem pulverizadas ou fragmentadas, foram suspensas em solução peptonada (0,1% p/v) respeitando fatores de diluição de 10^1 a 10^5. O processo consistiu na transferência de alíquotas de 1 mL de cada concentração diluída da amostra, em três réplicas, para placas de Petri estéreis, vertendo-se em seguida cerca de 20 mL de meio de cultura sólido ágar Caseína-soja fundido e resfriado a cerca de 45°C, em três placas, e 20 mL de meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose fundido e resfriado a cerca de 45°C, em outras três placas. Os meios de cultura foram previamente preparados segundo especificações do fabricante, e após sua adição sobre as amostras; efetuou-se a homogeneização com movimentos em 8 sobre a bancada.

Seguindo a solidificação dos meios de cultura, incubou-se as placas em posição invertida, em temperaturas e períodos diferentes: ágar Caseína-soja

para bactérias a temperatura de 30-35^{0}C por 5 dias e ágar Sabouraud Dextrose para fungos a temperatura de 20-25^{0}C por 7 dias.

As colônias foram contadas à vista desarmada, levando em conta crescimento tanto em profundidade como em superfície. O número médio das colônias detectadas nas réplicas multiplicado pelo fator de diluição forneceu o número de UFC por unidade de peso da amostra. (USP XXVI, 2003, VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1999)

4.4. Pesquisa de Patogênicos Específicos

Apesar da discrepância observada nos requisitos quanto a ausência de microrganismos patogênicos ou seus indicadores para distintas drogas vegetais, decidiu-se pelo desenvolvimento da pesquisa de forma padronizada, abrangendo: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* sp, *Escherichia coli* e demais microrganismos do grupo dos coliformes além de fungos do gênero *Aspergillus* . Trabalhou-se sempre com cepas representativas dos controles positivos, paralelamente à investigação de contaminantes.

4.4.1. Enriquecimento em meios de cultura não seletivos

Quantidade de aproximadamente 10 g da amostra foi transferida de forma asséptica para frasco erlenmeyer estéril adicionando-se alíquota suficiente de caldo lactose para se obter total de 100 mL da suspensão, para a pesquisa de microrganismos do grupo dos coliformes, entre os quais *Escherichia coli*, e de *Salmonella sp.*, com incubação em estufa por 48 horas a 30-35^{0}C. O mesmo procedimento foi utilizado porém empregando-se como meio de enriquecimento não seletivo o caldo de Caseína-soja, para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa.* (USP XXVI, 2003)

4.4.2. Enriquecimento em meio seletivo para a pesquisa de *Salmonella*

Alíquotas de 1 mL da suspensão resultante do meio de enriquecimento não seletivo (caldo lactose) foram transferidas respectivamente para 10 mL dos meios seletivos caldo Tetrationato e caldo Selenito Cistina, com incubação por período de 24 horas a 30-35°C. (USP XXVI, 2003)

4.4.3 Isolamento em meios de diferenciação

- Meios de cultura empregados para o isolamento de *Staphylococcus aureus:* O crescimento obtido no caldo caseína-soja (ítem 2.3.1) foi transferido para placa de Petri contendo 20 mL de ágar Vogel-Johnson, empregando-se técnica de estria em superfície com auxílio de alça de Henle. A incubação ocorreu por intervalo de tempo de 48 horas a 30-35°C. Colônias pretas circundadas por uma zona amarela foram indicativas de resultado positivo (USP XXVI, 2003).

- Meios de cultura empregados para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*: Na presença de crescimento no caldo de caseína soja, transferiu-se uma alçada deste para placa de Petri contendo 20 mL de ágar Cetrimida, empregando-se técnica por estria em superfície. A incubação foi conforme descrito para o microrganismo anteriormente mencionado. A presença de colônias esverdeadas e fluorescentes na presença de luz ultravioleta é indicativo de resultado positivo. Colônias isoladas do ágar Cetrimida foram repicadas para placa de Petri contendo ágar para Detecção de Piocianina, e ainda para placa de Petri contendo ágar para Detecção de Fluoresceína. Após incubação a 35 ± 2°C, por 48 horas, colônias esverdeadas a vista desarmada e azuis na presença de luz ultravioleta, e amarelas tanto a vista desarmada como a luz ultravioleta, respectivamente em cada um dos meios de cultura, indicaram resultado positivo para a detecção (USP XXVI, 2003).

- Meios de cultura empregados para o isolamento de *Escherichia coli*: Alíquota do crescimento em caldo lactose foi transferida para placa de Petri contendo 20 mL de ágar Mac Conkey, com o auxílio de alça de Henle empregando-se técnica de estria em superfície. A incubação foi

efetuada por 24-48 horas a 30-35°C. A presença de colônias de coloração vermelho tijolo é indicativo de resultado positivo para o teste . O crescimento apresentando essa característica foi transferido para placa de Petri contendo 20 mL de ágar Eosina e Azul de Metileno (ágar EMB). Após incubação por 48 horas a 30-35°C o crescimento de colônias de coloração azul escura e aspecto metálico sob luz visível indicaram resultado positivo para o teste (USP XXVI, 2003).

- Meios de cultura empregados para o isolamento de *Salmonella* sp : O crescimento obtido nos meios de enriquecimento seletivo foi transferido para placa de Petri contendo ágar Verde Brilhante , ágar Sulfito de Bismuto, ágar com Xilose, Lisina e Desoxicolato (ágar XLD), empregando técnica de estria em superfície. A incubação foi efetuada por 48 horas a 30-35°C. A presença de colônias pequenas, transparentes, incolores ou rosas a branco opaco freqüentemente circundadas por zona rosa a vermelha, vermelhas com ou sem centros negros, colônias pretas ou verdes respectivamente para ágar Verde Brilhante, ágar XLD e ágar Sulfito de Bismuto, indicaram resultado positivo para o teste (USP XXVI, 2003).

4.4.4 Identificação Presuntiva

Colônias suspeitas obtidas dos meios seletivos foram submetidas a avaliação micromorfológica após coloração pela técnica de Gram. Adicionalmente foram efetuados testes para identificação presuntiva, conforme segue. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988):

– *Staphylococcus aureus*: No caso de resultado positivo, seguiu-se com observação da presença de cocos gram-positivos formando grupamento semelhante a cachos de uva. Também foi efetuado teste para detecção de coagulase, bem como teste de Desoxirribonuclease.

– *Pseudomonas aeruginosa*: No caso de constatação de bastonestes gram-negativos foi efetuado teste para a detecção de enzima

citocromo-oxidase. A confirmação de resultado positivo para esse teste implicou na realização da prova de crescimento a 41°C em ágar inclinado de infusão cérebro coração.

– *Escherichia coli:* No caso de caracterização de bastonetes gram-negativos foram efetuados os seguintes testes: ágar Tríplice Açúcar Ferro, testes de Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e de Citrato como única fonte de carbono.

– *Salmonella* sp. Quando da detecção de bastonetes gram-negativos e reação característica no teste ágar Tríplice Açúcar Ferro, prosseguiu-se com os seguintes testes: ágar de Lisina Ferro, teste de Citrato como única fonte de carbono, Urease e Fermentação da lactose.

5. Determinação da umidade relativa (UR)

A avaliação para cada tipo de droga vegetal foi efetuada no material conforme recebido (anteriormente ao condicionamento ambiental) e após o condicionamento ambiental (anteriormente à colocação na câmara de descontaminação). Foi também efetuado após o processo de descontaminação. Para cada uma das amostras as determinações foram em duplicatas (duas tomadas de ensaio de cada amostra).

5.1. Preparo da amostra

O preparo da amostra consistiu na redução da dimensão das drogas à medida máxima de 3 mm (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

5.2. Pré umidificação antes do processo de descontaminação. (Condicionamento ambiental)

As drogas foram colocadas a condições controladas, em estufas pré-umidecidas (50-70% de umidade relativa) à temperatura de 30°C e nestas condições constantes permaneceram por 48 horas.

5.3. Perda por Dessecação: Método Gravimétrico

Transferiu-se cerca de 2 a 5 gramas da droga vegetal, exatamente pesados, de amostra preparada conforme instruções anteriores, para pesa filtro chato tarado, previamente dessecado nas condições a serem adotadas para a amostra durante 30 minutos. Dessecou-se a amostra em estufa a 105°C durante 5 horas antes da pesagem. O ensaio foi dado por concluído quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 5 mg. Calculou-se a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar. O limite de umidade para Drogas vegetais em geral situa-se na faixa de 8 a 14%. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

6. Descontaminação por Óxido de etileno

6.1. Preparo do Material e definição de parâmetros

As embalagens contendo amostras representativas de cada uma das drogas vegetais, de origens distintas, foram introduzidas na câmara de descontaminação após condicionamento ambiental (Ítem 5.2). As condições de tratamento foram de 50±3°C; 50-70% UR; 600 mg/L de óxido de etileno, sendo variáveis os tempos de exposição, abrangendo zero (material não exposto ao agente descontaminante), 30 minutos e 60 minutos.

O total das amostras analisadas, em triplicata, para cada uma das drogas vegetais foi de nove quilogramas, quantidade fracionada em embalagens unitárias de 1 Kg., embaladas em sacos plásticos providos de "air vents" permeáveis aos gases de óxido de etileno.

6.2 Processo de descontaminação

O equipamento empregado para os ciclos de descontaminação por óxido de etileno foi o esterilizador SERCON Ind. Com. Ap. Méd. Hosp. LTDA, modelo HS E 39/40 HETO 3000, com controle automático e câmara

cilíndrica horizontal de 76 litros de capacidade, 40 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade, adquirido com recurso de Projeto de Auxílio à Pesquisa, FAPESP (Processo nº 98/02343-0).

Foi adotado o método de esterilização conforme desenvolvido por Mc DONALD (MCDONALD, 1972), o qual consiste na em uma seqüência de etapas que inicia com a elevação da temperatura até valores próximos a 50^0C. Após a introdução do material a ser descontaminado e o subsequente fechamento da porta do equipamento, procedeu-seo aquecimento, obteve-se vácuo na câmara de –0,75 KgF/cm^2 e propiciou-se condições de umidificação (50-70% de umidade relativa). Procedeu-se então à introdução da mistura gasosa sob pressão positiva e concentração de 0,65 KgF/cm^2 e 600 mg/L, respectivamente. Os tempos de exposição aplicados foram de zero (quantidade de material não submetido a processo), 30 e 60 minutos. Ao final do ciclo, foi realizada a redução da pressão e eliminação dos gases através de três lavagens consecutivas com nitrogênio (OLIVEIRA, 2000).

6.3. Processo de aeração

A cada ciclo, após o término da exposição, aeração forçada e abertura do esterilizador, as drogas vegetais foram transferidas para área de aeração ambiental. As embalagens forma mantidas nesta sob temperatura ambiente e aeração forçada sob 25 trocas de ar por hora durante períodos de 1, 3, 7 e 14 dias consecutivos. Após cada um dos tempos de aeração, foi tomada uma amostra de cada uma das drogas vegetais para determinação de resíduos de óxido de etileno e seus derivados.

7. Análise de resíduos de Óxido de Etileno e seus derivados

7.1 Preparo das soluções padrão

7.1.1. Óxido de etileno

O padrão estoque utilizado foi fornecido pela Oxiteno do Brasil com teor de 0,579% (v/v) em água. Foram preparados padrões de trabalho, obtendo-se diluições seriadas a partir do padrão estoque.

7.1.2. Etilenoglicol

O Etilenoglicol utilizado como padrão estoque foi reagente padrão analítico fornecido pela MERCK S.A. Ind. Quim. com 99,5 % de pureza. Foram preparados padrões de trabalho, obtendo-se diluições seriadas a partir do padrão estoque.

7.1.3. Etilenocloroidrina

O Etilenocloroidrina utilizado como padrão estoque foi reagente padrão analítico fornecido pela FLUKA Prod. GmbH. com 99,9% de pureza. Foram preparados padrões de trabalho obtendo-se diluições seriadas a partir do padrão estoque.

7.2. Validação do método de extração de residuais de óxido de etileno e seus derivados.

Amostras de 10 gramas exatamente pesadas de cada droga vegetal foram acondicionadas individualmente em frasco Schott® de 500 mL de capacidade. Alíquotas de 1 mL dos padrões de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloroidrina nas concentrações de 1389,60 ppm, 2002,80 ppm e 1882,29 ppm respectivamente, foram adicionadas aos frascos, agitadas em agitador Vórtex por 1 minuto e deixadas em repouso por 6 horas. Paralelamente, seguindo a mesma metodologia realizou-se extrações "branco", ou seja sem a presença de óxido de etileno e seus derivados, para a verificação de interferentes inerentes à própria amostra vegetal.

O meio de extração de residuais de óxido de etileno adotado foi o descrito por Marlowe e colaboradores (MARLOWE E COLABORADORES, 1987), empregando como meio extrator a água destilada. A amostra de 10 gramas de cada droga vegetal previamente pesada foi mantida em contato

com 90 mL do meio extrator resultando na proporção 1:10 (m/v). Os frascos foram agitados por 10 minutos, e permaneceram sob repouso por 36 horas a temperatura ambiente. Alíquotas de 1mL do meio extrator foram colhidas em intervalos de 2 horas, sendo após cada coleta o mesmo volume reposto em água destilada, de forma a respeitar a proporção meio extrator/amostra.

7.3. Método de detecção de resíduos de óxido de etileno.

Amostras das embalagens representativas de cada uma das três réplicas (origens distintas) dos quatro diferentes tipos de drogas vegetais foram recolhidas e submetidas a análise qualitativa e quantitativa de resíduos do óxido de etileno e de seus derivados, etilenoglicol e etilenocloridrina, após intervalos de tempo de aeração de 1, 3, 7, e 14 dias.

A metodologia de extração e análise de resíduos foi fundamentada em literaturas existentes (LAO E COLABORADORES, 1995; MARLOWE E COLABORADORES, 1987, NIESINK E COLABORADORES, 1996).Para a análise de resíduos de óxido de etileno e seus derivados utilizou-se o Cromatógrafo à gás UNICAN Pró CG® disponível no laboratório, tendo sido utilizados os seguintes parâmetros: t emperaturas de 200°C, 120°C e 220°C para injetor, coluna e detector respectivamente; 3,5 mL/min de fluxo do gás de arraste. Os gases utilizados na alimentação da chama foram Ar sintético e Hidrogênio, enquanto como gás de arraste utilizou-se o Hélio, todos grau FID e fornecidos pela WHITE MARTINS Gases Ind. Os componentes da amostra foram separados por uma coluna cromatográfica RESTEK Rtx®-200, 30m x 0,32 mmID x 0,50 μm df, e reconhecidos por um detector FID (Flame Ionization Detector). Um computador acoplado ao cromatógrafo monitorou os resultados e registrou em gráficos denominados cromatogramas, em que a abscissa registra o tempo de retenção da amostra em minutos, enquanto a ordenada registra a resposta do detector em microvolts (mV). Paralelamente utilizou-se padrões externos de referência (NG, L. 1994) além de curvas de calibração para os mesmos.

Antes do início de cada período de trabalho foram analisados 3 pontos da curva de calibração à fim de verificar variações inerentes ao próprio Cromatógrafo a gás. Alíquotas de 1 μL de cada amostra coletada foram introduzidas no injetor com a utilização de microseringas, em triplicatas, e os resultados registrados em cromatogramas.

8. Análise da eficácia antimicrobiana do processo

Esta análise foi realizada feita pelo mesmo processo de contagem microbiana, conforme descrito anteriormente neste mesmo capítulo, objetivando determinação de carga microbiana (UFC/g) e pesquisa quanto à presença de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli* e demais microrganismos do grupo coliforme, e fungos do gênero *Aspergillus*.

9. Análise de alterações dos princípios ativos naturais

Para a determinação dos princípios ativos naturais (antes e após a exposição ao gás) foram adotados os métodos descritos na United States Pharmacopéia (USP) XXIV, e em artigos científicos relacionados. (SALVADORI E COLABORADORES, 1994). Excluiu-se deste ítem a Alcachofra, tendo em vista terem se esgotadas as substâncias químicas de referência, indispensáveis ao estudo, durante tentativas de doseamento dos marcadores. As dificuldades defrontadas com métodos não detalhados e imprecisos, embora sejam motivação adicional, impossibilitam a continuidade momentânea deste segmento do estudo, pela não disponibilidade de material no mercado nacional e impossibilidade de importação.

9.1. Camomila

<u>Conteúdo de apigenin-7-glucoside:</u>

Diluição do ácido fosfórico: 5,0 mL de ácido fosfórico foram transferidos para frasco volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água, diluiu-se em água até o volume e misturou-se.

Solução A: Uma solução 0,005 M de fosfato de potássio monobásico foi preparada. O pH foi ajustado até 2,55 ± 0,05 com ácido fosfórico.

Solução B: Preparou-se a mistura acetonitrila – metanol (65:35)

Fase móvel: Usar misturas variáveis da solução A e solução B conforme descrito abaixo.

Preparação do padrão: Dissolveu-se quantidades exata de USP 7-glicosil apigenina RS e 7-metoxi-cumarina em metanol, quantitativamente foi diluiu-se com a finalidade de obter uma solução contendo 25,0 μg de 7-glicosil apigenina RS e 10 μg de 7-metoxi-cumarina por mL.

Preparação da amostra: Transferiu-se cerca de 1,0 g de camomila, exatamente pesado, para um frasco acoplado a um condensador de refluxo; 80 mL de metanol foi adicionado e a mistura aquecida sob refluxo por 1 hora. Resfriou-se à temperatura ambiente, filtrou-se em papel de filtro e o filtrado foi coletado em frasco volumétrico de 100 mL. O frasco coletor foi enxaguado com 3 mL de metanol, filtrado e este adicionado ao frasco volumétrico. Diluiu-se em metanol até o volume e novamente filtrou-se. 25 mL da solução filtrada, transferida para um frasco rota-evaporador, 5,0 mL de solução de hidróxido de sódio foi adicionado (preparada dissolvendo 0,4 g do hidróxido de sódio em 5,0 mL de água). Aqueceu-se a mistura sob refluxo por 25 minutos. O frasco foi resfriado e o pH da solução foi ajustado com ácido clorídrico até 5,0-6,2. A solução foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 50 mL, diluida com metanol até o volume, homogeneizada e filtrada, descartando-se os primeiros 10 mL do filtrado.

Sistema cromatográfico: Sistema de cromatografia líquida equipada com um detector de 335 nm e uma coluna octadecilsilano (ODC) com 4 mm x 12,5 cm. A razão de fluxo foi de cerca de 1 mL por minuto. A variação da mistura entre solução A e solução B é 26% e permanece no nível por 3 minutos,

aumentando linearmente nos próximos 19 minutos, para 85%. Diminuiu linearmente nos 5 minutos seguintes até 26%, permanecendo neste nível até 3 minutos antes da próxima injeção. Fez-se os ajustes se necessários para obter tempo de retenção de cerca de 0,63 e 1,0 para 7-glicosil apigenina e 7-methoxi-cumarin, respectivamente. Injetou-se cerca de 15 μL da solução padrão e registrou-se os picos de resposta segundo *Procedimento* abaixo. O desvio padrão para réplicas de solução não excedeu 2,0%.

Procedimento: Separadamente injetou-se em iguais volumes (cerca de 15 μL) de cada solução padrão e solução teste no Cromatógrafo, e calculou-se de forma que a amostra não eluísse em menos de 6 vezes o tempo de retenção do apigenin-7-glucoside. Registrou-se os cromatogramas, mediu-se as respostas para todos os picos observados no cromatograma da amostra. Os tempos de retenção referentes são cerca de 0,30, 0,47, 0,66, 0,89 e 1,0 para apigenina-7-glucosideo, 7-methoxi-cumarina, apigenina, trans-spiroether e cis-spiroether respectivamente. Calculou-se a porcentagem de 7-glicosil apigenina na porção da camomila segundo a fórmula: $12(C/W)(r_u/r_s)$, onde C é a concentração, em mg/mL da USP 7-glicosil apigenina RS do padrão, W é o peso em gramas da Camomila na amostra, r_u e r_s são os picos de resposta obtidos na amostra e no padrão respectivamente: não menos que 0,3% deve ser encontrado. (USP XXV, 2001).

9.2. Ginkgo biloba

<u>Conteúdo de glicosídeos flavonóicos:</u>

Solvente de extração – 60% (v/v) de solução de acetona em água.

Solução de ácido clorídrico – 10,0 mL de ácido clorídrico em frasco volumétrico de 50 mL, diluído com água até o volume.

Fase móvel – Mistura de ácido cítrico (0,6 em 100), acetonitrila e álcool isopropílico (100:47:5).

Soluções padrão – Dissolveu-se quantidade exata de *USP Quercetina RS* em metanol para obter uma solução tendo uma quantidade conhecida de cerca de 0,8 mg/mL (Solução padrão estoque). Transferiu-se para três frascos volumétricos de 100 mL, transferiu-se 3,0 mL, 5,0 mL e 10, 0 mL da solução padrão estoque, adicionou-se 10 mL de água e 30 mL de solução de ác. clorídrico a cada frasco. Os conteúdos de cada frasco foram diluídos com metanol até o volume e misturados obtendo-se soluções padrões A, B e C tendo concentrações conhecidas de 0,024 mg, 0,04 mg e 0,08 mg por mL, repectivamente.

Solução teste: Transferiu-se cerca de 2,5 g de Ginkgo, finamente pulverizado e exatamente pesado, para um frasco apropriado para condensador de refluxo. Adicionou-se 50 mL de solvente de extração, e aqueceu-se em banho de água quente, sob refluxo, por 30 minutos. A solução foi resfriada, filtrada e coletada em frasco volumétrico de 100 mL. Em um segundo momento do resíduo do filtro, usando 40 mL de solvente de extração extraiu-se e coletou-se o filtrado no mesmo frasco volumétrico de 100 mL . Diluiu-se o conteúdo do frasco com solvente de extração até o volume, e homogeneizou-se. Evaporou-se 50,0 mL de solução até secagem e transferiu-se o resíduo para frasco volumétrico de 50 mL com a adição de 30 mL de metanol. Adicionou-se 4,4 mL de solução de ác. clorídrico, diluiu-se com água até volume, misturou-se e centrifugou-se. Transferiu-se 10,0 mL do sobrenadante para um vial de vidro âmbar, e fechando-se o vial com uma rolha seladora e uma capa de alumínio. Aqueceu-se em água fervente por 25 minutos, e resfriou-se a temperatura ambiente.

Sistema cromatográfico: Sistema de cromatografia líquida equipada com um detector de 370 nm e uma coluna octadecilsilano (ODC) com 4,6 mm x 12,5 cm. A razão de fluxo é de cerca de 1,5 mL por minuto. A solução cromatográfica padrão A e registro da resposta dos picos foram conforme descrito em *Procedimento,* abaixo, o desvio padrão para réplicas de solução não deve ser mais de 2,0%.

Procedimento: Separadamente injetou-se em iguais volumes (cerca de 10 μL) de cada solução padrão e a solução teste no Cromatógrafo, registrou-se os cromatogramas, mediu-se as áreas das respostas para o maior pico e somou-se as áreas de todos os maiores picos que são os esperados para Quercetina, Canferol e Iso-ramnetina no cromatograma da solução teste. O tempo de retenção relativo dos flavonóides glicosilados de interesse são cerca de 1,0 para Quercetina, 1,6 para Canferol e 1,7 para Iso-ramnetina (Iso-ramnetina algumas vezes coelui com Canferol). Plotou-se as áreas de respostas do maior pico de soluções padrão versus concentração, em mg por mL, de *USP Quercetina RS* e desenhou-se a linha reta mais apropriada dos três pontos plotados. A partir dos gráficos obtidos, determinou-se a concentração, em mg por mL, de flavonóides glicosilados na solução teste. Multiplicou-se os valores obtidos por um fator de massa molecular de 2,514 e calculou-se a porcentagem de flavonóides glicosilados, como 3-O-(2-O-[6-O-{p-hydroxi-trans-cinnamoyl}-β-D-glycosyl]-α-L-rhamnosyl)quercetin, com uma massa molecular de 756,7: não menos que 0,8% de flavonóides glicosilados encontrados. (USP XXV, 2001).

9.3. Guaraná

Conteúdo de cafeína:

Tampão acetato pH 3,5: Adicionar 6,4 L de acetato de sódio anidro 2 mol/L em 93,6 mL de ácido acético 2 mol/L.

Reagente de Carrez 1 – Dissolveu-se 21,9 g de acetato de zinco dihidratado em água, adicionou-se 3 mL de ácido acético glacial e diluiu-se para 100 mL com água.

Reagente de Carrez 2 - Dissolveu-se 10,6 g de ferrocianido de potássio em água, completou-se para 100 mL.

Solução padrão de cafeína: 0,1% (p/v) em solução 0,4% de hidróxido de potássio.

Solução teste: O método adotado de extração foi descrito por Hatfull e colaboradores. Para um frasco do 250 mL adicionou-se 0,25 g de guaraná pulverizado e 30 mL de água. Aqueceu-se a mistura a 80 °C sob de refluxo por 1 hora. Resfriou-se a temperatura ambiente. Após clarificação com 0,25 mL de cada reagente de Carrez (1 e 2), a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para frasco volumétrico de 100 mL, e completado até o volume com água.

Sistema cromatográfico: Sistema de cromatografia líquida equipada com um detector de 267 nm e uma coluna octadecilsilano (ODC) com 4 mm x 125 mm. A razão de fluxo foi de cerca de 1 mL por minuto. A coluna foi mantida a uma temperatura abaixo de 35°C durante toda a análise.

Procedimento: Injetou-se uma alíquota de 10 μL no sistema de HPLC em triplicata. (SALVADORI E COLABORADORES, 1994)

9.4 Validação de metodologia de análise de determinação das alterações dos princípios ativos naturais por HPLC (Resolução ANVS 84/2002) (BRASIL LEIS E DECRETOS, 2002).

9.4.1. Determinação da linearidade

A concentração do marcador foi determinada por uma análise exploratória utilizando-se o padrão analítico específico, este ponto foi definido como o teor 100%.

Foram preparadas diluições do padrão segundo a metodologia específica para cada droga vegetal tendo como base os valores de 70, 85, 100, 115, 130%. (USP XXV, 2001)

Na construção da curva cada ponto foi injetado no sistema em triplicata. O coeficiente de correlação linear (r^2) para a reta obtida com estes pontos deve ser maior ou superior à 0,99. (USP XXV, 2001)

9.4.2. Determinação da Exatidão e Precisão

Por se tratarem de drogas vegetais e estas não possuirem excipientes foram elaboradas amostras simuladas conforme segue:

Foi realizada uma extração da droga vegetal e em balão volumétrico de 10 mL acrescentou-se 5 mL de extrato e 5 mL da solução padrão previamente preparada para a realização da determinação da linearidade nas concentrações de 70% (concentração baixa), 100% (concentração média) e 130% (concentração alta) (Brasil leis e decretos, 2002). Paralelamente foi preparada uma amostra de 100% de extrato vegetal, utilizada como branco.

Cada ponto foi injetado no sistema em triplicata. O desvio padrão relativo entre as injeções deve ser menor que 15% (BRASIL LEIS E DECRETOS, 2002).

Resultados

V – RESULTADOS

Observa-se, nas tabelas 01 a 04, informações disponibilizadas pelos fornecedores B e C das drogas vegetais. Apesar das tentativas de contato e convencimento junto ao fornecedor A, no sentido de preencher a lacuna observada nestas tabelas, não se obteve resposta. Ainda a tabela 05 decorre da forma como os fornecedores disponibilizam os materiais, desta feita com foco no material de embalagem dos mesmos.

Prosseguindo, observa-se nas tabelas 06 a 09 e figuras 01 a 04 observações macroscópicas das distintas drogas vegetais, permitindo fácil comparação com a descrição apresentada nas Farmacopéias Brasileira 3ª edição e XXV edição. Na tabela 10, visualiza-se ainda o aspecto de natureza macroscópica, evidenciando os materiais estranhos de diferentes naturezas que contaminavam as drogas vegetais, conforme obtidas.

Aspectos microbiológicos, abrangendo validações metodológicas, determinações quantitativas de bactérias e fungos e qualitativas de indicadores patogênicos, nas diferentes espécies e origens de drogas vegetais, são apresentados nas tabelas 11 a 31.

Apresentação de dados relativos a determinação de umidade relativa apresentam-se dispostos nas tabelas 32 a 35.

Na continuidade, tabelas de 36 a 47 apresentam aspectos de validação e resultados obtidos quanto à determinação, por cromatografia gasosa, de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina. Também as figuras 05 a 11, ilustram dados de validação e determinação de tais resíduos.

Por fim, podemos observar nas tabelas 48 a 50 bem como nas figuras 12 a 14 os resultados referentes às análises de alterações dos princípios ativos naturais das drogas vegetais estudadas.

Tabela 01: Características constantes nos certificados de análise de Alcachofra (*Cynara scolimus* L.) enviados pelos Fornecedores A, B e C.

	Fornecedor		
	A	B	C
Nome científico	Fornecedor não encaminhou o laudo de análise	*Cynara scolimus L.*	*Cynara scolimus*
Ident. botânica		*Cynara scolimus L.*	##
Parte utilizada		Folha	Folha
Validade		08/2004	02/2004
Colheita		08/2001	02/2001
Modo secagem		Estufa	##
Origem		Brasil	Brasil
Lote		ALC02/01	002/02
Características organolépticas		Coloração esverdeada, sabor e odor característicos	Característicos
Identificação Macro e microscópica		Característica	Característica
Testes de pureza e interidade		Umidade 13,5% Cinzas totais 11,8% Cinzas insolúveis 3,6% Matéria estranha: ausente	##
Análise de princípios ativos		Teste positivivo para flavonóides	##
Metais pesados		Menos de 10 ppm em chumbo	##
Esterilização/ descontaminação		Não houve	Não houve
Pesquisa de contaminantes microbiológicos		Não realizado	##

Não consta no certificado

Tabela 02: Características constantes nos laudos de análise de Camomila (Matricaria recutita L.) enviados pelos Fornecedores A, B e C.

	Fornecedor		
	A	B	C
Nome científico	Fornecedor não encaminhou o laudo de análise	*Matricaria recutita* L.	*Matricaria recutita* L.
Ident. botânica		*Matricaria recutita* L.	##
Parte utilizada		Flor	Flor
Validade		08/2004	05/2003
Colheita		08/2001	05/2001
Modo secagem		À sombra	##
Origem		Brasil	Sul do Brasil
Lote		CAMF01/01	002/02
Características organolépticas		Coloração parda escura, amarelada, sabor e odor aromáticos característicos	Característicos
Identificação Macro e microscópica		Característicos	Característicos
Testes de pureza e interidade		Umidade 10,0% Cinzas totais 8,2%% Cinzas insolúveis 0,5%% Matéria estranha: ausente	##
Análise de princípios ativos		Teste positivivo para flavonóides Teor de óleo volátil 1,6%	##
Metais pesados		Menos de 10 ppm em chumbo	##
Esterilização/ descontaminação		Não houve	Não houve
Pesquisa de contaminantes microbiológicos		Não realizado	##

Não consta no certificado

Tabela 03: Características constantes nos laudos de análise de Ginkgo biloba (Ginkgo biloba L.) enviados pelos Fornecedores A, B e C.

	Fornecedor		
	A	B	C
Nome científico	Fornecedor não encaminhou o laudo de análise	*Ginkgo biloba* L.	*Ginkgo biloba* L.
Ident. botânica		*Ginkgo biloba* L.	##
Parte utilizada		Folha	Folha
Validade		07/2004	07/2002
Colheita		07/2001	07/2000
Modo secagem		Estufa	##
Origem		Alemanha	China
Lote		GINK03/01	002/02
Características organolépticas		Coloração pardo esverdeado, sabor e odor característicos	Característicos
Identificação Macro e microscópica		Característicos	Característicos
Testes de pureza e interidade		Umidade 7,1% Cinzas totais 8,7% Cinzas insolúveis 1,3%% Matéria estranha: 1,0%	##
Análise de princípios ativos		Teor de glicosídeos flavônicos 0,6%	##
Metais pesados		Menos de 10 ppm em chumbo	##
Esterilização/ descontaminação		Não houve	Não houve
Pesquisa de contaminantes microbiológicos		Não realizado	##

Não consta no certificado

Tabela 04: Características constantes nos laudos de análise de Guaraná (Paulinia cupana H.B.K.) enviados pelos Fornecedores A, B e C.

	Fornecedor		
	A	B	C
Nome científico	Fornecedor não encaminhou o laudo de análise	*Paulinia cupana* H.B.K.	*Paulinia cupana*
Ident. botânica		*Paulinia cupana* H.B.K.	##
Parte utilizada		Semente	Semente
Validade		05/2004	07/2003
Colheita		05/2001	07/2001
Modo secagem		Forno com aquecimento	##
Origem		Brasil	Brasil
Lote		GUAR05/01	146/07
Características organolépticas		Coloração pardo avermelhado, sabor e odor característicos.	Característico
Identificação Macro e microscópica		Característicos	Característico
Testes de pureza e integridade		Umidade 11,8% Cinzas totais 1,0% Cinzas insolúveis 0,3% Matéria estranha: ausente	##
Análise de princípios ativos		Teste positivo para alcalóides Teor de cafeína 3,8%	##
Metais pesados		Menos de 10 ppm de Chumbo	##
Esterilização/ descontaminação		Não houve	Não Houve
Pesquisa de contaminantes microbiológicos		Não realizado	##

Não consta no certificado

Tabela 05: Descrição do material de embalagem das amostras conforme recebidas dos fornecedores A, B, C

Fornecedor	Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	Camomila (*Maticaria recutita* L.)	Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)
A	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.
B	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.
C	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de polietileno envolta em um saco de ráfia.	Embalagem de ráfia.

Tabela 06: Descrição macroscópica das amostras de alcachofra (*Cynara scolimus* L.) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C.

Conforme Farmacopéia Brasileira 3ª ed.	Fornecedores		
	A	B	C
Folha cujo tamanho atinge mais de 1 m de comprimento, pina partida, com segmentos irregularmente partidos, de contorno geral lanceolado; a página superior é verde escura e a inferior, veludosa e esbranquiçada.	Folhas secas inteiriças, com comprimento de cerca de um metro com espinhos curtos e contorno irregular. Coloração verde escuro acinzentado, um pouco mais claro na base que apresenta-se veludosa e esbranquiçada	Folhas secas fragmentadas em cerca de 0,3 cm. Coloração verde escuro e algumas partes com aparência veludosa e esbranquiçada.	Folhas secas fragmentadas em cerca de 1 cm. Coloração verde folha e algumas partes com aparência veludosa e esbranquiçada

Tabela 07: Descrição macroscópica das amostras de camomila (*Matricaria recutita* L.) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C.

Conforme USP XXV	Fornecedores		
	A	B	C
Cabeça da flor hemisférica, com cerca de 6 mm de diâmetro, composta de pequenas e numerosos discos florais, envolta por um receptáculo verde. As pétalas são amarelas, de cerca de 2mm de comprimento.	Flores secas com cabeça hemisférica de cerca de 5 mm de diâmetro, com invólucro verde, numerosas pétalas amarelas claras. Pecíolos florais de em média 1,0 cm.	Flores secas com cabeça hemisférica de cerca de 5 mm de diâmetro, com invólucro verde, numerosas pétalas amarelas claras. Pecíolos florais de em média 1,0 cm.	Flores secas com cabeça Hemisférica de cerca de 5 mm de diâmetro, com invólucro verde, pétalas amarelas claras. Pecíolos florais de em média 1,8 cm.

Tabela 08: Descrição macroscópica das amostras de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C.

Conforme USP XXV	Fornecedores		
	A	B	C
Folhas com ou sem Pecíolos, variando de coloração verde kakí à marrom esverdeado. A largura das folhas variam de 2 a 12 cm e a altura de 2 a 9,5 cm, freqüentemente 1,5 a 2 vezes mais largo que longo. Margens são côncavas, sinuosas e truncadas centralmente. O Tamanho do Pecíolo varia de 2 a 8 cm.	Folhas secas inteiras ou levemente fragmentadas, de coloração verde kakí e dimensões médias de 8 cm de comprimento e 5 cm de largura. A margem da folha é côncava truncada no centro. Presença de Pecíolo de cerca de 6 cm.	Folhas secas inteiras ou levemente fragmentadas, de coloração marrom esverdeado e dimensões médias de 9 cm de comprimento e 6 cm de largura. A margem da folha é côncava truncada no centro. Presença de Pecíolo de cerca de 5 cm.	Folhas secas inteiras ou levemente fragmentadas, de coloração marrom esverdeado e dimensões médias de 8 cm de comprimento e 5 cm de largura. A margem da folha é côncava truncada no centro. Presença de Pecíolo de cerca de 5 cm.

Tabela 09: Descrição macroscópica das amostras de guaraná (*Paullinia cupana H.B.K.*) no material conforme recebido dos fornecedores A, B e C.

Conforme Farmacopéia Brasileira 3ª ed.	Fornecedores		
	A	B	C
Frutos com o comprimento de 0,6 a 0,8 cm. São pequenas cápsulas com pedúnculo longo. Esferoidais quando há uma semente apenas. O manto seminar a reveste quase totalmente Este é o arilo, que é branco, tornando o fruto parecido com uma castanha. Tem o peso médio de 0,5 g.	Frutos de cápsula com tamanhos irregulares variando de 0,2 cm a 0,8 cm de comprimento alguns esferoidais, outros não. Presença de manto seminal revestindo parte da cápsula. Em alguns observou-se internamente a formação de mais de um fruto. Peso médio de amostragem de 20 sementes é 0,57 g.	Frutos de cápsula de em média 1 cm de comprimento alguns esferoidais, outros não. Presença de manto seminal revestindo parte da cápsula. Em alguns observou-se internamente a formação de mais de um fruto. Peso médio de amostragem de 20 sementes é 0,70 g.	Frutos de cápsula com tamanhos irregulares variando de 0,2 cm a 0,8 cm de comprimento alguns esferoidais, outros não. Presença de manto seminal revestindo parte da cápsula. Em alguns observou-se internamente a formação de mais de um fruto. Peso médio de amostragem de 20 sementes é 0,62 g.

Tabela 10: Descrição de material estranho encontrados nas amostras de drogas vegetais recebidas dos fornecedores A, B, C

Fornecedor	Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	Camomila (*Maticaria recutita* L.)	Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)
A	Ausência de materiais estranhos	Ausência de materiais estranhos	Cascas cítricas e material mineral (pedras).	Ausência de materiais estranhos
B	Ausência de materiais estranhos	Ausência de materiais estranhos	Material mineral (pedras)	Material animal (insetos)
C	Ausência de materiais estranhos	Ausência de materiais estranhos	Ausência de materiais estranhos	Ausência de materiais estranhos

Tabela 11: Dados obtidos na validação da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente à Alcachofra (*Cynara scolimus* L.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $5,1x10^6$ UFC/g.

Inóculo Interno	Inóculo Padronizado*	Contagem total recuperada*
Escherichia coli	$6,8x10^3$	$2,2x10^7$
Pseudomonas aeruginosa	$1,7x10^3$	$1,7x10^7$
Salmonella sp.	$4,7x10^3$	$2,2x10^7$
Staphylococcus aureus	$3,3x10^3$	$3,1x10^7$

(*) Média dos resultados obtidos apartir de três réplicas

Tabela 12: Dados obtidos na validação da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente à Camomila (*Matricaria recutita* L.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $7,2x10^4$ UFC/g.

Inóculo Interno	Inóculo Padronizado*	Contagem total recuperada*
Escherichia coli	$6,8x10^3$	$2,4x10^5$
Pseudomonas aeruginosa	$1,7x10^3$	$3,7x10^4$
Salmonella sp.	$4,7x10^3$	$2,3x10^5$
Staphylococcus aureus	$3,3x10^3$	$1,0x10^5$

(*) Média dos resultados obtidos apartir de três réplicas

Tabela 13: Dados obtidos na validação técnica da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente ao Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $5,4x10^3$ UFC/g.

Inóculo Interno	Inóculo Padronizado*	Contagem total recuperada*
Escherichia coli	$6,8x10^3$	$1,6x10^5$
Pseudomonas aeruginosa	$1,7x10^3$	$3,6x10^4$
Salmonella sp.	$4,7x10^3$	$5,9x10^4$
Staphylococcus aureus	$3,3x10^3$	$7,8x10^4$

(*) Média dos resultados obtidos apartir de três réplicas

Tabela 14: Dados obtidos na validação técnica da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno, referente ao Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.), proveniente do fornecedor B, com biocarga original de $4,5x10^4$ UFC/g.

Inóculo Interno	Inóculo Padronizado*	Contagem total recuperada*
Escherichia coli	$6,8x10^3$	$2,9x10^5$
Pseudomonas aeruginosa	$1,7x10^3$	$1,3x10^5$
Salmonella sp.	$4,7x10^3$	$6,6x10^4$
Staphylococcus aureus	$3,3x10^3$	$8,9x10^4$

(*) Média dos resultados obtidos apartir de três réplicas

Tabela 15: Dados obtidos na validação técnica da metodologia de contagem de microrganismos, com inóculo interno de 6,1 x 10^2 UFC/g de Aspergillus *flavus*, nas drogas vegetais provenientes do fornecedor B.

Droga vegetal	Biocarga original	Contagem total recuperada*
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$5,3x10^3$	$6,5x10^5$
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$4,5x10^2$	$1,2x10^3$
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$5,8x10^2$	$9,8x10^3$
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$5,8x10^3$	$4,6x10^4$

(*) Média dos resultados obtidos apartir de três réplicas

Tabela 16 – Resultados obtidos na determinação de contaminação bacteriana*, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), não submetidos a processos de descontaminação.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$7,8x10^7$	$5,1x10^6$	$5,1x10^5$
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$4,8x10^4$	$7,2x10^4$	$3,8x10^4$
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$1,0\ x10^4$	$5,4x10^3$	$1,0x10^4$
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$5,9x10^6$	$4,5x10^4$	$7,8x10^5$

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 17 - Resultados obtidos na determinação de contaminação fúngica*, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), não submetidos a processos de descontaminação.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$7,0x10^2$	$5,3x10^3$	$2,7x10^2$
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$3,9x10^3$	$4,5x10^2$	$4,3x10^4$
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$4,4x10^3$	$5,8x10^2$	$1,2x10^3$
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$2,3x10^4$	$5,9x10^3$	$2,1x10^5$

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 18: Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de alcachofra (*Cynara scolimus* L.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C).

Pesquisa de	Testes de Confirmação	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado e % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar Mc Conkey	(+) / (+) / (+)	Presença, 100%
	Ágar eosina azul de Metileno	(+) / (+) / (+)	
	Coloração de Gram	BGN / BGN / BGN	
	Ágar Tríplice açúcar - ferro	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Indol	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Vermelho de Metila	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Voges Proskauer	(+) / (+) / (+)	
	Citrato como única fonte de carbono	(+) / (+) / (+)	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(+) / (+) / (+)	Presença, 100%
	Coloração de Gram	BGN / BGN / BGN	
	Produção de Fluoresceína	(+) / (+) / (+)	
	Produção de Piocianina	(+) / (+) / (+)	
	Citocromo-oxidase	(+) / (+) / (+)	
	Crescimento a 41°C	(+) / (+) / (+)	
Salmonella sp	**Meio de Diferenciação Ágar Verde Brilhante**	(+) / (+) / (+)	Ausência, 100%
	Meio de Diferenciação Ágar Sulfito de Bismuto	(+) / (+) / (+)	
	Meio de Diferenciação Ágar Xilose, Lisina e Desoxicolato	(+) / (+) / (+)	
	Coloração de Gram	BGP / BGN / BGN	
	Ágar Tríplice açúcar ferro	(-) / (-) / (-)	
	Lisina Descarboxilase	(-) / (+) / (+)	
	Citrato como única fonte de carbono	(+) / (+) / (-)	
	Urease	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	Ausência, 100%
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Coagulase	NA / NA / NA	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / NA	

(+) Crescimento típico — BGN-Bacilo Gram negativo — CGP – Coco Gram positivo
NA – Não aplicável
(-) Crescimento atípico — BGP – Bacilo Gram positivo — CGN – Coco Gram ngativo

Tabela 19: Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de camomila (*Matricaria recutita* L.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C).

Pesquisa de	Testes de Confirmação	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado e % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar Mc Conkey	(+) / (+) / (+)	Presença, 100%
	Ágar eosina azul de Metileno	(+) / (+) / (+)	
	Coloração de Gram	BGN / BGN / BGN	
	Ágar Tríplice açúcar – ferro	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Indol	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Vermelho de Metila	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Voges Proskauer	(+) / (+) / (+)	
	Citrato como única fonte de carbono	(+) / (+) / (+)	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(+) / (-) / (+)	Presença fornecedores A e C, 66,67%
	Coloração de Gram	BGN / NA / BGN	
	Produção de Fluoresceína	(+) / (NA) / (+)	
	Produção de Piocianina	(+) / (NA) / (+)	
	Citocromo-oxidase	(+) / (NA) / (+)	
	Crescimento a 41°C	(+) / (NA) / (+)	
Salmonella sp	**Meio de Diferenciação Ágar Verde Brilhante**	(-) / (-) / (+)	Ausência, 100%
	Meio de Diferenciação Ágar Sulfito de Bismuto	(-) / (+) / (+)	
	Meio de Diferenciação Ágar Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (+)	
	Coloração de Gram	NA / NA / BGN	
	Ágar Tríplice açúcar ferro	(NA) / (NA) / (+)	
	Lisina Descarboxilase	(NA) / (NA) / (+)	
	Citrato como única fonte de carbono	(NA) / (NA) / (-)	
	Uréase	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(+) / (+) / (+)	Ausência, 100%
	Coloração de Gram	CGP / CGP / CGP	
	Coagulase	(-) / (-) / (-)	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / NA	

(+) Crescimento típico — BGN-Bacilo Gram negativo — CGP – Coco Gram positivo
NA – Não aplicável
(-) Crescimento atípico — BGP – Bacilo Gram positivo — CGN – Coco Gram ngativo

Tabela 20: Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C).

Pesquisa de	Testes de Confirmação	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado e % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar Mc Conkey	(-) / (+) / (+)	Ausência, 100%
	Ágar eosina azul de Metileno	(NA) / (-) / (-)	
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Ágar Tríplice açúcar – ferro	NA / NA / NA	
	Teste de Indol	NA / NA / NA	
	Teste de Vermelho de Metila	NA / NA / NA	
	Teste de Voges Proskauer	NA / NA / NA	
	Citrato como única fonte de carbono	NA / NA / NA	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(-) / (+) / (+)	Presença fornecedores B e C, 66,67%
	Coloração de Gram	NA / BGN / BGN	
	Produção de Fluoresceína	(NA) / (+) / (+)	
	Produção de Piocianina	(NA) / (+) / (+)	
	Citocromo-oxidase	(NA) / (+) / (+)	
	Crescimento a 41°C	(NA) / (+) / (+)	
Salmonella sp	**Meio de Diferenciação Ágar Verde Brilhante**	(-) / (-) / (-)	Ausência, 100%
	Meio de Diferenciação Ágar Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	
	Meio de Diferenciação Ágar Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Ágar Tríplice açúcar ferro	NA / NA / NA	
	Lisina Descarboxilase	NA / NA / NA	
	Citrato como única fonte de carbono	NA / NA / NA	
	Uréase	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(+) / (-) / (+)	Ausência, 100%
	Coloração de Gram	CGP / NA / CGP	
	Coagulase	(-) / (NA) / (-)	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / NA	

(+) Crescimento típico — BGN-Bacilo Gram negativo — CGP – Coco Gram positivo
NA – Não aplicável

(-) Crescimento atípico — BGP – Bacilo Gram positivo — CGN – Coco Gram ngativo

Tabela 21: Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados da amostra de guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.) proveniente dos três fornecedores (A / B / C).

Pesquisa de	Testes de Confirmação	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado e % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar Mc Conkey	(+) / (+) / (+)	Presença, 100%
	Ágar eosina azul de Metileno	(+) / (+) / (+)	
	Coloração de Gram	BGN / BGN / BGN	
	Ágar Tríplice açúcar - ferro	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Indol	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Vermelho de Metila	(+) / (+) / (+)	
	Teste de Voges Proskauer	(+) / (+) / (+)	
	Citrato como única fonte de carbono	(+) / (+) / (+)	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(+) / (+) / (+)	Presença, 100%
	Coloração de Gram	BGN / BGN / BGN	
	Produção de Fluoresceína	(+) / (+) / (+)	
	Produção de Piocianina	(+) / (+) / (+)	
	Citocromo-oxidase	(+) / (+) / (+)	
	Crescimento a 41°C	(+) / (+) / (+)	
Salmonella sp	**Meio de Diferenciação Ágar Verde Brilhante**	(-) / (-) / (-)	Ausência, 100%
	Meio de Diferenciação Ágar Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	
	Meio de Diferenciação Ágar Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Ágar Tríplice açúcar ferro	NA / NA / NA	
	Lisina Descarboxilase	NA / NA / NA	
	Citrato como única fonte de carbono	NA / NA / NA	
	Urease	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	Ausência, 100%
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Coagulase	NA / NA / NA	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / NA	

(+) Crescimento típico — BGN-Bacilo Gram negativo — CGP – Coco Gram positivo
NA – Não aplicável

(-) Crescimento atípico — BGP – Bacilo Gram positivo — CGN – Coco Gram ngativo

Tabela 22 – Resultados obtidos na determinação de contaminação bacteriana*, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno. Tempo de exposição de 30 minutos.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$8,0x10^3$	$1,2x10^2$	$1,0x10^3$
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$5,6x10^2$	$4,8x10^2$	<10
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$3,7x10^2$	$1,0x10^2$	$1,0x10^2$
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$7,5x10^2$	<10	5,0x10

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 23 - Resultados obtidos na determinação de contaminação fúngica*, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação po óxido de etileno. Tempo de exposição de 30 minutos.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$3,5x10^2$	$3,6x10^3$	$2,8x10^2$
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	<10	<10	<10
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$1,2x10^2$	<10	<10
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$3,4x10^2$	1,2x10	$7,8x10^2$

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 24 – Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação bacteriana*, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 30 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo.

Droga vegetal	Fornecedor A			Fornecedor B			Fornecedor C		
	Antes da desconta -minação	Após ciclo 30 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 30 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 30 min	% redução
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$7,8x10^7$	$8,0x10^3$	99,99%	$5,1x10^6$	$1,2x10^2$	99,99%	$5,1x10^5$	$1,0x10^3$	99,80%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$4,8x10^4$	$5,6x10^2$	99,82%	$7,2x10^4$	$4,8x10^2$	99,33%	$3,8x10^4$	<10	99,99%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$1,0 x10^4$	$3,7x10^2$	96,30%	$5,4x10^3$	$1,0x10^2$	98,15%	$1,0x10^4$	$1,0x10^2$	99,00%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$5,9x10^6$	$7,5x10^2$	99,98%	$4,5x10^4$	<10	99,99%	$7,8x10^5$	5,0x10	99,99%

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 25 – Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação fúngica*, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 30 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo.

Droga vegetal	Fornecedor A			Fornecedor B			Fornecedor C		
	Antes da desconta -minação	Após ciclo 30 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 30 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 30 min	% redução
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$7,0x10^2$	$3,5x10^2$	50,00%	$5,3x10^3$	$3,6x10^3$	32,07%	$2,7x10^2$	$2,8x10^2$	0,00%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$3,9x10^3$	<10	99,97%	$4,5x10^2$	<10	99,77%	$4,3x10^4$	<10	99,99%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$4,4x10^3$	$1,2x10^2$	97,27%	$5,8x10^2$	<10	99,82%	$1,2x10^3$	<10	99,99%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$2,3x10^4$	$3,4x10^2$	98,52%	$5,9x10^3$	1,2x10	99,97%	$2,1x10^5$	$7,8x10^2$	99,62%

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 26: Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B e C) submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno com tempo de exposição de 30 minutos.

	Pesquisa de	Meios de Diferenciação	Resultados	
			Amostra Fornecedores A/B/C	Controle (+)
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)

Tabela 27 – Resultados obtidos na determinação de contaminação bacteriana*, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno. Tempo de exposição de 60 minutos.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	<10	<10	<10
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	<10	<10	<10
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	<10	<10	<10
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	<10	<10	<10

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 28 - Resultados obtidos na determinação de contaminação fúngica*, expressa como unidades formadoras de colônias (UFC), em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B, e C), submetidos a processo de descontaminação po óxido de etileno. Tempo de exposição de 60 minutos.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	<10	<10	<10
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	<10	<10	<10
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	<10	<10	<10
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	<10	<10	<10

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 29 – Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação bacteriana*, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 60 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo.

Droga vegetal	Fornecedor A			Fornecedor B			Fornecedor C		
	Antes da desconta -minação	Após ciclo 60 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 60 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 60 min	% redução
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$7,8x10^7$	<10	99,99%	$5,1x10^6$	<10	99,99%	$5,1x10^5$	<10	99,99%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$4,8x10^4$	<10	99,97%	$7,2x10^4$	<10	99,98%	$3,8x10^4$	<10	99,97%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$1,0 x10^4$	<10	99,90%	$5,4x10^3$	<10	99,81%	$1,0x10^4$	<10	99,90%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$5,9x10^6$	<10	99,99%	$4,5x10^4$	<10	99,97%	$7,8x10^5$	<10	99,99%

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 30 – Resultados comparativos obtidos na determinação de contaminação fúngica*, expressos como unidades formadoras de colônias (UFC), entre drogas vegetais provenientes dos três fornecedores (A, B, e C) não submetidas a processos de descontaminação e após ciclo de exposição ao óxido de etileno de 60 minutos, bem como a % de redução microbiana decorrente do ciclo.

Droga vegetal	Fornecedor A			Fornecedor B			Fornecedor C		
	Antes da desconta -minação	Após ciclo 60 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 60 min	% redução	Antes da desconta -minação	Após ciclo 60 min	% redução
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	$7,0x10^2$	<10	98,57%	$5,3x10^3$	<10	99,81%	$2,7x10^2$	<10	96,29%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	$3,9x10^3$	<10	99,74%	$4,5x10^2$	<10	97,77%	$4,3x10^4$	<10	99,97%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	$4,4x10^3$	<10	99,77%	$5,8x10^2$	<10	98,27%	$1,2x10^3$	<10	99,16%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	$2,3x10^4$	<10	99,95%	$5,9x10^3$	<10	99,83%	$2,1x10^5$	<10	99,99%

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três réplicas

Tabela 31: Resultados obtidos na identificação de contaminantes microbianos isolados em drogas vegetais obtidas de três fornecedores (A, B e C) submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno com tempo de exposição de 60 minutos.

	Pesquisa de	Meios de Diferenciação	Resultados	
			Amostra Fornecedores A/B/C	Controle (+)
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	*E. coli*	Mac Conckey	(-) / (-) / (-)	(+)
	P.aeruginosa	Cetrimida	(-) / (-) / (-)	(+)
	Salmonella sp	Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	(+)
		Sulfito de Bismuto	(-) / (-) / (-)	(+)
		Xilose, Lisina e Desoxicolato	(-) / (-) / (-)	(+)
	S.aureus	Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	(+)

Tabela 32 – Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais antes do processo de Pré – umidificação segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição*.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	12,345%	13,397%	6,042%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	9,875%	10,068%	10,328%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	10,180%	10,020%	9,945%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	10,072%	11,782%	10,909%

(*) 105°C/ 5 horas

Tabela 33 – Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais após o processo de Pré – umidificação (30°C / 50-70% UR / 48 horas) segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição*.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	15,780%	17,524%	14,632%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	13,651%	12,635%	12,365%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	12,631%	11,235%	13,265%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	13,258%	13,102%	12,923%

(*) 105°C/ 5 horas

Tabela 34 – Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais após processo de descontaminação de por óxido de etileno, ciclo de 30 minutos de exposição, segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição*.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	11,678%	12,002%	5,998%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	8,997%	11,003%	9,002%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	9,883%	8,121%	10,003%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	9,236%	10,001%	9,053%

(*) 105°C/ 5 horas

Tabela 35 – Resultados obtidos na determinação de Umidade Relativa nas Drogas Vegetais após processo de descontaminação de por óxido de etileno, ciclo de 60 minutos de exposição, segundo especificações da Farmacopéia Brasileira 4ª edição*.

Droga vegetal	Fornecedor A	Fornecedor B	Fornecedor C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	12,553%	13,852%	10,993%
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	10,980%	10,873%	11,623%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	10,005%	9,993%	12,373%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	11,053%	12,003%	10,879%

(*) 105°C/ 5 horas

Tabela 36:Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)

Tempo de extração (horas)	Amostra(Matriz+adição de EtO, EtCl e EtGl) Concentração (ppm) (A)			Amostras (matriz) Concentração (ppm) (B)			Concentração calculada do diferencial (A) – (B) (ppm)		
	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	EtO	EtCl	EtGl
2	37,90	18,63	39,31	0,00	28,98	0,00	37,90	0,00	39,31
4	45,83	144,26	0,00	3,33	50,47	0,00	42,50	93,78	0,00
6	15,49	251,75	74,35	5,69	102,81	13,48	9,80	148,94	60,87
8	96,52	196,83	141,84	8,10	110,90	67,98	88,42	85,93	73,86
10	92,97	253,93	173,39	4,13	115,33	108,38	88,84	138,60	65,01
12	93,24	454,57	163,32	3,47	219,64	131,46	89,78	234,93	31,86
14	96,36	217,14	148,75	10,90	215,95	94,81	85,46	1,19	53,95
16	71,84	177,19	204,38	7,46	248,26	79,73	64,38	0,00	124,65
18	60,87	270,97	124,37	11,35	230,31	100,23	49,52	40,66	24,14
20	44,24	390,32	231,00	19,21	255,41	113,43	25,02	134,91	117,58
22	72,15	312,51	240,21	24,40	206,50	116,74	47,75	106,00	123,47
24	45,90	304,35	47,61	22,21	230,00	117,77	23,69	74,35	0,00
26	41,72	175,38	53,50	21,04	224,40	102,30	20,68	0,00	0,00
28	69,40	198,52	104,75	22,60	243,40	129,00	46,80	0,00	0,00
30	21,02	131,78	44,59	29,91	256,84	140,15	0,00	0,00	0,00
32	22,79	54,25	146,11	36,03	280,37	147,43	0,00	0,00	0,00
34	-24,02	211,59	146,32	40,37	296,42	165,95	0,00	0,00	0,00
36	-24,02	79,44	85,00	47,84	227,11	138,88	0,00	0,00	0,00

EtO = Óxido de etileno
EtCl = Etilenocloridrina
EtGl = Etilenoglicol
RT = tempo de retenção
ppm = partes por milhão

Tabela 37: Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Camomila (*Matricaria recutita* L.)

Tempo de extração (horas)	Amostras com EtO, EtCl, EtGl Concentração (ppm)			Amostras sem padrão (controle) Concentração (ppm)			Concentração real (ppm)		
	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	EtO	EtCl	EtGl
2	37,96	0,00	0,00	149,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	286,23	50,65	0,00	189,31	10,58	0,00	96,92	40,07	0,00
6	314,32	32,23	37,17	225,16	17,93	0,73	89,15	14,30	36,43
8	324,65	25,01	0,00	236,33	21,59	65,86	88,32	3,42	0,00
10	356,41	78,49	0,00	295,94	55,01	39,08	60,47	23,48	0,00
12	405,90	126,43	36,60	401,21	88,20	14,40	4,69	38,24	22,20
14	400,24	174,09	14,40	407,62	148,39	28,68	0,00	25,70	0,00
16	452,24	217,61	-0,22	405,64	210,07	71,07	46,60	7,53	0,00
18	443,70	194,96	68,77	534,77	197,14	49,12	0,00	0,00	19,65
20	420,54	185,25	44,79	422,04	178,82	76,10	0,00	6,43	0,00
22	477,31	91,40	115,46	408,03	200,95	92,82	69,28	0,00	22,65
24	508,14	204,09	115,10	488,38	239,34	98,46	19,76	0,00	16,64
26	578,78	167,65	118,89	582,50	285,23	121,92	0,00	0,00	0,00
28	565,73	159,03	63,79	571,13	224,46	56,42	0,00	0,00	7,36
30	557,81	128,55	78,31	578,08	222,37	71,31	0,00	0,00	7,00
32	590,59	132,87	81,97	602,41	242,07	70,64	0,00	0,00	11,32
34	544,23	133,28	84,95	707,53	271,79	50,71	0,00	0,00	34,24
36	459,62	120,41	64,26	582,66	283,39	56,54	0,00	0,00	7,72

EtO = Óxido de etileno
EtCl = Etilenocloridrina
EtGl = Etilenoglicol
RT = tempo de retenção
ppm = partes por milhão

Tabela 38: Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)

Tempo de extração (horas)	Amostras com EtO, EtCl, EtGl Concentração (ppm)			Amostras sem padrão (controle) Concentração (ppm)			Concentração real (ppm)		
	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	EtO	EtCl	EtGl
2	40,61	54,40	0,00	0,00	0,00	0,00	40,61	54,40	0,00
4	34,12	78,26	0,00	0,00	2,82	0,00	34,12	75,44	0,00
6	34,74	89,29	1,67	0,00	3,31	0,00	34,74	85,98	1,67
8	16,46	42,14	-2,21	0,00	19,83	0,00	16,46	22,30	0,00
10	31,02	213,26	21,04	0,00	55,14	0,00	31,02	158,12	21,04
12	33,18	163,84	89,96	0,00	63,82	0,00	33,18	100,01	89,96
14	30,52	297,10	103,31	0,00	76,35	0,00	30,52	220,75	103,31
16	42,33	206,26	47,91	0,00	79,20	0,00	42,33	127,07	47,91
18	24,75	270,98	24,89	0,00	113,34	0,00	24,75	157,65	24,89
20	49,89	274,39	23,21	0,00	115,88	0,00	49,89	158,51	23,21
22	7,74	28,79	6,49	0,00	104,32	0,00	7,74	0,00	6,49
24	58,54	239,60	60,27	0,00	113,51	0,00	58,54	126,09	60,27
26	52,83	130,61	31,29	0,00	127,08	0,00	52,83	3,53	31,29
28	45,23	132,98	39,80	0,00	118,89	0,00	45,23	14,08	39,80
30	147,18	71,27	86,81	0,00	126,55	0,00	147,18	0,00	86,81
32	29,26	50,84	41,89	0,00	106,92	0,00	29,26	0,00	41,89
34	46,88	130,49	50,32	0,00	87,50	0,00	46,88	42,99	50,32
36	109,34	161,59	54,56	0,00	64,99	0,00	109,34	96,60	54,56

EtO = Óxido de etileno
EtCl = Etilenocloridrina
EtGl = Etilenoglicol
RT = tempo de retenção
ppm = partes por milhão

Tabela 39: Resultados referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.)

Tempo de extração (horas)	Amostras com EtO, EtCl, EtGl Concentração (ppm)			Amostras sem padrão (controle) Concentração (ppm)			Concentração real (ppm)		
	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	RT=1,300 EtO	RT=1500 EtCl	RT=1,750 EtGl	EtO	EtCl	EtGl
2	98,89	-49,46	-6,85	0,00	0,00	0,00	98,89	0,00	0,00
4	23,01	-11,09	-9,51	0,00	0,00	0,00	23,01	0,00	0,00
6	3,58	104,36	21,28	0,00	0,00	0,00	3,58	104,36	21,28
8	-4,52	0,66	5,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66	5,55
10	-3,80	-21,52	1,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,31
12	49,81	314,44	17,56	1,92	93,39	15,13	47,88	221,05	2,43
14	64,97	206,27	109,36	54,20	97,29	19,44	10,77	108,98	89,92
16	46,53	167,51	128,00	69,07	60,16	146,72	0,00	107,35	0,00
18	120,86	219,53	273,55	46,97	68,13	143,07	73,89	151,41	130,48
20	90,94	266,06	383,02	66,12	89,36	214,04	24,83	176,70	168,98
22	126,81	96,68	392,88	50,21	102,91	228,06	76,60	0,00	164,81
24	118,43	134,34	376,33	74,08	102,91	227,36	44,35	31,43	148,97
26	89,43	112,29	97,58	72,68	92,49	223,08	16,75	19,80	0,00
28	72,66	94,25	243,45	75,95	103,61	127,09	0,00	0,00	116,36
30	69,24	167,39	111,58	45,33	126,54	219,48	23,91	40,84	0,00
32	12,60	71,46	229,52	75,53	130,35	221,35	0,00	0,00	8,17
34	47,56	253,14	95,35	84,55	162,25	196,53	0,00	90,89	0,00
36	84,96	173,86	96,15	95,91	184,37	190,73	0,00	0,00	0,00

EtO = Óxido de etileno
EtCl = Etilenocloridrina
EtGl = Etilenoglicol
RT = tempo de retenção
ppm = partes por milhão

Tabela 40: Porcentagem de recuperação (Exatidão) referentes à validação do método de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em amostras de Drogas vegetais

Tempo de extração (horas)	Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)			Camomila (*Matricaria recutita* L.)			Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)			Guarana (*Paulinia cupana* H.B.K.)		
	EtO (%)	EtCl(%)	EtGl(%)	EtO(%)	EtCl(%)	EtGl(%)	EtO(%)	EtCl(%)	EtGl(%)	EtO(%)	EtCl(%)	EtGl(%)
2	27,29	0,00	19,63	0,00	0,00	0,00	29,24	29,85	0,00	71,19	0,00	0,00
4	30,60	51,46	0,00	69,77	21,99	0,00	24,56	41,40	0,00	16,56	0,00	0,00
6	7,05	81,73	30,39	64,19	7,85	18,19	25,01	47,18	0,83	2,58	57,27	10,63
8	63,65	47,15	36,88	63,58	1,88	0,00	11,85	12,24	0,00	0,00	0,36	2,77
10	63,96	76,06	32,46	43,53	12,89	0,00	22,33	86,77	10,50	0,00	0,00	0,66
12	64,64	128,92	15,91	3,38	20,98	11,09	23,89	54,88	44,92	34,47	121,30	1,21
14	61,53	0,65	26,93	0,00	14,10	0,00	21,98	121,14	51,58	7,75	59,81	44,90
16	46,35	0,00	62,24	33,55	4,13	0,00	30,48	69,73	23,92	0,00	58,91	0,00
18	35,65	22,31	12,05	0,00	0,00	9,81	17,82	86,51	12,43	53,19	83,08	65,15
20	18,02	74,03	58,71	0,00	3,53	0,00	35,92	86,98	11,59	17,87	96,96	84,37
22	34,38	58,17	61,65	49,88	0,00	11,31	5,57	0,00	3,24	55,15	0,00	82,29
24	17,06	40,80	0,00	14,23	0,00	8,31	42,15	69,19	30,09	31,93	17,25	74,38
26	14,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	38,03	1,94	15,62	12,06	10,87	0,00
28	33,69	0,00	0,00	0,00	0,00	3,68	32,56	7,73	19,87	0,00	0,00	58,10
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,50	105,96	0,00	43,35	17,21	22,41	0,00
32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,65	21,07	0,00	20,92	0,00	0,00	4,08
34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,10	33,75	23,59	25,12	0,00	49,88	0,00
36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,85	78,72	53,01	27,24	0,00	0,00	0,00

EtO = Óxido de etileno EtCl = Etilenocloridrina EtGl = Etilenoglicol

Tabela 41: Relação entre concentrações crescentes de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocliridrina e resultados equivalentes a estas em área (mV;min), bem como seus desvios padrões e desvios padrões relativos.

	Concentração (ppm)	Média das áreas das 3 réplicas (mV/min)	Desvio Padrão	DPR (%)
Óxido de Etileno	5,20	13939	690	4,95
	46,32	21632	589	2,72
	92,64	45428	4712	10,37
	138,96	70124	7139	10,18
	231,60	105120	6378	6,06
	347,40	147978	10383	7,01
	463,20	201768	4693	2,32
	694,80	284363	1236	0,43
	926,40	378633	14545	3,84
Etilenoglicol	11,51	12480	710	5,69
	25,03	11351	1819	16,03
	50,07	27655	767	2,77
	100,14	42793	4188	9,79
	169,76	60000	5954	9,92
	200,28	67080	5028	7,50
Etileno-cloridrina	4,68	27695	3230	11,66
	9,41	30001	4099	13,66
	23,50	34714	4439	12,78
	47,06	53469	4664	8,72
	94,15	72063	3565	4,94

ppm = partes por milhão

DPR = Desvio padrão relativo = coeficiente de variação

Tabela 42: Concentração (ppm) de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor A, submetidas a 30 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente

		Tempo de aeração			
		24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	Óxido de etileno	123,5411	103,6557	27,9324	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Óxido de etileno	191,8734	161,6065	89,9106	8,2423
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Óxido de etileno	68,8169	78,3686	34,6620	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.)	Óxido de etileno	132,8037	99,5946	44,3826	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5

Tabela 43: Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor B, submetidas à 30 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente

		Tempo de aeração			
		24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	Óxido de etileno	259,5336	173,3256	75,8123	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Óxido de etileno	163,0414	116,7140	19,5232	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Óxido de etileno	97,6347	71,2687	9,0472	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.)	Óxido de etileno	132,8424	84,4838	24,5618	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5

Tabela 44: Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor C, submetidas à 30 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente

		Tempo de aeração			
		24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	Óxido de etileno	165,9792	123,8392	55,2545	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Óxido de etileno	206,2151	170,3220	44,2697	7,8036
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Óxido de etileno	94,5454	98,3521	19,4802	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.)	Óxido de etileno	55,8674	38,6235	7,0714	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5

Tabela 45: Concentração (ppm) de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor A, submetidas a 60 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente

		Tempo de aeração			
		24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	Óxido de etileno	310,5867	294,9821	65,6751	5,9823
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Óxido de etileno	267,9651	184,3329	98,9437	11,5281
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Óxido de etileno	199,3476	101,4175	62,9321	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.)	Óxido de etileno	231,5681	148,3950	30,2122	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5

Tabela 46: Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor B, submetidas à 60 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente

		Tempo de aeração			
		24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	Óxido de etileno	302,4391	182,5810	86,6594	10,9332
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Óxido de etileno	382,4515	201,5642	91,7592	8,5520
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Óxido de etileno	129,7439	92,3428	19,6730	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.)	Óxido de etileno	200,7633	110,8659	39,6582	7,5283
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5

Tabela 47: Concentração (ppm) de óxido de etileno etilenoglicol e etilenocloridrina em Drogas vegetais, provenientes do fornecedor C, submetidas à 60 minutos de exposição ao agente descontaminante, após aeração a temperatura ambiente

		Tempo de aeração			
		24 horas	**3 dias**	**7 dias**	**14 dias**
Alcachofra (*Cynara scolimus* L.)	**Óxido de etileno**	231,4967	198,8774	101,8663	14,8732
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	**Óxido de etileno**	392,1034	274,9833	120,8733	17,9845
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	**Óxido de etileno**	199,9384	97,3498	56,9387	7,5430
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5
Guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.)	**Óxido de etileno**	126,8347	101,9348	49,3987	<5
	Etilenoglicol	<10	<10	<10	<10
	Etileno-cloridrina	<5	<5	<5	<5

Tabela 48: Resultados obtidos na determinação da exatidão e prescisão dos métodos de análise de extratos provenientes de drogas vegetais do fornecedor C por CLAE.

Droga vegetal	Marcador	70%			100%			130%		
		DP	DPR	Exatidão	DP	DPR	Exatidão	DP	DPR	Exatidão
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	Ac. Cafeoquínico	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Apigenin-7-glucoside	6742	0,63%	97,90%	4342	0,24%	95,30%	18928	0,71%	96,09%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Flavonóides Glicosídeos	2178	0,27%	122,05%	4444	0,39%	107,14%	4326	0,29%	106,28%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	Cafeína	7721	0,47%	94,32%	32344	1,42%	99,57%	7242	0,24%	98,29%

*DP= Desvio Padrão
DPR = Desvio padrão relativo = coeficiente de variação

Tabela 49: Concentração dos marcadores de drogas vegetais em amostras provenientes de três fornecedores (A, B e C), não submetidos a processo de descontaminação por óxido de etileno.

Droga vegetal	Marcador	Fornecedor		
		A	B	C
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	Ac. Cafeoquínico			
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Apigenin-7-glucoside	0,16%	0,27%	0,41%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Flavonóides Glicosídeos	1,21%	1,50%	1,34%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	Cafeína	3,52%	4,01%	3,83%

Tabela 50: Concentração dos marcadores de drogas vegetais em amostras provenientes do fornecedor C, antes e após ciclo de exposição de 30 e 60 minutos ao óxido de etileno.

Droga vegetal	Marcador	Antes da descontaminação	Após ciclo 30 min	Após ciclo 60 min
Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	Ac. Cafeoquínico			
Camomila (*Matricaria recutita* L.)	Apigenin-7-glucoside	0,41%	0,43%	0,40%
Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)	Flavonóides Glicosídeos	1,34%	1,28%	1,35%
Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.)	Cafeína	3,83%	3,93%	3,55%

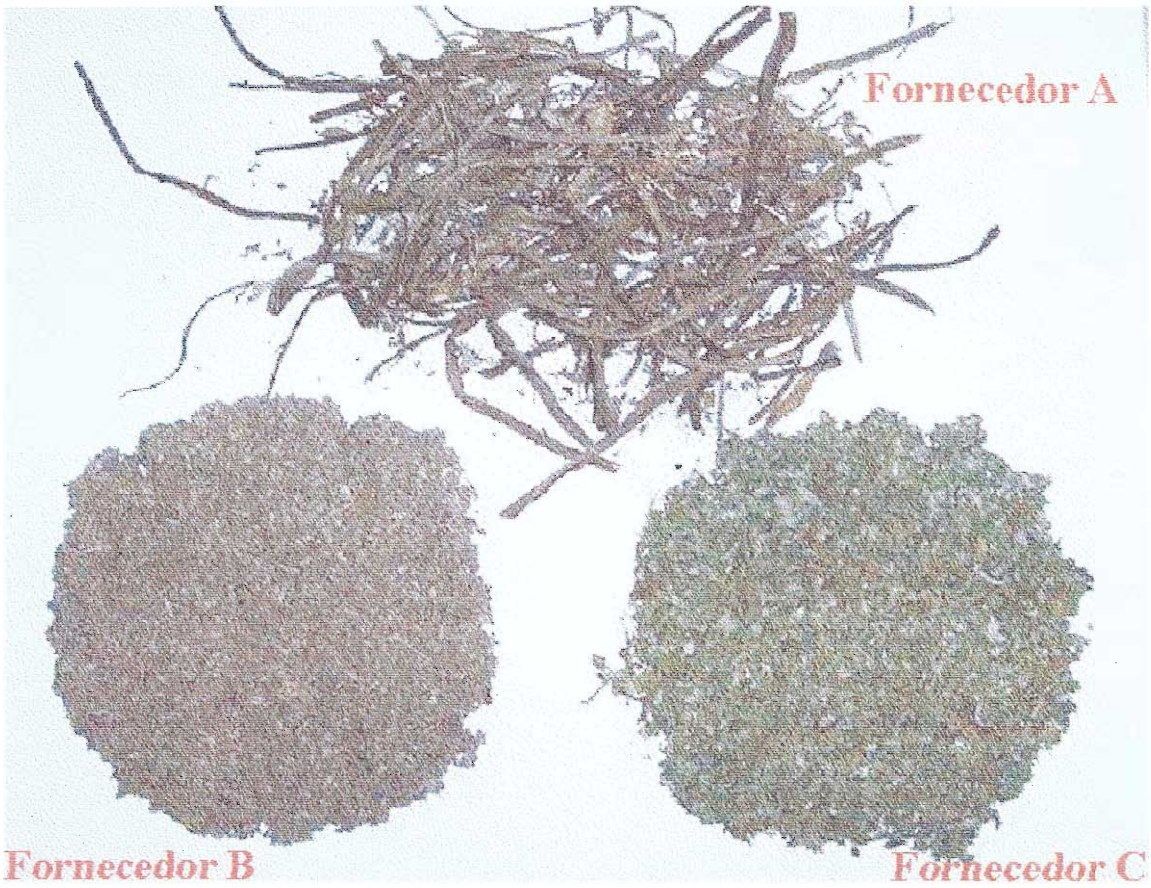

Figura 01: Observação macroscópica de 100 g de cada amostra de alcachofra (*Cynara scolimus* L.) proveniente dos fornecedores A, B e C.

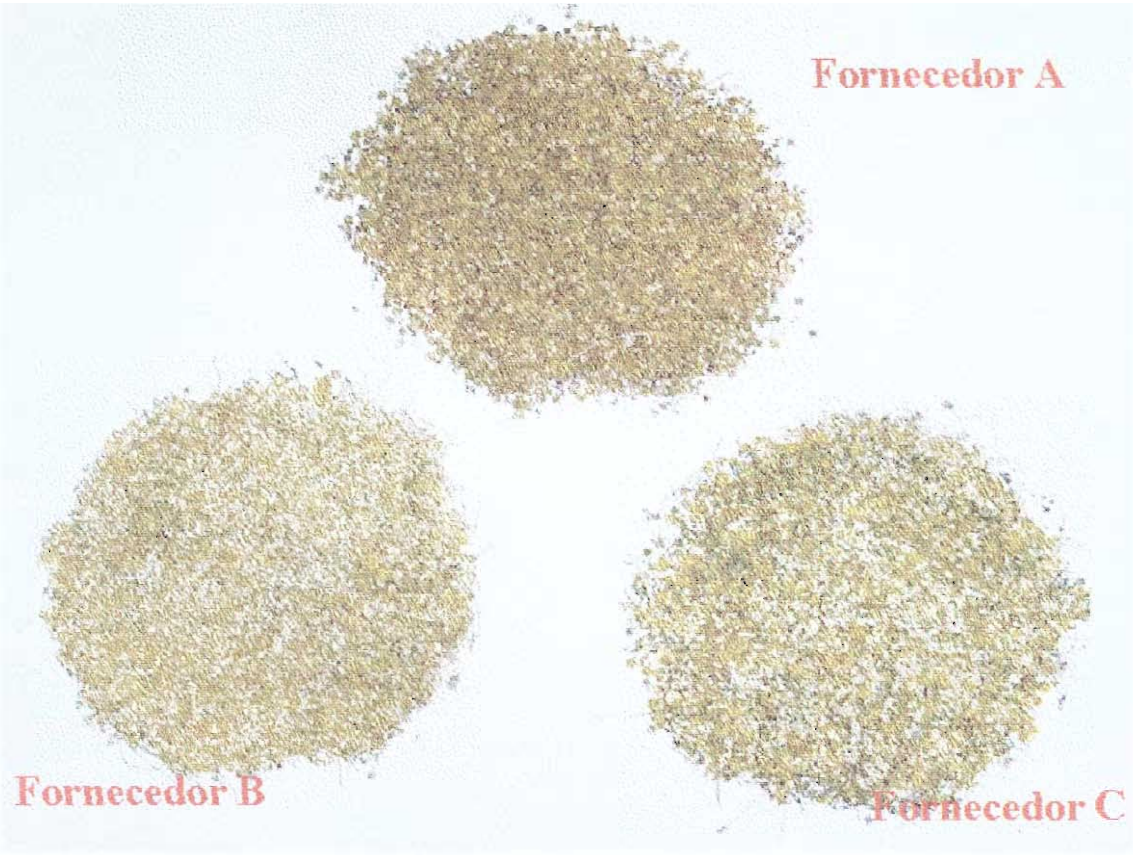

Figura 02: Observação macroscópica de 50 g de cada amostra de camomila (*Matricaria recutita* L.) proveniente dos fornecedores A, B e C.

Figura 03: Observação macroscópica de 100 g de cada amostra de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) proveniente dos fornecedores A, B e C.

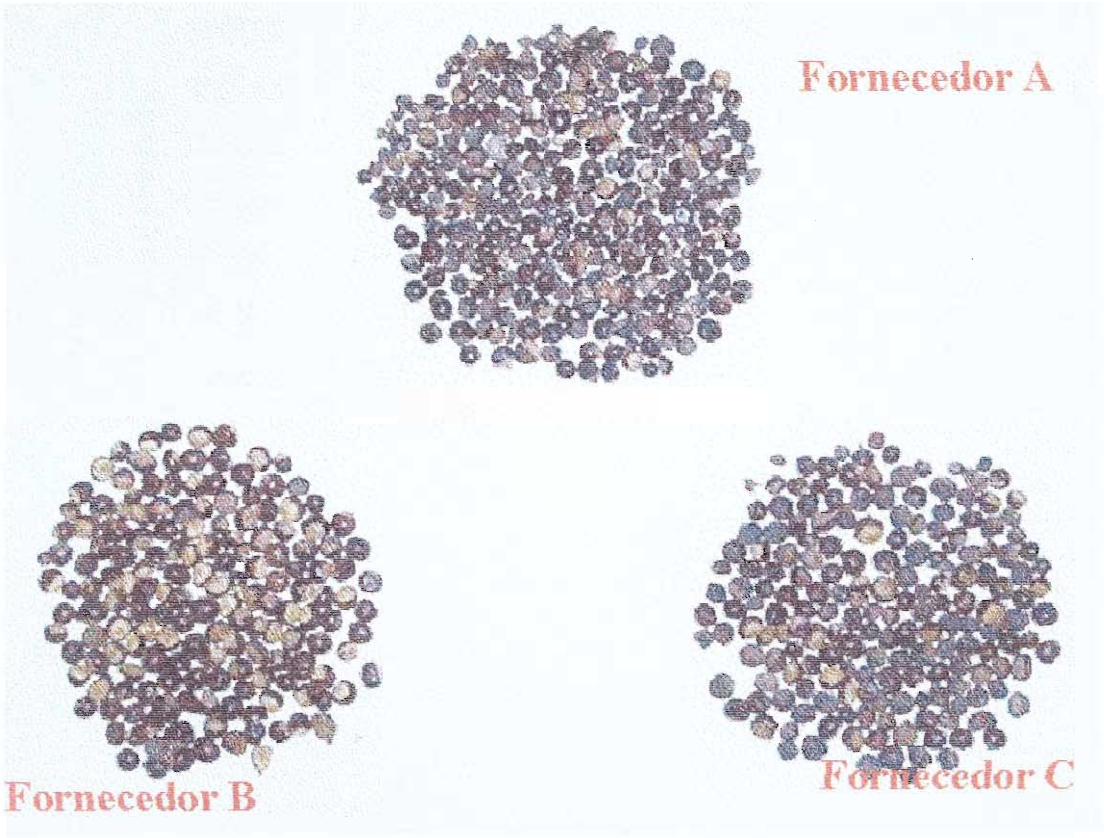

Figura 04: Observação macroscópica de 100 g de cada amostra de guraná (*Paullinia cupana* H.B.K.) proveniente dos fornecedores A, B e C.

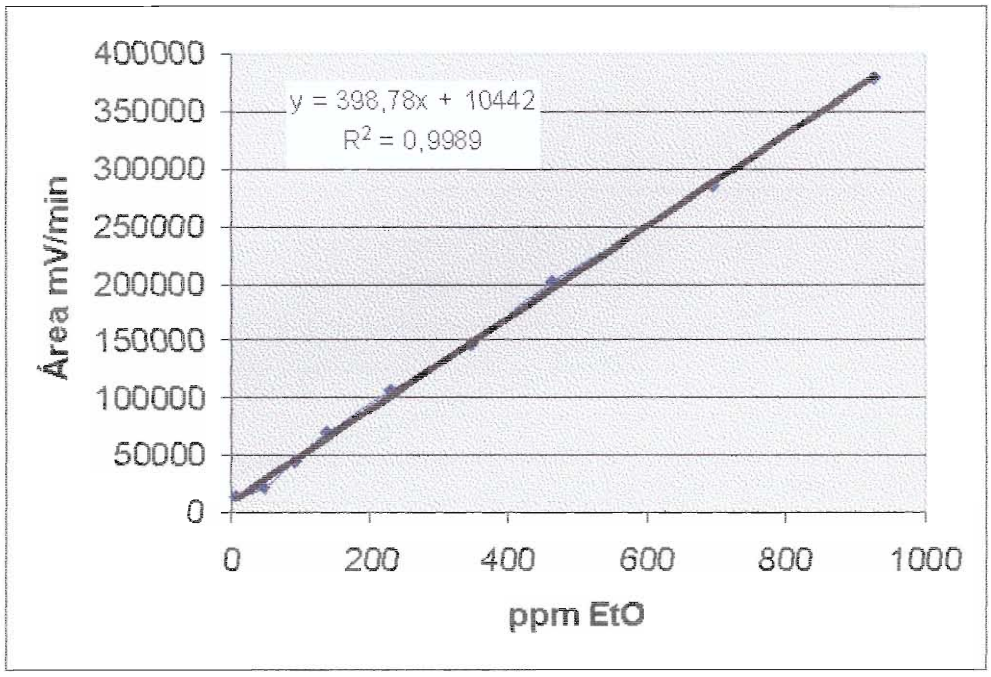

Figura 05: Curva de calibração de determinação residual de Óxido de etileno por cromatografia gasosa

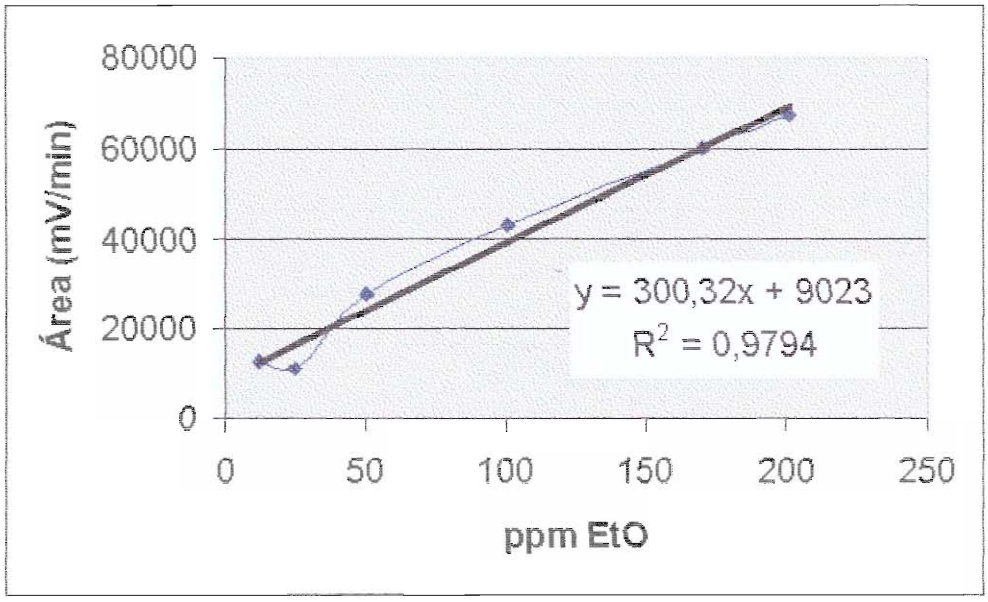

Figura 06: Curva de calibração de determinação residual de Etilenoglicol por cromatografia gasosa

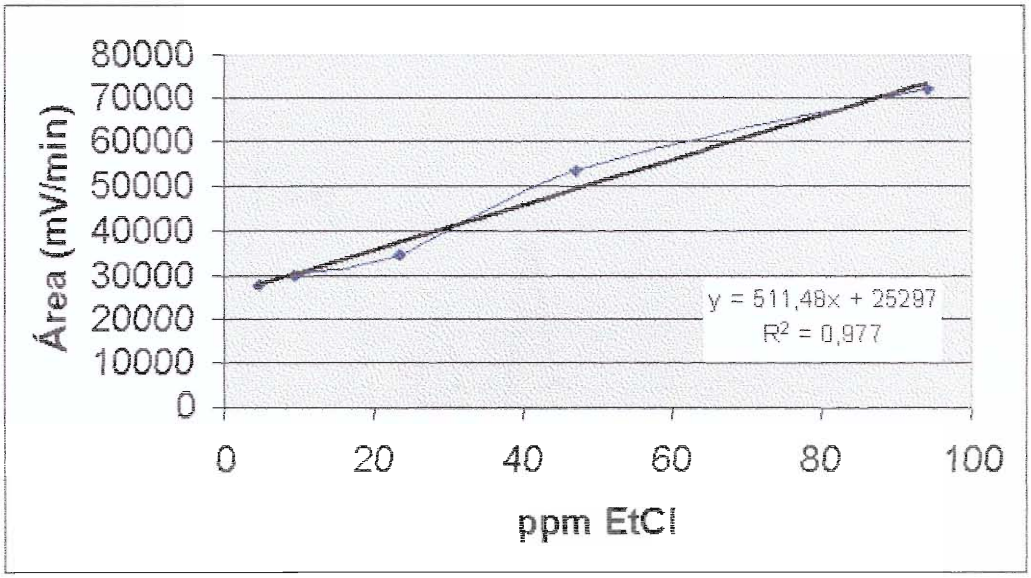

Figura 07: Curva de calibração de determinação residual de Etilenocloridrina por cromatografia gasosa

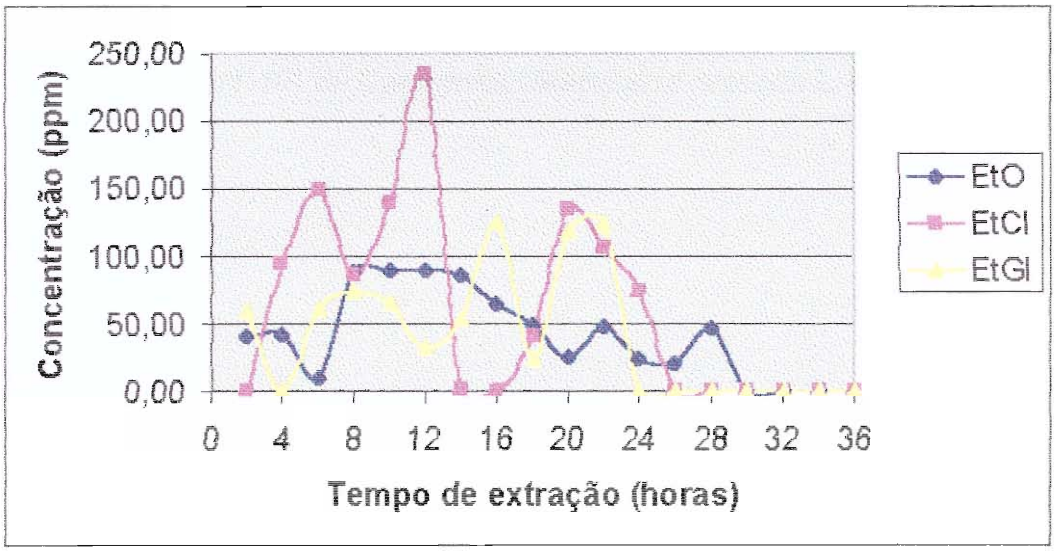

Figura 08: Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Alcachofra (*Cynara scolimus* L.).

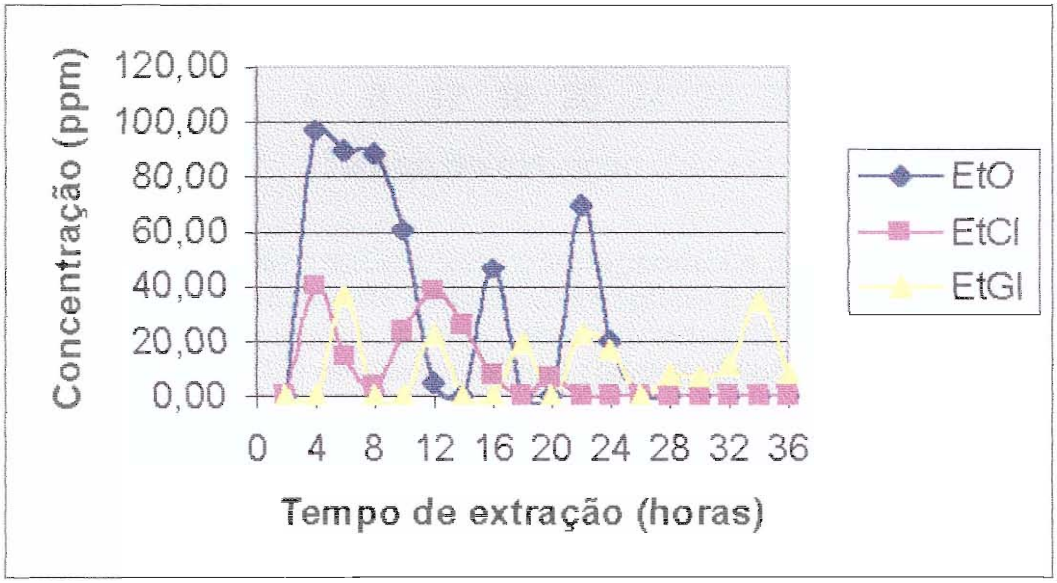

Figura 09: Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Camomila (*Matricaria recutita* L.).

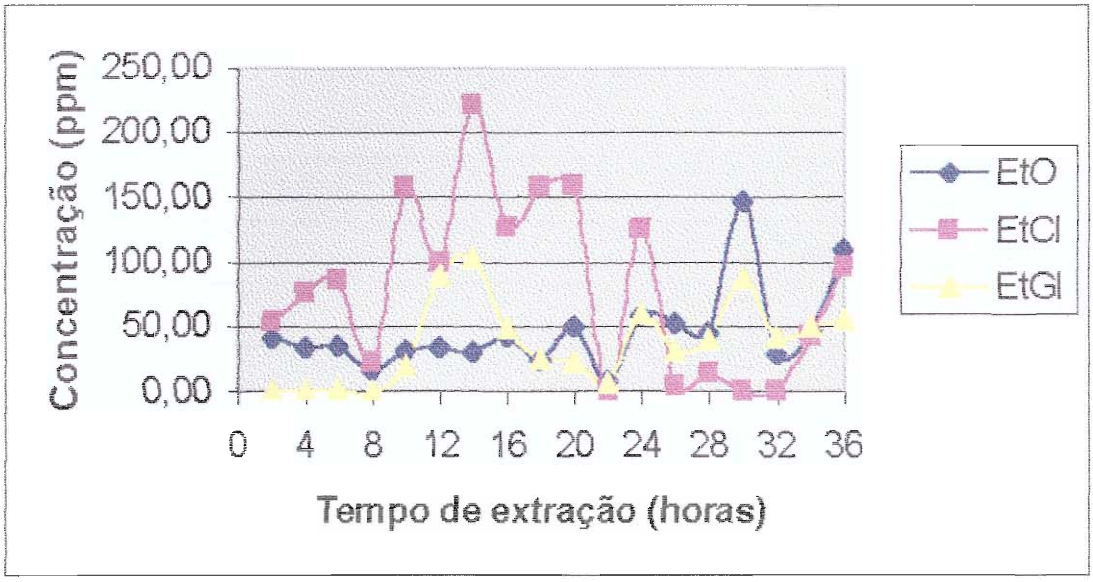

Figura 10: Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.).

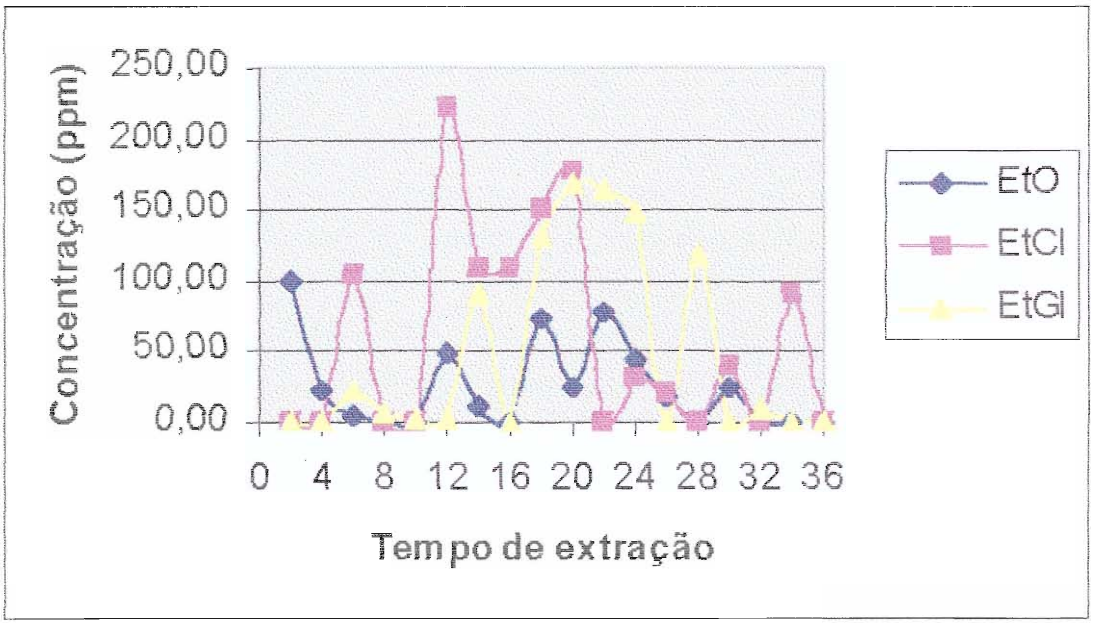

Figura 11: Curva de concentração empregando-se diferentes tempos de extração de óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, previamente inoculados, de amostras extraídas de suspensão aquosa (1:10) de Guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.).

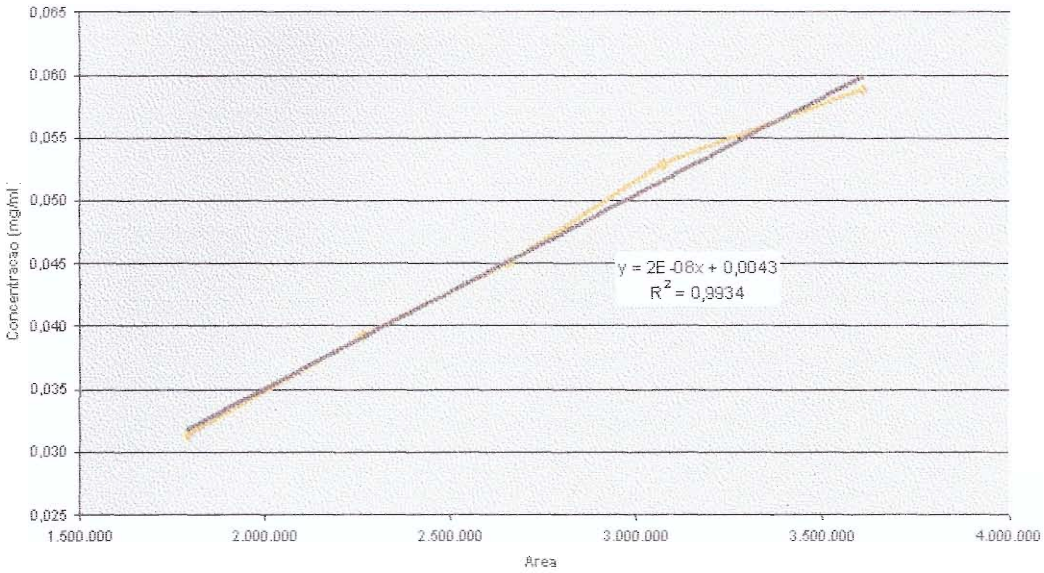

Figura 12: Curva de calibração de Apigenina – 7 – glucoside determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

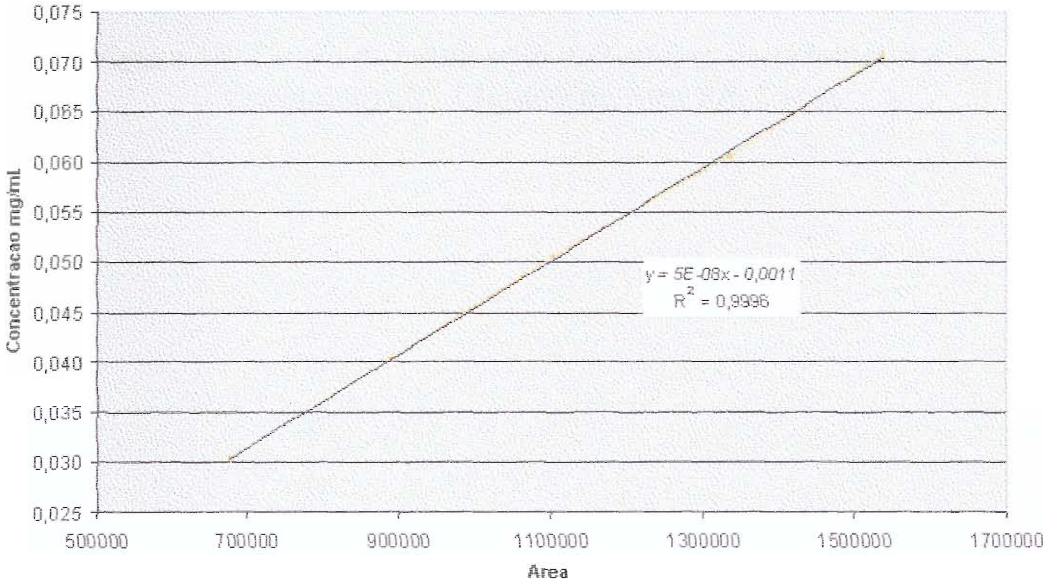

Figura 13: Curva de calibração de Flavonóides Glicosídeos determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

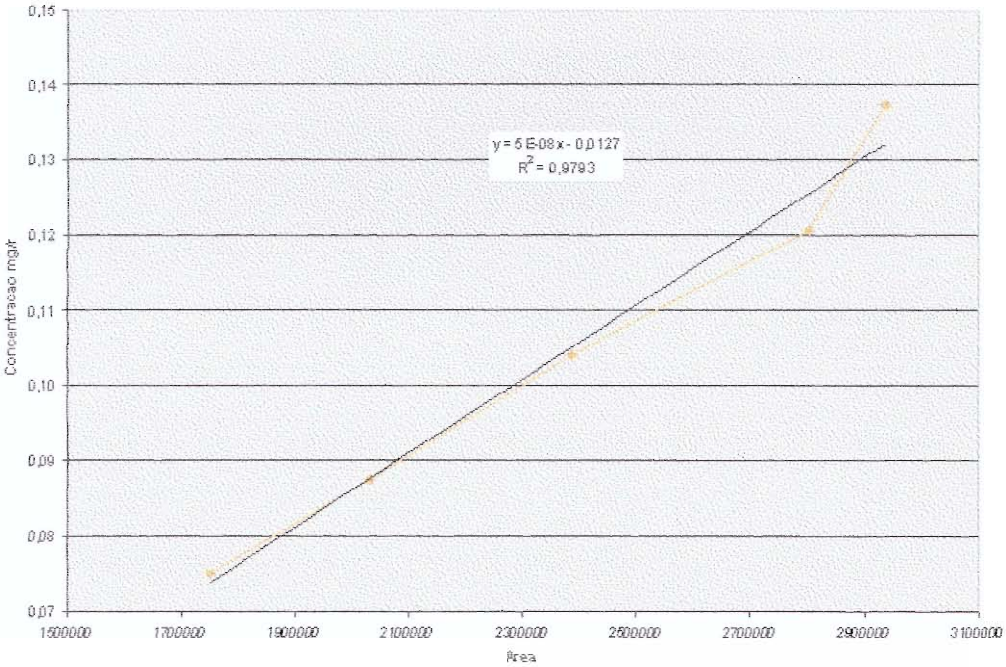

Figura 14: Curva de calibração de Cafeína determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Discussão

VI – DISCUSSÃO

A Resolução – RDC n°17 (BRASIL LEIS E DECRETOS, 2000) publicada em fevereiro de 2000 e tendo em anexo o "Regulamento Técnico sobre Registro de Medicamentos Fitoterápicos", apresenta algumas diretrizes pertinentes. Dentre estas consta a pesquisa de contaminantes microbiológicos, preocupação que se sabe ser pertinente.

Tendo em vista o elevado risco intrínseco decorrente da procedência das drogas vegetais, que tende a conferir a estas uma alta contagem microbiana, o mesmo regulamento menciona a utilização de métodos para eliminação de contaminantes, exigindo descrição do método utilizado e pesquisa de eventuais alterações na matéria-prima.

Dentre os métodos de descontaminação existentes, aquele empregando óxido de etileno constitui-se em alternativa eficiente, de custo baixo, que se caracteriza por baixa temperatura e umidade relativa.

Apesar das vantagens, este tipo de tratamento apresenta alguns pontos a serem estudados, tais como residual de oxido de etileno e seus derivados durante e após a aeração, eficácia do tratamento sob diferentes parâmetros como tempo de exposição, temperatura, concentração do gás, além de alterações na estrutura molecular do principio ativo.

Tendo em vista a problemática apontada, justifica-se a importância de elaborar estudo minucioso quanto a condições de eficácia antimicrobiana do processo, avaliação de potenciais riscos decorrentes de derivados do agente, assim como de eventuais alterações nos princípios ativos naturais que possam comprometer a sua eficácia.

Desta forma idealizou-se o presente trabalho, de natureza ampla, no sentido de proceder às investigações propostas. Inicialmente, as tabelas 01 a 04 trazem informações apresentadas nos certificados encaminhados pelos fornecedores B e C, junto às amostras. Apesar da omissão do fornecedor A

e da não uniformidade de informações proveniente dos demais, assim como a qualidade insatisfatória das informações, considerou-se relevante sua apresentação.

Numa primeira abordagem, justamente para que se visualize o estágio insipiente em que se encontram, no geral, as possibilidades de obtenção de drogas vegetais comercialmente disponíveis. Numa outra, em particular decorrente da leitura da tabela 03, observa-se a origem do ginkgo biloba, seja da Alemanha ou China. Pode-se também salientar informação disposta na tabela 02, evidenciando para a camomila obtida de um dos fornecedores apenas, origem especificando a região sul do Brasil, em contrapartida a todas as demais que apenas especificam o país.

Informações desta natureza conduzem a reflexões que se constituiram em motivações adicionais para o desenvolvimento do presente trabalho.

A descrição do material de embalagem no qual as drogas vegetais foram recebidas proveniente dos fornecedores A, B e C está apresentada na tabela 05. As drogas em geral foram recebidas embaladas com dupla embalagem (polietileno/ráfia ou polietileno/papel), o que confere segurança no transporte e diminui o risco de contaminações externas. Entretanto o material de polietileno retém umidade no seu interior, promovendo a proliferação de bactérias e principalmente de fungos quando de longos períodos de armazenagem. O guaraná proveniente do fornecedor C foi o único a ser recebido com uma única camada protetora (saco de ráfia), com aberturas que em contrapartida podem também propiciar contaminações a partir do meio externo.

As drogas vegetais foram fracionadas em embalagens de filmes plásticos (polietileno-poliester-polietileno), providos de "air-vents" em Tyvek, numa área de aproximadamente 1000 cm^2 (35 x 35 cm). Esta superfície, frente à dimensão total de embalagem de 2000 cm^2, proporciona porosidade adequada (Porosidade Gurley de aproximadamente 200 segundos), permitindo a permeabilidade ao óxido de etileno e ao ar, sem entretanto

comprometer no sentido da recontaminação do material contido na embalagem. A caracterização da embalagem constituiu-se em ítem polêmico, pois sabe-se da prática que a introdução das drogas vegetais em câmaras de descontaminação nem sempre ocorre da maneira ideal. Estes materiais são apenas dispostos em bandejas metálicas, sem qualquer acondicionamento prévio, ou ainda embalados em sacos de ráfia, com aberturas, não possibilitando situação de controle de umidade relativa ou padronização de permeabilidade. Situações também capazes de permitir a recontaminação do material após o processo, e ainda proporcionar elevado risco ocupacional aos operadores envolvidos, por induzir à manipulação subsequente ao processo.

No decorrer do fracionamento das amostras com a finalidade de seu acondicionamento em material de embalagem permeável ao gás óxido de etileno foram realizadas inspeções visuais em 100% do material. Os resultados obtidos, expressos nas Tabelas 06, 07, 08 e 09, revelaram não uniformidade entre as amostras de uma mesma droga vegetal, proveniente de fornecedores distintos. Comparando-se as especificações apresentadas nos compêndios oficiais, a alcachofra obtida do fornecedor A, pode ser valorizada frente às demais analisadas em função do pleno atendimento ás especificações. Nesta amostra observou-se todas as características descritas pela Farmacopéia Brasileira 3ª edição, inclusive aquela relativa a coloração. Os demais lotes não permitiram avaliação consistente em decorrência do estado de fragmentação. No que diz respeito à coloração, a droga adquirida do fornecedor B apresentou-se em conformidade com o especificado, sendo observada a coloração verde-escura. De forma contrastante, o material adquirido do fornecedor C apresentou coloração verde-folha, conforme Figura 1 e, portanto, distinta da especificada.

Para as amostras de guaraná as dimensões observadas não foram semelhantes para as três amostras. Nas amostras provenientes dos fornecedores B e C havia grande variação no tamanho dos frutos de um mesmo lote, entretanto a média dos pesos desses estão em conformidade ao especificado pela Farmacopéia Brasileira 3ª edição (Figura 04). Quanto à

presença de materiais estranhos, para o guaraná proveniente do fornecedor B constatou-se a presença de material de origem animal na amostra inspecionada (Tabela 10). As inspeções referentes a camomila revelaram presença de diferentes dimensões dos pecíolos. Para o material obtido do fornecedor B observou-se pecíolos com dimensões inferiores àqueles observados no material do fornecedor C. Além disso, para esse último fornecedor foi observada coloração esverdeada na droga. Para a drogas obtida do fornecedor C não foram detectados macroscopicamente materiais estranhos, minerais ou vegetais (Tabela 10). De forma contrastante, o ginkgo biloba referente aos fornecedores A e B, apresentou contaminação de origem material mineral (pequenas pedras com dimensão aproximada de 1 cm^3) sendo que a quantidade desses contaminantes encontrada no fornecedor A foi cerca de 2 vezes maior quando comparada ao fornecedor B. Também foi constatada a presença de fragmentos de casca de fruto cítrico no fornecedor A.

As diferenças entre as drogas vegetais provenientes de diferentes fornecedores podem ser decorrentes das diferentes datas de colheita, bem como, no caso do ginkgo biloba, do distinto local de plantio (Tabelas de 01 a 04). O solo intervém no desenvolvimento dos vegetais de diversas formas, e sua composição química, o pH, e a porosidade podem interferir de maneira acentuada na formação de princípios ativos (OLIVEIRA E COLABORADORES,1998.). Estas diferenças poderão ser melhor avaliadas após a identificação e doseamento dos extratos vegetais. Com relação à colheita, para ser bem executada depende do conhecimento perfeito da espécie vegetal em questão. A morfologia, a fisiologia e a maneira como variam os princípios ativos no vegetal, são dados da maior importância e que um coletor deve conhecer, pois variam com a idade, época de colheita e mesmo com o período do dia no qual este procedimento é efetuado (OLIVEIRA E COLABORADORES,1998.).

Os ensaios para a validação da contagem microbiana, previstos n a USP XXV, com a finalidade de detectar qualquer efeito inibitório do crescimento microbiano inerente à amostra foi realizado com as drogas

vegetais provenientes do fornecedor B e os resultados estão apresentados nas tabelas 11, 12, 13, 14 e 15. Este ensaio preconiza a inoculação da amostra com número reduzido de células (10^3 UFC), que deve ser transferido para a amostra previamente diluída. No presente trabalho 100% das amostras analisadas apresentaram níveis de recuperação superiores a 10^4 UFC/g, portanto pelo menos 10 vezes maior que a quantidade de inóculo interno recomendada para o ensaio de validação, impossibilitando o cálculo da porcentagem de recuperação. Assim sendo, uma vez que foram detectadas cargas microbianas elevadas em todas as drogas vegetais provenientes dos três fornecedores, assumiu-se que as amostras apresentaram condições para manterem a viabilidade de contaminantes sendo que, desta forma, os possíveis efeitos inibitórios inerentes a própria droga vegetal ou provenientes de técnicas agrícolas como da aplicação de defensivos, podem ser considerados não relevantes.

No que se refere à biocarga detectada, verificaram-se elevados níveis de carga microbiana em todas as amostras testadas. Esse resultado corroborou com estudos anteriores e corresponde à expectativa, uma vez que o material de origem natural não havia sido previamente submetido a qualquer processamento com a finalidade de reduzir a carga microbiana. Para bactérias verificou-se faixa de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos entre a amostra com maior carga contaminante, a alcachofra ($7,8 \times 10^7$ UFC/g), e a amostra que apresentou a menor carga, gingko biloba fornecedor B ($5,4 \times 10^3$ UFC/g). Esses resultados podem ser decorrentes de inúmeros fatores incluindo qualidade da água para irrigação, se potável ou proveniente de bacia hidrográfica ou poço artesiano, colheita manual ou mecanizada, processo de secagem em ambiente climatizado ou não controlado, umidade relativa da droga. Embora solicitado, os fornecedores não apresentaram informações relativas ao procedimento de plantio, coleta e secagem da droga. No caso do ginkgo biloba, tratando-se de materiais de procedência estrangeira, mais difícil a obtenção de tais informações. No caso da alcachofra e do guaraná o fornecedor não registrou qualquer

procedimento específico no processo de obtenção da droga, que tivesse por finalidade minimizar possíveis contaminantes microbianos.

A análise das mesmas drogas obtidas por distintos fornecedores revelou diferenças de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos entre a maior e a menor contaminação, para o guaraná e a alcachofra. Esses resultados podem demonstrar procedimentos diferenciados no armazenamento da droga, assim como condições de obtenção da mesma com distintas condições de higiene (Tabela 16). Para o ginkgo e a camomila os resultados apresentaram maior uniformidade. As determinações revelaram carga microbiana média de 10^4 UFC/g com exceção para o ginkgo biloba proveniente do fornecedor B (ver a média das duas drogas para todos os fornecedores). Comparando os distintos fornecedores, observou-se sempre maiores cargas microbianas nas drogas obtidas daquele fornecedor identificado como A (Tabela 16). Os demais fornecedores apresentaram resultados semelhantes, sendo a média dos níveis dos contaminantes detectados (média de todas as drogas) nos produtos do fornecedor B menor que C. Pode-se inferir que as drogas obtidas no fornecedor A apresentaram qualidade inferior quando comparada aos demais fornecedores. Outra possibilidade, que pode ou não ser somada a esta, refere-se às condições de armazenamento. Locais com alta umidade relativa podem promover aumento da população microbiana inicialmente presente na amostra. Desta forma, o conhecimento das condições de higiene da obtenção da droga, assim como de seu armazenamento, constituem-se informações de fundamental importância na interpretação dos resultados obtidos.

A análise dos resultados relativos aos fungos revelou ocorrência desses microrganismos em níveis entre 10^2 e 10^5, conforme Tabela 17. Os dados obtidos não apresentaram uniformidade entre as diferentes drogas de distintos fornecedores, assim como para as drogas de um mesmo fornecedor. A presença de bolores e leveduras no material avaliado foi prevista após análise de estudos anteriores. Entre as drogas testadas, o guaraná e a camomila apresentaram maiores contaminações (em média 10^4) quando comparada às demais drogas (em média: alcachofra 10^3 e

ginkgo 10^3). Evidenciou-se, na contagem de fungos, elevada carga de leveduras na amostra de camomila do fornecedor C.

Os resultados referentes à contagem microbiana são semelhantes aos de Katusin-Razem e colaboradores em 2001 (KATUSIN-RAZEM E COLABORADORES, 2001), que encontraram em seu abrangente estudo resultados semelhantes, sendo para análise de folhas e flores de 104 - 108 UFC/g e para frutos e sementes 102 - 106 UFC/g.

No que se refere a padrões microbianos a legislação vigente (RCD 17, de 24/02/00) o ítem "Registro de Medicamento Fitoterápico Novo" cita que a pesquisa de contaminantes microbiológicos deve seguir critérios farmacopêicos ou as determinações da Organização Mundial da Saúde, portanto em coerência com o desenvolvimento do trabalho.

Ao compararmos os resultados da contagem de número de unidades formadoras de colônias de bactérias aeróbias totais com os limites exigidos pela Farmacopéia Americana 25ª edição para a camomila e ginkgo biloba, este quesito mostra-se atendido embora no limite superior (10^4 UFC/g) Esta é também a conclusão ao se observar as especificações quanto a contaminação microbiana da última atualização da Organização Mundial da Saúde (variam de 10^5 a 10^7 UFC/g). (WHO, 1992) No caso da alcachofra e do guaraná, os valores obtidos encontram-se de acordo com os limites microbianos adotados, comuns a todas as drogas vegetais, conforme a Organização Mundial da Saúde, pois as Farmacopéias Americana e Brasileira não apresentam monografias específicas para estas drogas.

Em relação à contagem total de unidades formadoras de colônias de bolores e leveduras segundo a Organização Mundial da Saúde todas as drogas avaliadas estariam de acordo com os limites, desde que destinadas para o emprego como chás ou infusões. No caso de uso interno distinto estariam em desacordo a camomila do fornecedor C e o guaraná dos fornecedores A e C. Entretanto, se compararmos com os limites definidos

pela Farmacopéia Americana o ginkgo biloba dos fornecedores A e C estariam também acima dos limites microbianos aceitáveis.

A Organização Mundial da Saúde diferencia os padrões microbianos para diferentes destinos a que seriam encaminhadas as drogas vegetais entretanto segundo estudo de Katusin-Razem e colaboradores que em 1988 avaliaram a sobrevivência microbiana após processo de infusão que resultou em 0,2 a 81% (KATUSIN-RAZEM E COLABORADORES, 1988), mais tarde em 2001 os mesmos autores analisaram drogas vegetais após o processo de produção de extratos líquidos e secos e estas apresentaram-se com contagens microbianas variando-se de 10^2 a 10^6 (KATUSIN-RAZEM E COLABORADORES EM 2001).

Além da contagem microbiana total foi também realizada a pesquisa de patogênicos específicos, sendo que os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 18, 19, 20 e 21. Para os resultados negativos nos meios de diferenciação adotou-se a não aplicabilidade dos testes confirmatórios, visto que a presença do microrganismo estudado foi descartada. Observou-se a suspeita de *Escherichia coli* para quase todas as amostras estudadas com exceção às folhas de ginkgo biloba proveniente dos três fornecedores.

Dentre toda a pesquisa de patogênicos específicos o *Staphylococus aureus* e a *Salmonella* sp foram os microrganismos menos detectados (0% das amostras). Em contrapartida a *Pseudomonas aeruginosa* foi o microrganismo mais amplamente observado, com exceção apenas da camomila e do ginkgo biloba provenientes respectivamente dos fornecedores B e A.

Com relação à contagem microbiana após exposição 30 e 60 minutos ao agente descontaminante óxido de etileno verifica-se a eficácia do processo ao analisar os dados apresentados nas tabelas 22, 23, 27 e 28, além de uma melhor visualização nas tabelas comparativas 24, 25, 29 e 30 que relacionam as amostras antes e após ciclo de exposição ao agente descontaminante. Segundo os resultados comparativos da tabela 24 observa-se uma diminuição na carga bacteriana para o ciclo de exposição

de 30 minutos de acima de 98%, com exceção do ginkgo biloba proveniente do fornecedor A (96,30% de redução), já nas tabelas 27 e 29 observou-se que após 60 minutos de exposição ao agente ocorreu uma redução maior que 99,8% a nível de sensibilidade do método, ou seja menor que 10 UFC/g. No que se refere à contaminação fúngica após 30 minutos de exposição ao óxido de etileno (Tabelas 23 e 25) observa-se que para a alcachofra proveniente dos três fornecedores houve uma menor porcentagem de redução variando-se de 0 a 50%. Com relação às restantes drogas vegetais observou-se uma diminuição de acima de 97%. Estes resultados demonstram uma maior resistência por parte de determinados fungos ao agente descontaminante. Por outro lado nas tabelas 28 e 30, assim como para a carga bacteriana, após ciclo de 60 minutos observou-se redução até valores abaixo de 10 UFC/g. Portanto podemos concluir que ausência total de microrganismos contaminantes depende, neste caso, do tempo de exposição da droga ao agente descontaminante. A sua importância varia de acordo com a finalidade a que se destina a droga, como por exemplo é extremamente necessária o controle da carga microbiana para drogas vegetais em "sachet" ou na forma de extrato seco, podendo esta ser mais atenuada se o destino da droga vegetal for a produção de extrato alcoólico.

Quanto à pesquisa de patógenos específicos após os ciclos de descontaminação (Tabelas 26 e 31) foi constatada a ausência de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Escherichia coli*. Estes resultados não surpreendem, por já haver sido comprovada a alta sensibilidade destes microrganismos ao agente esterilizante (MICHAEL & STUMBO, 1970).

No quesito determinação da umidade relativa agregada ao material conforme recebido, a metodologia analítica utilizada foi a Perda por Dessecação segundo Farmacopéia Brasileira 4ª edição, que no seu capítulo "Determinação de Água em Drogas Vegetais" apresenta parâmetros aplicáveis a estes. Nos resultados apresentados na tabela 32 observa-se que quanto aos limites de umidade, com exceção da alcachofra proveniente do fornecedor C (6,042%), todas as drogas estão dentro da faixa de 8 a 14%

água. O teor de água na droga consiste em característica muito importante para sua conservação. Quanto maior for este teor, mais sujeita à agentes deletéricos a droga fica. Bactérias e fungos necessitam respectivamente de cerca de 40 a 45% e 15 a 20% de umidade na droga para se desenvolverem (OLIVEIRA E COLABORADORES, 1998).

Com o intuito de ocasionar a esporos e células na forma vegetativa o grau de hidratação necessário, após um período de 48 horas, a condicionamento ambiental padronizado de 50 –70 % de Umidade Relativa e 30 °C de temperatura, realizou-se novamente a determinação da umidade relativa do processo. Os resultados estão apresentados na tabela 33. Observou-se um aumento de 2 a 4% na umidade relativa do material vegetal Este cuidado foi somado à etapa de pré-umidificação quando do próprio ciclo esterilizante, em que sob vácuo é incorporado período de umidificação no material contido na câmara de descontaminação/ esterilização. Esta umidade é fator importante no que refere a atividade de água na ação do agente descontaminante, e sabidamente essencial para o processo de descontaminação ou esterilização por óxido de etileno, atuando seja diretamente como meio de reação covalente (polar) seja como solvente aumentando a disponibilidade do agente frente ao microrganismo. (PINTO & AMOEDO, 2002)

Nas tabelas 34 e 35 podemos observar os resultados referentes a determinação da umidade relativa nas drogas vegetais após os ciclos de descontaminação por óxido de etileno. Observou-se que, após a eliminação dos gases através de três lavagens consecutivas com Nitrogênio, houve uma redução na umidade relativa quando comparada com as drogas após a pré-umidificação. Estes resultados são considerados positivos devido ao fato de que as drogas vegetais após o ciclo de esterilização são armazenadas até a comercialização e a baixa umidade desfavorece a proliferação de microganismos.

No que tange à metodologia aplicada à extração dos resíduos do agente de descontaminação, assim como de seus derivados, considerando

tanto as características moleculares quanto os dados obtidos da revisão de literatura, a opção ideal consiste na cromatografia gasosa (LAO E COLABORADORES, 1995; MARLOWE E COLABORADORES, 1987; NOGUEIRA, 1989; WOJCIK-O'NEILL & ELLO, 1991 E WOODROW E COLABORADORES, 1995). Há de se considerar portanto, nos aspectos de validação do método, a observância às características aplicadas aos métodos analíticos em geral, quais sejam precisão, exatidão, lineridade de curva de calibração no intervalo considerado, especificidade (ou seletividade) do método, limite de quantificação e robustez do método (BTASIL LEIS E DECRETOS, 2002).

O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação pode ser observado na tabela 41. Constatada a repetibilidade dos resultados com a inexistência de valores percentuais acima de 15, conclui-se pela precisão inter-corridas do método. No que se refere-se à curva de calibração como podemos observar os resultados nas figuras 05, 06 e 07, o coeficiente de regressão linear é 0,9989, 0,9794 e 0,9770 para óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina respectivamente, resultados considerados satisfatórios para o método de detecção adotado.

Com relação à especificidade ou seletividade, durante o processo de extração dos residuais de óxido de etileno e seus derivados em água, é inevitável a extração paralela de componentes inerentes à própria droga vegetal. É também implícito que alguns destes atuem como interferentes na obtenção direta da concentração dos agentes estudados. Para contornar esta situação foi realizado paralelamente, e inclusa ao processo de validação, uma extração controle contendo apenas as drogas vegetais e água. Nas tabelas 36, 37, 38 e 39 observa-se os resultados das amostras contendo óxido de etileno, etilenoglicol e etilenocloridrina, amostra sem os padrões (controle) e a concentração real dos residuais em ppm, sendo esta última calculada a partir das diferenças entre as anteriores, respeitando o mesmo tempo de extração.

No quesito Limite de detecção, estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes de óxido de etileno e seus derivados, até o menor nível detectável, segundo a tabela 41 são: para o óxido de etileno 5,20 ppm, para etilenoglicol 11,51 ppm e para etilenocloridrina 4,68 ppm. Com relação ao ítem robustez considerado durante a fase de desenvolvimento do método, pode-se considerá-lo isenta das variações típicas de cromatografia gasosa pelo fato de ter-se utilizado a mesma coluna cromatográfica, bem como o por se trabalhar com temperatura e fluxo constantes.

Quanto à exatidão inter-corridas do método, representado para as diferentes drogas vegetais na tabela 40, observa-se que para a alcachofra obteve-se uma boa recuperação , por volta de 60%, 70% e 35% de óxido de etileno, etilenocloridrina e etilenoglicol, respectivamente, entre 10 e 14 horas de extração. Índices de etilenoglicol maiores em maior tempo de extração devem-se certamente à degradação do óxido de etileno. No caso da camomila, o melhor intervalo de extração se altera para de 4 a 10 horas, e 60%, 20% e 20% de recuperação para os mesmos componentes.

O intervalo de tempo de extração que apresenta melhor porcentagem de recuperação ou exatidão para a ginkgo biloba e guaraná é 16 a 20 horas, resultando em 35%, 80% e 20% e 54%, 80% e 80% respectivamente para ginkgo biloba e alcachofra de óxido de etileno, etilenocloridrina e etilenoglicol. Estes resultados, embora em relação à concentração recuperada, podem ser também observados nas figuras 08 a 11. Alguns pontos incoerentes nas curvas foram observados, entretanto devem-se certamente à variação na coleta da fração.

As extrações foram realizadas em meio líquido e as injeções no cromatógrafo gasoso foram efetuadas de forma manual. A literatura descreve método de extração e injeção por "Head Space" com injetor automático acoplado como sendo mais eficaz e capaz de promover maior índice de recuperação (CARDEAL E COLABORADORES, 1995; BICCHI E

FRATTINI, 1982) entretanto limitações em relação ao equipamento impediu que se adotasse tal procedimento.

As concentrações de residuais após o processo de descontaminação por óxido de etileno podem ser observadas nas tabelas 42 a 47. As presenças de etilenoglicol e etilenocloridrina detectada mantiveram-se para todas as amostras testadas, dentro do limite de sensibilidade do método adotado (5 ppm para etilenocloridrina e 10 ppm para etilenoglicol). Já no caso do óxido de etileno seja para ciclo de exposição de 30 ou 60 minutos, as drogas vegetais alcachofra e camomila são responsáveis pelos maiores índices de residuais para este agente. Pode-se constatar também intensa redução a índices aceitáveis de óxido de etileno, após 14 dias de aeração ambiental, respeitando temperatura ambiente e apenas favorecidas pelas 25 trocas de ar por hora, obtendo-se após este período de aeração índices abaixo dos aceitáveis pela ANFZA (20 ppm) e EUA (50 ppm) (ANFZA, 2000)

Estes resultados condizem com os de FOWLES e colaboradores que em 2001 realizaram experimento semelhante e após 14 dias de aeração ambiental apenas 31 de 200 especiarias vegetais estudadas apresentaram resultados acima do limite de detecção de 2 ppm. Com base em dados de monitoramento conclui-se que não há riscos cancerígenos inerentes ao óxido de etileno em consumidores de especiarias e drogas vegetais descontaminadas. Esta constatação é inteligível, apesar de os dados toxicológicos para os derivados ainda serem limitados, pois o óxido de etileno é um gás altamente volátil e se dissipa rapidamente após a fumigação. Dados da USEPA (1998) têm mostrado que os níveis deste agente diminuem rapidamente nos primeiros dias e então mais lentamente até se tornar não detectável (<0,1 ppm) após 2 meses.(FOWLES, 2001)

Estes resultados são promissores, tendo em vista que os 14 dias de aeração certamente estarão sendo compatíveis com etapas de embalagem final do produto, previamente à sua distribuição e consumo. Os reduzidos níveis de etilenoglicol e etilenocloridrina, produtos com características

problemáticas seja pela não volatilidade ou pela elevada toxicidade do segundo, consistem em aspecto extremamente favorável (FOWLES, 2001).

No que se refere ás análises químicas objetivando investigar eventuais alterações de princípios ativos foram adotados marcadores, ou seja substâncias constituintes na droga vegetal as quais foram quimicamente definidas e com propósitos de controle de qualidade (WHO, 1993). Com relação às validações das metodologias de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, as metodologias farmacopêicas não obrigatoriamente requerem validação, conforme CFR 211.194 – American National Standards Institute (USP XXV). Assim extrapolou-se esta afirmação parcialmente para métodos obtidos da literatura, visto que tratavam-se de metodologias validadas anteriormente. Foram entretanto adotados os parâmetros de precisão, exatidão e linearidade, à semelhança de orientação preconizada na resolução RE 475 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 19 de março de 2002 (BRASIL LEIS E DECRETOS, 2002) de forma a verificar-se as possíveis variações das condições de análise, decorrentes por exemplo do equipamento, operações analíticas e amostra. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 48, 49 e 50 e figuras 12, 13 e 14.

Com relação às análises de alcachofra a Farmacopéia Brasileira 3ª edição de 1977 descreve um método de extração e doseamento de cinarina por espectrofotometria entretanto a descrição do método apresenta-se superficial e imcompleta (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Na versão mais atual não consta esta monografia (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Apesar de algumas literaturas científicas mostrarem análise de flavonóides da alcachofra por cromatografia em camada delgada, este método é incapaz de quantificar estes compostos com prescisão (GEBHARDT & FAUSEL, 1997; FINZELBERG, 1998).

A cromatografia líquida de alta eficiência seria a metodologia mais adequada para a realização destas análises. Foram testados os procedimentos encontrados em literaturas para extração e

identificação/quantificação (ADZET E PUIGMACIA, 1985; FINZELBERG, 2000). O método descrito por Adzet e Puigmacia está descrito superficialmente, não especificando sequer a quantidade de solvente de extração e nem a concentração da fase móvel (ADZET E PUIGMACIA, 1985). A Finzelberg da Alemanha gentilmente cedeu a metodologia de determinação de ácidos caffeoquínicos por eles utilizada, entretanto esta por ser direcionada a extratos secos, os resultados para a droga vegetal *in natura* foram insatisfatórios, sendo inclusive indetectável para a resposta referente a cinarina (FINZELBERG, 2000). Portanto infelizmente, as análises correspondentes à alcachofra proveniente dos três fornecedores não puderam ser realizadas tendo em vista a inviabilidade de metodologias de extração e de análise por CLAE capazes de detectar e dosear o marcador desta droga vegetal de maneira satisfatória. Estes resultados seriam de extrema importância visto que na inspeção visual (Figura 01) observou-se diferenças consideráveis entre as alcachofras provenientes dos fornecedores A, B e C. Acresce momentaneamente a dificuldade na aquisição de substâncias químicas de referência, esgotadas nos estudos feitos, tendo em vista a dificuldade de importação. Desta forma, abre-se mão do desenvolvimento desta etapa do trabalho, permanecendo eventualmente para inclusão em Projeto de Doutorado, que se tenciona desenvolver.

A precisão e exatidão dos métodos de análise das drogas vegetais por CLAE estão apresentadas na tabela 48. A precisão foi determinada em intercorridas com 3 concentrações de marcador, 100% (teor encontrado nas drogas vegetais), 70% e 130% com 3 réplicas de cada e está expressa como desvio padrão relativo – DPR - ou coeficiente de variação. Todas as amostras apresentaram DPR menor que 15%, valor considerado máximo pela resolução RE 475. Já a exatidão avaliada interdias e intercorridas foi calculada tendo por base as curvas de calibração (Figuras de 12 a 14) e apresentaram variações de no mínimo 94,32% para 70% de guaraná e no máximo de 122,05% para 70% de ginkgo biloba. Foram consideradas satisfatórias, por se tratar de drogas vegetais que possuem vários interferentes, nem sempre eliminados pelo processo de extração.

Na tabela 49 podemos observar as concentrações dos marcadores nas drogas vegetais não submetida a processo de descontaminação por óxido de etileno. Os resultados obtidos do teor de cafeína no guaraná foram 3,52%, 4,01% e 3,83% respectivamente para os fornecedores A, B, e C, estes estão de acordo com a Associação Brasileira de Indústrias Alimentícias que na publicação da Comissão Brasileira de Legislação e Padrões para Alimentos estabelece que: "O teor de cafeína esperado é de mínimo 3%" (BRAZILIAN NATIONAL COMMISSION OF LEGISLATION AND STANDARDS FOR FOOD, 1985). Carlson e Thompson em 1998 declararam que o teor de cafeína no guaraná deve ser entre 3 a 6% (CARLSON E THOMPSON, 1998).

No que se refere ao ginkgo biloba o teor de glicosídeos flavonóicos, descrito na Farmacopéia Americana XXV, deve ser maior que 0,8% e portanto os resultados de 1,21%, 1,50% e 1,34% estão satisfatórios. Hasler, Sticher e Meier na Alemanha em 1992 publicaram estudo comparativo entre teores de glicosídeos flavonóicos provenientes de folhas de ginkgo biloba colhidas em diferentes meses do ano e obtiveram concentrações que variavam de 0,29 a 1,11% (HASLER, STICHER E MEIER, 1992).

De maneira contrária a concentração de apigenin-7-glucoside das camomilas provenientes dos fornecedores A e B foram 0,16 e 0,27% respectivamente e encontram-se com teor abaixo de 0,3%, especificado pela USP XXV. Apesar do fornecedor A não ter apresentado o certificado de análise, podemos considerar que este resultado pode ser proveniente de diferentes dadas de colheita. As datas de colheita diferem em 3 meses, os fornecedor B e C colheram seus produtos nos meses de agosto e maio de 2001 respectivamente. Ambas as drogas em questão foram cultivadas no Brasil mas apenas o fornecedor C indicou a região. A diferença de clima também é um fator importante na concentração dos marcadores nas drogas vegetais (OLIVEIRA E COLABORADORES, 1998). Estudo realizado por Redaelli e colaboradores apresentou diferentes conteúdos de apigenina-7-glucosideo em camomilas provenientes de países como Argentina (5,02%) e Italia (2,85%) (REDAELLI E COLABORADORES, 1981).

Devido ao fato de estarmos analisando as mesmas drogas vegetais, somente diferenciando o fornecedor, adotou-se como escolha para as análises de princípios ativos naturais após os ciclos de exposição ao gás óxido de etileno as drogas provenientes do fornecedor C. Como se pode observar na tabela 50, a exposição de 30 e 60 minutos ao agente descontaminante não promoveu efeitos deletéricos nas concentrações e tempo de retenção dos marcadores utilizados. Variações menores que 5% foram consideradas aceitáveis como erros analíticos.

Os resultados apresentados neste estudo comprovam a necessidade de implantação de medidas mais sérias na fiscalização de drogas vegetais comercializadas, seja na qualidade física, microbiológica ou química afim de que os fornecedores adeqüem-se aos requisitos de qualidade impostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da RDC 17 de 2000 (BRASIL LEIS E DECRETOS, 2000).

Evidenciou-se a eficácia e segurança da descontaminação de drogas vegetais por óxido de etileno, visto que é um potente agente antimicrobiano de resíduos facilmente removíveis e que não interfere na identificação e doseamento dos marcadores estudados. Vale lembrar na necessidade de cuidados especiais na manipulação e remoção de resíduos, regras essenciais que infelizmente nem sempre são adotadas no mercado nacional.

Conclusão

VII – CONCLUSÃO

1. Os laudos de análise de alcachofra, camomila, ginkgo biloba e guaraná avaliados, apesar da omissão do fornecedor A, apresentaram resultados não uniformes entre si;

2. As embalagens nas quais as drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C foram recebidas protegem o material em questão, entretanto o fato de a maioria das embalagens serem de polietileno facilita a retenção de umidade no interior promovendo a proliferação de bactérias e fungos;

3. Não houve uniformidade entre as amostras de alcachofra, camomila, ginkgo biloba e guaraná provenientes dos fornecedores A, B e C no quesito inspeção visual, tendo sido encontrados materiais de origens mineral, vegetal e animal;

4. Na alcachofra, camomila, ginkgo biloba e guaraná analisados continham elevados níveis de bactérias e fungos, e não evidenciaram interferentes relevantes no teste de contagem microbiana. Foram detectados microrganismos patogênicos nas amostras estudadas;

5. A exposição das drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C, de 30 e 60 minutos ao gás óxido de etileno é capaz de eliminar cerca de 90% e 99,8% respectivamente da carga microbiana inicial de drogas vegetais com biocarga da ordem de 10^5;

6. A exposição de drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C de 30 minutos ao gás óxido de etileno foi capaz de eliminar todos os patogênicos específicos encontrados anteriormente;

7. Os residuais de etilenoglicol e etilenocloridrina nas amostras de alcachofra, camomila, ginkgo biloba e guaraná, após os ciclos de exposição ao gás óxido de etileno, mantiveram-se dentro do limite de sensibilidade do método adotado;

8. Os níveis residuais de óxido de etileno, após exposição de 30 e 60 minutos das drogas vegetais analisadas, foram reduzidos a índices aceitáveis após 14 dias de aeração ambiental;

9. As camomilas provenientes dos fornecedores A e B encontraram-se, anteriormente ao tratamento, com níveis de apigenina-7-glucosideo menores que o exigido pela USP XXV;

10. Não houve alteração nas concentrações dos marcadores das drogas vegetais camomila, ginkgo biloba e guaraná analisadas mesmo após ciclo de exposição de 60 minutos ao gás óxido de etileno.

11. O processo de descontaminação de drogas vegetais por óxido de etileno é um processo eficaz e seguro, desde que sejam adotados os requisitos de segurança necessários.

Referências Bibliográficas

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADZET, T., PUIGMACIA, M. Higth performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolimus* L. leaves. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.348, p.447-453, 1985.

2. ALFA, M.J., DEGAGNE, P., OLSON, N., PUCHALSKI, T. Comparisson of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorefore, v.17, p.92-100, 1996.

3. ARAÚJO, A.L.A. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feiras livres do município de São Paulo e de infusos derivados. São Paulo, 1998. 82p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

4. ARORA, D.K., RAI, B., MUKERJO, K.G., KNUDSENG, G.R., eds. **Soil and plants**. New York: Marcel Dekker, p.552-633, 1991 (Handbook of applied mycology, v.1).

5. AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD AUTORITY, MRL for Ethylene oxide in herbs and spices, Sidney, 29 nov. 2000. 9p.

6. AZUGARAY, D., AZUGARAY, C. **Plantas que curam**: a natureza a serviço da sua saúde. Rio de Janeiro: Ed. Três, p.15-22, 1983.

7. BANOV, D., DE PAOLA, V.R.V., RIBEIRO, M.E., *Ginkgo biloba* na fitocosmética: um potencial a ser explorado na ação contra os radicais livres e no combate ao envelhecimento cutâneo. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.11, p.44-48, 1999.

8. BICCHI, C., FRATTINI, C.; Determination of Ethylene Oxide Residues in Vegetable Substances., **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 52, p. 261-266, 1982.

9. BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p.57-59, 656-673.

10. BOLANDER, C.R., TOMA, R.B., DAVIS, R.M., MEDORA, N.P. Irradiated versus fumigated spices in sausage. **J. Sci. Nutr.**, London, v.46, n.4, p.319-325, 1995.

11. BRADLY, P., JACOBS, M.D., WARREN, S.B. *Ginkgo biloba*: a living fossil, Excerpta Medica. **Am. J. Med.**, New York, v.108, p.341-342, 2000.

12. BRASIL. Portaria n.6/MS/SNVS, de 31 de janeiro de 1995. Normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao serviço de vigilância sanitária. Lex coletânia de legislação e jurisprudência n° 59, jan.-mar. 1995. p.423-427.

13. BRASIL. Resolução RDC n.17, de 24 de Fevereiro de 2000. Normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao serviço de vigilância sanitária. Lex coletânia de legislação e jurisprudência n° 64, 25 fev. 2000. p.1050-1058.

14. BRASIL. Resolução – ANVS/DC n° 84 Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 19 de março de 2002. Determinar a publicação do Guia para valiação de métodos analíticos. Lex coletânia de legislação e jurisprudência n° 66, mar.2002, p.1005-1014.

15. BRASIL. Portaria Interministerial n.482, de 16 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico sobre os procedimentos de instalações de

Unidade de Esterilização por óxido de etileno e de suas misturas e seu uso, bem como, de acordo com as suas competências, estabelecer as ações sob a responsabilidade do Ministério da Saúde e Ministério do Trabalho e Emprego. Lex coletânia de legislação e jurisprudência nº 63, abr.1999. p.1961-1978

16. BRAZILIAN NATIONAL COMMISSION OF LEGISLATION AND STANDARDS FOR FOOD. Food Legislation Compendium. ABIA (Brazilian Association of Food Industries), São Paulo, v.1, 1985. *In*: SALVADORI, M.C.; RIESER, E.M., RIBEIRO NETO, L., NASCIMENTO, E.S.; Determination of Xantines by High-performance Liquid Chromatography and Thin-layer Chromatography in Horse Urine After Ingestion of Guaraná Powder, **Analisty**, Cambridge, v.119, p.2701-2703, 1994.

17. BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2.ed. Paris: Lavoisier, 1999. p.247-248.

18. CALAPAI, G., CRUPI, A., FIREZUNOLI, F., MARCIANO, M.C., SQUADRITO, F., INFERRERA, G., PARISI, M.C., RIZZO, A., CRISAFULLI, C., FIORE, A., CAPUTI, A.P. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide syntesis. **Life Sci.**, New York, v.67, p.2673-2683, 2000.

19. CARDEAL, Z.L., PRADEAU, D., LEJEUNE, B., HAMON, M.; Determination of residual ethylene oxide by two gas chromatography methods, **Analusis,** Paris, v.22, p.23-26,1994.

20. CARLSON, M., THOMPSON, R.D., Liquid Chromatography Determination of Methylxantines and Cathechins in Herbal

Preparations Containing Guaraná, **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v. 81 (4), p.691-701, 1998

21. CHAIGNEAU, M., MURAZ, B. Decontamination of some spices by ethylene oxide: development of 2- chloroethanol and ethylene glicol during the preservation. **Ann. Pharm. Fr.**, Vineuil, v.51, n.1, p.47-53, 1993.

22. DEFEUDIS, F.V. ***Ginkgo biloba* extract (EGB 761)**: pharmacological activities and clinical applications. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.10-11.

23. DREISBACH, R.H., ROBERTSON, W.O. **Handbook of poisoning**: prevention, diagnosis, and treatment. 12.ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1987. p.159-160, 175-176.

24. ELLENHORN, M.J., SCHONWALD, S., ORDOG, G., WASSERBERGER, J. **Ellenhorn's medical toxicology**: diagnosis and treatment of human poisoning. 2.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p.160-161, 1211-1214.

25. ENGLISCH, W., BECKERS, C., UNKAUF, M., RUEPP, M., ZINSERLING, V. Efficacy of artichoke dry extract in patients with hiperlipoproteinemia. **Arzneim.-Forsch.**, Aulendorf, v.50, n.1, p.260-265, 2000.

26. FARMACOPÉIA BRASILEIRA 3ª ed. São Paulo: Atheneu São Paulo, 1977. p. 829, 800.

27. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu São Paulo, 1988. p. v.2.9, v.5.1.6, v.5.1.7.

28. FERREIRA, S.H., org. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 132p.

29. FINZELBERG, Testing procedure C05, Quantitative HPLC determination on Caffeoylquinic acids (calculated as clorogenic acid) in extracts from artichoke leaves, Andernarc, p.6, 2000.

30. FINZELBERG, Testing procedure I292, TLC-Fingerprint chromatogram on flavonoids in extracts from artichoke leaves, Andernarc, p.4, 1998.

31. FISCHER, D.C.H. Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida. São Paulo, 1992. 161p. (Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

32. FOWLES, J., MITCHELL, J., McGRATH, H. Assessment of cancer risk from ethylene oxide residues in spices imported into New Zealand. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.39, p.1055-1062, 2001.

33. FOWLES, J. Assessment of cancer risk from ethylene oxide residues in New Zealand spices, New Zealand Ministry of Health, 1999, 18p.

34. GARCIA, E.S., SILVA, A.C.P., GILBERT, B., CORRÊA, C.B.V., CAVALHEIRO, M.V.S., SANTOS, R.R., TOMASSINI, T. Fitoterápicos. INCQS. Disponível em: http://www.bdt.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10. Acesso em: 15 jul. 2001.

35. GEBHARDT, R., Artischockenextrakt – *in vitro* -Nachweis einer Hemmwirkung auf die Cholesterinbiosynthese. *Medwelt*, v.46, 348, 1995. Apud: ENGLISCH, W., BECKERS, C., UNKAUF, M., RUEPP,

M., ZINSERLING, V. Efficacy of artichoke dry extract in patients with hiperlipoproteinemia. **Arzneim.-Forsch.**, Aulendorf, v.50, n.1, p.260-265, 2000.

36. GEBHARDT, R. Inhibition of cholesterol biosyntesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v.286, n.3, p.1122-1128, 1998.

37. GEBHARDT, R.; FAUZEL, M.; Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes, **Toxicol. in Vitro**, Amsterdam, v.11, p.669-672, 1997.

38. GOTTLIEB, O., KAPLAN, M.A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Cienc. Hoje**, Rio de Janeiro, v.15, n.89, p.51-54, 1993.

39. GUNTHER, D.A. The chemistry and biology of EtO sterilization. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, v.6, p.31-35, 1980.

40. HASLER. A., STICHER, O., MEIER, B., Identification and determination of the flavonoids from Ginkgo biloba by high-performance liquid chromatography, **J. Chromat.**, Amsterdam, v.605, p.41-48, 1992.

41. HEFTMANN, E. **Chromatography**. 2.ed. New York: Reinhold, 1967. p.182-209 (Reinhold chemistry textbook series).

42. HENMAN, A.R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspective on an economic plant of the central Amazon Brasil. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v.6, p.311-338, 1982.

43. HUANG, K.C. **The pharmacology of Chinese herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.11-13.

44. IARC, IARC Monographys on the Evaluation of Cracinogenic Risk to Humans. v.60. Some industrial Chemicals. p.73. Updated 1997. International, Agency for Research on Cancer. Apud: FOWLES, J., MITCHELL, J., McGRATH, H. Assessment of cancer risk from ethylene oxide residues in spices imported into New Zealand. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.39, p.1055-1062, 2001.

45. ITO, H., KAMAKURA, H., SEKITA, S. Distribution of microorganisms in herb medicines and their decontamination by gamma-irradiation. **Food Irradiat.**, Saclay, v.34, n.1/2, p.16-22, 1999.

46. JENSEN, K.G. Determination of ethylene oxide residues in processed food products by gas-liquid cromatography after derivatization. **Z. Lebensm.-Unters. Forsch**, Berlin, v.187, n.6, p.535-540, 1998.

47. KAYE, M.M., NEVELL, T.G. Statistical evaluation of methods using headspace gas chromatography for the determination of ethylene oxide. **Analyst**, Cambridge, v.110, p.1067-1071, 1985.

48. KAYE, S. The sterilizing action of gaseus ethylene oxide. III. The effect of ethylene oxide and related compounds upon bacterial aerosols. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.50, p.289-295, 1949.

49. KAYE, S., PHILLIPS, C.R. The sterilizing action of gaseus ethylene oxide. IV. The effect of moisture. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.50, p.296-306, 1949.

50. KATUSIN-RAZEM, B., NOVAK, B., RAZEN, D.; Microbiological decontamination of botanical raw materials and corresponding pharmaceutical products by irradiation., **Rad. Phys. and Chem..**, Amsterdam, v.62, p.261-275, 2001.

51. KERELUK, K., GAMMON, R.A., LLOYD, R.S. Microbiological aspects of ethylene oxide sterilization. II. Microbial resistance to ethylene oxide. **Appl. Microb.**, Baltimore, v.19, n.1, p.152-156, 1970.

52. KINGHORN, A.D., BALANDRIN, M.F. **Human medicinal agents from plants**. Washington: American Chemical Society, 1993. p.29-30.

53. KRAFT, K. Artichoke leaf extract – Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine*, v.4, p.369-378, 1997. Apud: ARTICHOKE extract: improves digestion, liver function, and cholesterol levels. **Nat. Med. J.**, Stamford, v.1, n.7, p.22-24, 1998.

54. LAO, N.T., LU, H.T.C., REGO, A., KOSAKOWSKI, R.H., BURGESS, D.J., HUME, R.D. Interlaboratory comparison of analytical methods for residual ethylene oxide at low concentration levels in medical device material. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.84, n.5, p.647-655, 1995.

55. LÉVIS-STRAUSS, C. A ciência do concreto. Apud: **O pensamento selvagem**. Campinas: Papirus, 1989. p.15-50.

56. MARLETTA, J., STUMBO, C.R. Some effects of ethylene oxide on *Bacillus subtilis*. **J. Food Sci.**, Chicago, v.35, p.627-631, 1970.

57. MARLOWE, D.E., LAO, N.T., EATON, B.T., PAGE, B.F.J., LAO, C.S. Interlaboratory comparison of analytical methods for residual ethylene oxide in medical device material. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.76, n.4, p.333-337, 1987.

58. MATTEI, R., DIAS, R.F., ESPINDOLA, E.B., CARLINI, E.A., BARROS, S.B.M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in

laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v.60, p.111-116, 1998.

59. Mc DONALD, R.L. Method of sterilizing. U.S. Pat. 3.068.064, 1962. Apud: PHILLIPS, G.B., MILLER, W.S., eds. **Industrial sterilization.** Durham: Duke University Press, 1972. p.181-208.

60. McNAIR, H.M., BONELLI, E.J. **Basic gas chromatography**. Berkeley: Varian Instrument Division Offices, 1968. 306 p.

61. MICHAEL, G.T., STUMBO, C.R. Ethylene oxide sterilization of *Salmonella senftenberg* and *Escherichia coli*: death kinetics and mode of action. **J. Food Sci.**, Chicago, v.35, p.631-634, 1970.

62. MORS, W. Plantas medicinais. **Cienc. Hoje**, Rio de Janeiro, v.1, n.3, p.51-54, 1982.

63. MOUSINHO, M.C. Identificação de alcalóides xatínicos do guaraná (*Paulinia cupana* H.B.K.) por cromatografia por camada delgada em amostras de urina. São Paulo, 1984. 122 p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

64. MURAZ, B., CHAIGNEAU, M. Sur la décontamination des épices par l'oxide d'ethylène: cas du girofle (*Eugenia caryophyllus* Spreng.) et du poivre blanc (*Piper nigrum* L.). **Ann. Pharm. Fr.**, Vineuil, v.43, n.1, p.15-21, 1985.

65. NATIONAL FORMULARY XXIII, 1970, United States Pharmacopeial Convention. Apud: PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., O'HARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.75-95.

66. NG, L.L. **Reviewer guidance validation of chromatographic methods.** Center for Drug Evaluation and Reserch, 1994. p.9.

67. NICOLETTI, M.A., ORSINE, E.M.A. Preparação de comprimidos contendo pó de semente de guaraná. São Paulo: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, 1997. 48p.

68. NIESINK, R.J.M., VRIES, J., HOLLINGER, M.A. **Toxicology**: principles and applications. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.828, 1109.

69. NOGUEIRA, M.H., AVELAR, M.C., BARRETTO, H.H.C., CARDOSO, D.P.A. Resíduos tóxicos em cânulas e seringas esterilizadas e reesterilizadas com óxido de etileno. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.49, n.1, p.27-34, 1989.

70. NOLDNER, M., CHATTERJEE, S.S. International Patent A61K31/365, 35/78, WO, 93/12784, Willmar Schwabe Gmbh & Co., 1993. Apud: WHITE, H.L., SCATES, P.W., COOPER, B.R. Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. **Life Sci.**, New York, v.58, p.16, p.1315-1321, 1996.

71. OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: ATHENEU, 1998. p.7, 16-17.

72. OLIVEIRA, D.C. Esterilização por óxido de etileno: estudo da efetividade esterilizante de misturas não explosivas e compatíveis com a camada de ozônio. São Paulo, 2000. 159p (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

73. UNITED STATES. Department of Labor. Occupacional Safety & Health Administration. Home Index Search. Disponível em:

http://www.osha-slc.gov/OshDoc/Fact-data/FSNO95-17.html. Acesso em: 20 jan. 2001.

74. PECZAR, M. **Microbiologia**. Maryland: MacGraw-Hill do Brasil, 1980. v.1, p.779-804.

75. PETKOV, V.D., HADJHVANOVA, C., PETKOV, V.V., MILANOV, S., VISHENA, N., BOYADJIEVA, N., Phytother.res, 1993, 7 139-145. Apud: WHITE, H.L., SCATES, P.W., COOPER, B.R. Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. **Life Sci.**, New York, v.58, n.16, p.1315-1321, 1996.

76. PINTO, T.J.A. Aspectos fundamentais na avaliação do monitor biológico para esterilização por oxido de etileno. São Paulo, 1991. 203p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

77. PINTO, T.J.A., CRUZ, J.M. Estudo de estabilidade de monitores biológicos para esterilização por óxido de etileno. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v.77, n.2, p.68-70, 1996.

78. PINTO, T.J.A., CRUZ, J.M. Influência da natureza do suporte empregado para inóculo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 na resistência do monitor biológico. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v.77, n.2, p.53-56, 1996.

79. PINTO, T.J.A., GAMOEDO, L.H.C. Esterilização por óxido de etileno. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, São Paulo, v.6, n.4, p.58-67, 2002.

80. PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., O'HARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.75-95.

81. PINTO, T.J.A., SAITO, T. Esterilização por óxido de etileno. I. Influência do meio de esporulação na resistência dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger*. **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.26, n.6, p.379-383, 1992.

82. PINTO, T.J.A., SAITO, T. Esterilização por óxido de etileno. II. Influência de corpos de prova no desempenho de monitores biológicos e sua avaliação. **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.26, n.6, p.384-391, 1992.

83. PHILLIPS, C.R. The sterilizing action of gaseus ethylene oxide. II. Sterilization of contamined objects with ethylene oxide and related compounds: time, concentration and temperature relationships. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.50, p.280-288, 1949.

84. PHILLIPS, C.R., KAYE, S. The sterilizing action of gaseus ethylene oxide. I. Review. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.50, p.270-279, 1949.

85. POLUNIN, M., ROBBINS, C. **The natural pharmacy**. New York: Collier Books, 1992. p.98, 114.

86. PORSOLT, R.D., MARTIN, P., LENEGRE, A., FROMAGE, S., DRIEU, K. Pharmac.Biochem. Behav., 1990, 36 963-971. Apud: WHITE, H.L., SCATES, P.W., COOPER, B.R., Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. **Life Sci.**, New York, v.58, n.16, p.1315-1321, 1996.

87. REDAELLI, C., FORMENTINI, L., SANTANIELLO, E; Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Apigenin and its Glucosides in Flowers of Matricaria chamomilla and Chamomile Extracts., **Planta Medica**, Stuttgart, v.42, p.288-292, 1981.

88. RONG, Y., GENG, Z., LAU, B.H.S., *Ginkgo biloba* attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. Free Radical Biology and Medicine. 1996; 20(1):121-127. Apud: CALAPAI, G., CRUPI, A., FIREZUNOLI, F., MARCIANO, M.C., SQUADRITO, F., INFERRERA, G., PARISI, M.C., RIZZO, A., CRISAFULLI, C., FIORE, A., CAPUTI, A.P. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide syntesis. **Life Sci.**, New York, v.67, p.2673-2683, 2000.

89. RUSSEL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of desinfection, preservation and sterilization**. Oxford: Blackwell Scientific, 1982. 653p.

90. SÁ, E.N.M. Plantas medicinais. Recife:Universidade Federal de Pernambuco, 1998. Disponível em: http://www.geocities.com/plantas_medicinais. Acesso em: 20 jan. 2001.

91. SALVADORI, M.C., RIESER, E.M., RIBEIRO NETO, L., NASCIMENTO, E.S. Determination of Xantines by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography in horse urine after ingestion of guaraná powder. **Analisty**, Cambridge, v.119, p.2701-2703, 1994.

92. SHEALY, C.N. **The illustrated encyclopedia of healing remedies**. Dorset: Element, 1998. p.122, 204-205.

93. SPITZ, D.H., WEINBERGER, J. Determination of ethylene clorohydrin, and ethylene glicol by gas chromatography. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.60, n.2, p.271-273, 1971.

94. TESKE, M., TRENTINI, A.M. **Herbarium**: compêndio de fitoterapia. 2.ed. Curitiba: Herbarium, 1995, p.I-XII.

95. UNICAM Chromatography, **Users Manual**, London: UNICAN, 1998, 257p.

96. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 11.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. Apud: PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., O'HARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.75-95.

97. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 12.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. Apud: PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., O'HARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.75-95.

98. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 13.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. Apud: PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., O'HARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.75-95.

99. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1997. Apud: PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., O'HARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.75-95.

100. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.1954, 1982, 2028, 2256, 2435, 2458, 2530, 2556.

101. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2001. p.1954, 1982, 2028, 2256, 2435, 2458, 2530, 2556.

102. VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: Americam Public Health Association, 1992. p.24-48, 75-96, 239-250.

103. WHITE, H.L., SCATES, P.W., COOPER, B.R., Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. **Life Sci.**, New York, v.58, n.16, p.1315-1321, 1996.

104. WINARNO, F.G., STUMBO, C.R. Mode of action of ethylene oxide on spores of *Clostridium botulinum* 62A. **J. Food Sci.**, Chicago, , v.36, p.892-895, 1971.

105. WOJCIK-O'NEILL, K.M., ELLO, M. Equivalency of hydrocloric acid and distilled water extraction media for determining residual ethylene oxide in medical devices. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.80, n.8, p.783-784, 1991.

106. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plants materials**. Geneva: WHO, 1992. 48-56p.

107. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Good manufacturing practices for pharmaceutical products**: supplementary guidelines for the manufacture of herbal medicinal products. Geneva: WHO, 1993. 5p.

108. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Selected medicinal plants**. Geneva: WHO, 1999. p.154-167. (WHO monographs on selected medicinal plants, v.1).

109. WOODROW, J.E., McCHESNEY, M.M., SEIBER, J.N. Determination of ethylene oxide in spices using headspace gas chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.2126-2129, 1995.