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

Irradiação de drogas vegetais: aspectos microbiológicos e químicos

Renata Rabelo Soriani

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Terezinha de Jesus A. Pinto

São Paulo
2004

Renata Rabelo Soriani

Irradiação de drogas vegetais: aspectos microbiológicos e químicos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
orientador/presidente

Profa. Dra. Célia Hitomi Yamamoto

Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara

São Paulo, 19 de abril de 2004.

*Aos meus pais, **Marilene** e **Pascoal**, por todo amor, dedicação e apoio.*

*Às minhas irmãs **Rosângela**, **Regina** e **Rachel** e ao meu irmão **Roberto** que, embora distantes e, cada um da sua maneira, sempre me apoiaram.*

*À professora **Terezinha** pelo exemplo de dedicação, sabedoria e competência e, principalmente, pela compreensão, carinho e respeito.*

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo pela concessão da bolsa.

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e aos funcionários *Elizabeth Claro S. Paiva*, *Elaine M. Ychico* e *Jorge de Lima.*

À Empresa Brasileira de Radiações (EMBRARAD) pela irradiação das drogas vegetais.

Às empresas Herborista e Santos Flora pela doação das amostras.

À professora *Nádia Bou Chacra* pelo incentivo e pela grande ajuda na confecção deste trabalho.

Às professoras *Mitsuko T. Ohara* e *Telma M. Kaneko*, pelas sugestões e contribuições.

À amiga *Lucília C. Satomi* pela receptividade no início do Mestrado e acima de tudo pela amizade e apoio no decorrer de todo o trabalho.

À amiga *Débora C. de Oliveira* pelo constante incentivo, compreensão e grande amizade.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, *Fernando Vitalli, José de S. Sobrinho, Juliano Morais, Patrícia Lopes* e *Irene Satiko Kikuchi* pela amizade, contribuições e por suportarem minhas plantinhas durante todo o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CONFAR) pela grande ajuda nas análises cromatográficas.

Ao amigo *Márcio Ferrarini* pelas sugestões e pela atenção dispensada.

À *Adriana Bugno* do Instituto Adolfo Lutz pela identificação dos fungos.

À *Denise* e *à Sandra* do Laboratório de Microbiologia RD dos Laboratórios Stiefel Ltda. pela confirmação da identidade das cepas bacterianas.

Ao Laboratório de Farmacognosia pelo suporte na realização das extrações das drogas vegetais.

Aos amigos *Diogo de Oliveira Silva* e *Iguatemi Melo Costa,* do Laboratório de Compostos Heterocíclicos, pelo auxílio nas análises por cromatografia gasosa.

Às amigas *Andréa dos Santos, Lena M. Nakajima*, *Maria Juliane Beraldo*, *Tatiana B. Moraes* e, em especial, às amigas *Luciana Meneghelli* e *Paula C. M. Koga* (companheiras de moradia), pela amizade e companheirismo.

À *Mônica Inês Casajus* pela análise estatística dos resultados.

Aos bibliotecários do Conjunto das Químicas pelo constante apoio e pela revisão das referências bibliográficas.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Apesar da industrialização no setor farmacêutico, o emprego de drogas vegetais constitui desafio atual quando considerado alternativa terapêutica para as populações de baixa renda ou aquelas que apresentam tradição no uso dessas drogas. Além disso, tendências modernas valorizam a variedade de espécies com propriedades curativas, em particular as espécies brasileiras, desafiando os pesquisadores a intensificar investigações nessa área e induzindo à população um crescente consumo. Assim, questões relacionadas à qualidade dessas drogas apresentam fundamental importância. Devido à origem, a carga microbiana detectada nas mesmas é 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. Além disso, a eficácia terapêutica pode igualmente ser comprometida por decomposição de componentes, decorrente da ação de microrganismos. Com o objetivo de eliminar os efeitos decorrentes da biocarga presente nas drogas vegetais, agentes descontaminantes, de natureza física ou química, têm sido empregados. A utilização de tais procedimentos de descontaminação, prevista na legislação vigente, requer estudos relacionados à estabilidade dos princípios ativos após exposição ao agente selecionado. Dentre os agentes destaca-se a irradiação gama, amplamente utilizada em função de sua aplicabilidade na ausência de água e de temperatura elevada, além de apresentar alta penetrabilidade e reduzir, com eficácia, a carga microbiana viável. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar os efeitos de diferentes doses de radiação ionizante sobre a carga microbiana de quatro espécies de drogas vegetais: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.), bem como detectar possíveis alterações provocadas pela radiação sobre os teores de seus princípios ativos. As análises microbiológicas e químicas foram realizadas antes e após irradiação com doses médias de 5,5 kGy, 11,4 kGy e 17,8 kGy. Os resultados obtidos anteriormente à irradiação revelaram elevados níveis de contaminação: média de $4,1 \times 10^6$ para microrganismos aeróbicos totais e $3,3 \times 10^5$ para fungos. Após descontaminação, a dose média de 11,4 kGy, reduziu a carga de microrganismos aeróbicos totais a níveis menores ou iguais a 10^2 em todas as drogas, com exceção da camomila proveniente do fornecedor B ($3,2 \times 10^4$). Para os fungos, a menor dose aplicada (5,5 kGy) foi suficiente para reduzir a contagem a níveis da ordem de 10. Com relação à determinação dos marcadores nas drogas vegetais, os resultados obtidos não revelaram alterações significativas nos teores de cafeína no guaraná e de glicosídeos flavonoídicos no ginkgo. Para a camomila, as amostras antes a após irradiação, apresentaram o mesmo teor de óleo volátil bem como ausência de diferenças significativas no teor de α-bisabolol. Em contraste, observou-se redução no teor de 7-glicosil apigenina após submissão à radiação ionizante, indicando degradação decorrente do processo. Com relação à alcachofra, permanece ainda desconhecida a influência da radiação devido à ausência de metodologias adequadas para extração e determinação da cinarina.

ABSTRACT

Despite industrialization in the pharmaceutical area, the use of vegetable drugs is being considered a therapeutical alternative either for underprivileged people or for those who are already used to their consumption. Furthermore there is presently a tendency to value those species with healing property, mainly the Brazilian ones, what is stimulating research and their increasing consumption. Thus, issues concerning the quality of such drugs are extremely important, mainly due to the fact that their microbial load offers potential risks to consumers. Consequently, the evaluation of their sanitary conditions has become fundamental, also owing to the fact that their therapeutical efficacy can be harmed by the decomposition of their components, as a result of the action of microorganisms. Therefore, physical or chemical decontamination has been employed as a measure to reduce the bioburden. Although these procedures are being legally performed they require studies concerning the stability of the active principles after the process. Gamma irradiation has been one of the most important decontaminating agents, widely used due to its applicability in the absence of water or high temperature and to its property of presenting high penetration and efficiently reducing the viable microbial load. This work aimed at evaluating the effects of different radiation doses over the microbial burden of four kinds of vegetable drugs: artichoke (*Cynara scolymus* L.), chamomile (*Matricaria recutita* L.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) and guarana (*Paullinia cupana* H.B.K.). The detection of possible alterations provoked by radiation on the contents of their active principles has also been a goal of this study. The microbiological and chemical analyses were performed before and after irradiation with average doses of 5,5 kGy, 11,4 kGy and 17,8 kGy. The results revealed high contamination levels: average of $4,1 \times 10^6$ for total aerobic microorganisms and $3,3 \times 10^5$ for fungi. After decontamination the average dose of 11,4 kGy reduced the total aerobic microbial count to levels below or equal to 10^2 in all drugs, except the chamomile provided by supplier B ($3,2 \times 10^4$). For fungi, the lowest dose applied (5,5 kGy) was enough to reduce the count to a level of 10. As to the determination of markers in vegetable drugs, the results obtained presented no significant alterations in cafein contents of guarana or in flavonol glycosides of ginkgo. The samples of chamomile, both prior to and after radiation presented the same yield of essential oil as well as absence of significant differences in the contents of α-bisabolol. On the other hand, a reduction in the concentration of apigenin-7-glycoside after irradiation was observed, what indicates degradation caused by the process. The influence of radiation over artichoke remains unknown due to the absence of adequate methods of extraction and determination of cinarin.

SUMÁRIO

1 Introdução **17**

2 Revisão de Literatura **19**

2.1 Contaminação microbiana em drogas vegetais 19

2.2 Padrões microbianos em drogas vegetais 20

2.3 Conceitos gerais sobre radiações 23

2.4 Emprego da radiação ionizante 25

2.5 Mecanismo de ação antimicrobiana da radiação ionizante 26

2.6 Efeitos da irradiação sobre os constituintes químicos de drogas vegetais 29

2.7 Estabilidade microbiológica e química durante armazenamento de drogas vegetais irradiadas 31

2.8 Características gerais das drogas vegetais utilizadas 33

8.1. Alcachofra 33

8.2. Camomila 34

8.3. Ginkgo 35

8.4. Guaraná 36

3 Objetivos **38**

4 Material e métodos **39**

4.1 Material 39

4.2 Métodos 39

4.2.1 Determinação do teor de água nas drogas vegetais 39

4.2.1.1 Preparo da amostra 39

4.2.1.2 Perda por dessecação: método gravimétrico 40

4.2.2 Avaliação da qualidade microbiana das amostras 40

4.2.2.1 Preparo das amostras 40

4.2.2.2 Validação do método de contagem microbiana (semeadura da amostra em profundidade) 40

4.2.2.3 Contagem de microrganismos aeróbicos totais e fungos 41

4.2.2.4 Contagem de enterobactérias 42

4.2.2.5 Pesquisa de microrganismos patogênicos específicos 42

4.2.2.5.1 Enriquecimento em meios de cultura não seletivos 43

4.2.2.5.2 Enriquecimento em meio seletivo para pesquisa de *Salmonella* sp 43

4.2.2.5.3 Isolamento em meio seletivo 43
4.2.2.5.4 Identificação presuntiva 45
4.2.2.5.5 Identificação propriamente dita 45
4.2.2.6 Pesquisa de bolores do gênero *Aspergillus* 46
4.2.3 Exposição à radiação ionizante 46
4.2.4 Análise da eficácia descontaminante do processo 47
4.2.5 Análise de alterações nos teores dos princípios ativos das drogas vegetais 47
4.2.5.1 Validação dos métodos cromatográficos 48
4.2.5.1.1 Linearidade 48
4.2.5.1.2 Exatidão 48
4.2.5.1.3 Precisão 49
4.2.5.2 Determinação dos marcadores das drogas vegetais 49
4.2.5.2.1 Camomila 49
4.2.5.2.1.1 Determinação de 7-glicosil apigenina 49
4.2.5.2.1.2 Determinação de α-bisabolol 51
4.2.5.2.2 Ginkgo 52
4.2.5.2.2.1 Determinação de glicosídeos flavonoídicos 52
4.2.5.2.3 Guaraná 54
4.2.5.2.3.1. Determinação de cafeína 54
5 Resultados e Discussão 56
6 Conclusão 120
7 Referências bibliográficas 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do material de acondicionamento das drogas vegetais conforme recebidas dos fornecedores A, B e C.	57
Tabela 2	Descrição de material estranho encontrado nas drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C.	59
Tabela 3	Determinação do teor de água nas drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C.	61
Tabela 4	Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente à alcachofra (*C. scolymus* L.), proveniente do fornecedor C, irradiada com dose média de 11,7 kGy.	62
Tabela 5	Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente à camomila (*M. recutita* L.), proveniente do fornecedor C, irradiada com dose média de 11,7 kGy.	62
Tabela 6	Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente ao ginkgo (*G. biloba* L.), proveniente do fornecedor C, irradiado com dose média de 11,7 kGy.	63
Tabela 7	Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente ao guaraná (*P. cupana* H.B.K.), proveniente do fornecedor C, irradiado com dose média de 11,7 kGy.	63
Tabela 8	Contagem de microrganismos aeróbicos totais* (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	64
Tabela 9	Contagem de fungos* (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	65
Tabela 10	Contagem de enterobactérias* (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	66
Tabela 11	Comparação entre os distintos fornecedores quanto à carga microbiana das drogas vegetais.	67
Tabela 12	Provas bioquímicas para identificação presuntiva de contaminantes microbianos isolados das amostras de alcachofra (*C. scolymus* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	69

Tabela 52 Análise de variância para comparação das amostras de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) irradiadas e não irradiada quanto aos teores de cafeína. 119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva de calibração para a validação da metodologia de determinação de 7-glicosil apigenina em camomila (*M. recutita* L.). Método: CLAE.	94
Figura 2	Curva de calibração para a validação da metodologia de determinação de alfa-bisabolol em óleo volátil de camomila (*M. recutita* L.). Método: CG.	94
Figura 3	Curva de calibração da quercetina para a validação da metodologia de determinação de glicosídeos flavonoídicos em ginkgo (*G. biloba* L.). Método: CLAE.	95
Figura 4	Curva de calibração para a validação da metodologia de determinação de cafeína em guaraná (*P. cupana* H.B.K.). Método: CLAE.	95
Figura 5	Representação gráfica das concentrações e desvios padrão de 7-glicosil apigenina, nas amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	100
Figura 6	Representação gráfica das concentrações e desvios padrão de α-bisabolol no óleo volátil das amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	102
Figura 7	Representação gráfica das concentrações e desvios padrão de glicosídeos flavonoídicos, nas amostras de ginkgo (*G. biloba* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	106
Figura 8	Representação gráfica das concentrações e desvios padrão de cafeína nas amostras de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.	108
Figura 9	Representação gráfica das concentrações e desvios padrão de 7-glicosil apigenina na amostra de camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor B, antes a após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).	110
Figura 10	Representação gráfica dos teores e desvios padrão de α-bisabolol na amostra de camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor B, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).	113

Figura 11	Representação gráfica dos teores e desvios padrão de glicosídeos flavonoídicos na amostra de ginkgo (*G. biloba* L.) proveniente do fornecedor C, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).	110
Figura 12	Representação gráfica dos teores e desvios padrão de cafeína na amostra de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) proveniente do fornecedor C, antes a após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).	112

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a história do homem, e por um longo tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas (RATES, 2001). Nos últimos anos, o interesse em drogas provenientes dos vegetais superiores, especialmente os fitoterápicos, tem aumentado expressivamente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial, de algum modo, utiliza plantas medicinais como medicamentos (GARCIA *et al.,* 2001). Estima-se também que, devido à pobreza e à falta de acesso à medicina moderna, cerca de 65-80% da população do planeta que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para cuidados primários à saúde (CALIXTO, 2000).

No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (SIMÕES, 2000). A tradição popular de que produto "natural" não tem efeito colateral é equivocada e faz com que muitas pessoas busquem esta terapia sem ao menos saber o que estão consumindo. Por outro lado, a complexidade que envolve a análise deste tipo de produto, a falta de especificações para o controle de qualidade nas farmacopéias e a pouca fiscalização sanitária facilitam adulterações contribuindo para o agravamento da baixa qualidade dos fitoterápicos, classificando-os como um grave problema de Saúde Pública.

A Fundação Instituto Osvaldo Cruz avaliou, no período de junho de 1992 a junho de 1995, 317 amostras de medicamentos (268 alopáticos e 49 fitoterápicos), classificando-os como próprios ou impróprios para o consumo. Foram realizadas análises microbiológicas, químicas e de rotulagem. O índice de reprovação encontrado para os fitoterápicos foi de 91,84% e, considerando o universo efetivamente analisado do ponto de vista químico e microbiológico, verificou-se que as irregularidades encontraram-se em mais de 50% das amostras (GARCIA *et al.*, 2001).

Os produtos de origem vegetal, utilizados como medicamentos, necessitam do controle da qualidade tanto de suas matérias-primas, quanto do produto tecnologicamente acabado. Este controle contribui, sem dúvida, para o tripé eficácia,

segurança e qualidade, refletindo, por conseqüência, no binômio custo-benefício. Estes princípios são necessários ao desenvolvimento científico e tecnológico dos fitoterápicos e asseguram a melhor aceitação da classe médica que os prescreve e propiciam confiabilidade ao consumidor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação microbiana em drogas vegetais

No que tange ao atendimento à especificação de qualidade, muitos estudos foram realizados para avaliar a qualidade microbiana das drogas vegetais que, em função da origem natural, geralmente apresentam alta contagem microbiana, quer seja saprófita ou patogênica. Os microrganismos contaminantes normalmente são provenientes do solo, da água e do ar. Contaminação secundária pode ainda ocorrer devido às práticas de agricultura, ao armazenamento e ao processamento destas drogas. A contaminação em alguns estágios da produção pode ser controlada, em alguma extensão, quando se trata de espécies cultivadas, enquanto que em espécies nativas o controle está fora do alcance humano (SCOLARI; ZACCONI; VESCOVO, 2001; KATUSIN-RAZEM; NOVAK; RAZEM, 2001).

Negretti (1983) investigou a contaminação microbiana em drogas vegetais e produtos fitoterápicos comercializados na Itália. Dentre as 350 amostras de drogas vegetais analisadas, 43,13% apresentaram carga bacteriana entre 10^3 e 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama e 50,57% carga fúngica entre 10^2 e 10^4 UFC/g. Com relação à pesquisa de microrganismos patogênicos ou higienicamente indesejáveis, 23,14% das amostras estavam contaminadas.

Em 1992, Fischer analisou 84 lotes de especialidades fitoterápicas de uso oral, nas formas de cápsula, comprimido e pó, comercializadas na cidade de São Paulo. A incidência de contaminação fúngica, com carga maior ou igual a 10^2 UFC/g, foi de 34,5% e a bacteriana, com carga maior ou igual a 10^4 UFC/g, foi de 53,6% e 45,2%, respectivamente para as formas vegetativas e esporuladas. *Escherichia coli* da ordem de 10^2 UFC/g ou mais foi encontrada em 6,0% das amostras. Após o confronto dos dados encontrados com os diversos padrões sanitários então vigentes, o índice de aprovação variou de 29,8% a 94,0%.

Em trabalho semelhante, Santos *et al.* (1995) analisaram 51 amostras de fitoterápicos em diversas formas de apresentação e constataram que, segundo especificações da OMS, 56,8% estavam impróprias para o consumo.

Na Itália, Scolari, Zacconi e Vescovo (2001) avaliaram a qualidade de amostras comerciais de ervas aromáticas, encontrando contaminação microbiana em 100% delas atribuída, principalmente, aos microrganismos aeróbicos mesófilos que alcançaram níveis de até 10^6 UFC/g. Coliformes totais e bolores estavam presentes em todas as amostras em contagens variando de 10 a 10^4 UFC/g e 10 a 10^3 UFC/g, respectivamente.

Katusin-Razem, Novak e Razem (2001), após avaliação da qualidade microbiana de drogas vegetais e de seus correspondentes produtos fitoterápicos, observaram que o nível de contaminação diminuiu conforme a parte utilizada do vegetal e o tipo de extrato considerado. Desta forma, os níveis encontrados foram de 10^4 a 10^8 UFC/g para flores e folhas, 10^2 a 10^6 UFC/g para frutos e sementes, 10^4 a 10^6 UFC/g para extratos líquidos e 10^2 a 10^5 UFC/g para extratos secos. O nível de bactérias da família *Enterobactereaceae* foi superior a 10^4 UFC/g em 23 das 26 drogas analisadas, demonstrando má qualidade sanitária das amostras. Entre os extratos secos foram encontrados microrganismos potencialmente patogênicos como, por exemplo, *Vibrio* spp. e *Salmonella.*

Com relação à contaminação fúngica, os principais contaminantes de drogas vegetais estão relacionados aos gêneros *Aspergillus e Penicillium.* Hitokoto *et al.* (1978) analisaram a contaminação fúngica em drogas vegetais pulverizadas, sendo que 47% dos bolores isolados pertenciam ao gênero *Aspergillus,* sendo 7,8% identificados como *Aspergillus flavus*, entretanto, não foram detectadas aflatoxinas.

2.2 Padrões microbianos em drogas vegetais

Limites microbianos qualitativos e quantitativos devem ser exigidos, visando evitar a transmissão de doenças a partir da terapia medicamentosa e, ao mesmo tempo, minimizar os riscos de deterioração do produto com consequente diminuição da eficácia terapêutica.

As monografias farmacopeicas tornaram gradativamente mais rígidas as exigências de qualidade microbiológica dos produtos farmacêuticos e de seus

insumos. As primeiras citações sobre limites microbianos ocorreram de forma vaga na 11ª e 12ª edições, com algumas modificações na 13ª edição da *United States Pharmacopeia* (USP). Na 18ª edição, no capítulo "Atributos microbiológicos de produtos farmacêuticos não estéreis", o monitoramento microbiológico dá maior ênfase a matérias-primas de origem animal e botânica, principalmente aquelas que permitem o crescimento microbiano e que não se tornam estéreis em processos subsequentes. Na USP XIX, o mesmo capítulo inclui também considerações específicas sobre produtos contendo matérias-primas de origem natural, sugerindo que os produtos contendo estas matérias-primas deveriam ser rotineiramente testados quanto à presença de patogênicos específicos e contagem de microrganismos viáveis aeróbicos totais. Na USP XXIII e NF, especificação de qualidade microbiana consta em 50 monografias de matérias-primas, com limite de carga microbiana viável permitido oscilando entre 10^2 a 10^3 UFC/g (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

Em 1996, Fischer, Ohara e Saito realizaram revisão e estudo crítico dos padrões de qualidade microbiana para medicamentos não estéreis de uso oral, matérias-primas de origem vegetal e fitoterápicos, no nível mundial e nacional, visando avaliar o grau de adequação desses padrões às condições produtivas reais dos fitoterápicos. As autoras sugeriram os seguintes limites microbianos para fitoterápicos na forma de insumo e/ou especialidade farmacêutica: $\leq 10^4$ UFC/g de microrganismos aeróbicos totais; $\leq 10^2$ UFC/g de fungos; ausência em 10g de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.; ausência em 1g para órgão subterrâneo de *Streptococcus faecalis* e clostrídios sulfito-redutores; ausência em 10g para semente de *Aspergillus flavus*.

Em relação aos fitoterápicos, a Portaria nº 123 de 19 de outubro de 1994, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, na Norma Técnica para Registro de Fitoterápicos, estabelece as seguintes especificações para matérias–primas vegetais: menos que 10^5 UFC/g de viáveis totais; menos que 10^4 UFC/g de leveduras ou fungos; menos que 10^3 UFC/g de enterobactérias; ausência de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e fungos do gênero *Aspergillus* (BRASIL, 1994).

No entanto esta especificação não foi mantida na Portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, mencionando que a pesquisa de contaminantes microbiológicos e biológicos deve estar de acordo com a Farmacopéia Brasileira ou com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 1995).

A OMS (World Health Organization, 1998) recomenda os seguintes limites para plantas medicinais:

- Para matérias primas vegetais que serão submetidas a processos adicionais (inclusive descontaminação por métodos físicos ou químicos):
  - *Escherichia coli:* máximo de 10^4 UFC/g;
  - Bolores: máximo de 10^5 UFC/g.
- Para drogas vegetais que serão submetidas a tratamento que possa reduzir a carga microbiana anteriormente ao uso, como por exemplo, com água fervente ou para drogas de uso tópico:
  - Bactérias aeróbicas: máximo de 10^7 UFC/g;
  - Bolores e leveduras: máximo de 10^4 UFC/g;
  - *Escherichia coli:* máximo de 10^2 UFC/g;
  - Outras enterobactérias: máximo de 10^4 UFC/g;
  - *Samonella*: ausência.
- Para drogas vegetais destinadas ao uso interno:
  - Bactérias aeróbicas: máximo de 10^5 UFC/g;
  - Bolores e leveduras: máximo de 10^3 UFC/g;
  - *Escherichia coli*: máximo de 10 UFC/g;
  - Outras enterobactérias: máximo de 10^3 UFC/g;
  - *Salmonella*: ausência.

Em fevereiro de 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicou a Resolução – RDC nº 17 (BRASIL, 2000), que tem em anexo o "Regulamento Técnico sobre Registro de Medicamentos Fitoterápicos", onde constam a necessidade da pesquisa de contaminantes microbiológicos, a utilização de métodos para eliminação destes assim como a pesquisa de eventuais alterações na matéria-prima, em decorrência da sua aplicação.

Diferentes métodos têm sido atualmente utilizados na descontaminação de drogas vegetais, visando a preocupação quanto a conservação e consumo seguro destes produtos, que se caracterizam como materiais com baixo conteúdo de água, cujos princípios ativos são, na maioria das vezes, termossensíveis. Estes métodos de descontaminação devem atender a critérios como: eficácia descontaminante, segurança ao consumidor e ao operador, capacidade de penetração na embalagem e no produto, aplicação factível a grandes volumes de material e não alteração das características organolépticas e dos princípios ativos do produto (MIGDAL; OWCZARCZYK, 1998).

A exposição ao gás óxido de etileno é um método eficaz, entretanto, devido ao risco relacionado aos efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos resíduos, seu uso tem sido restringido ou, até mesmo, proibido em certos países, como aqueles da União Européia (FANG; WU, 1998).

Uma alternativa que tem sido intensivamente adotada é a descontaminação com irradiação gama (AZIZ *et al.*, 1997; FANG; WU, 1998; MIGDAL; OWCZARCZYK, 1998; KIM; YOOK; BYUN, 2000; OWCZARCZYK; MIGDAL; KADZIA, 2000), merecendo cuidados quanto à verificação de incompatibilidades e realização de estudos de estabilidade, inclusive com avaliação toxicológica, tendo em vista a possibilidade de ocorrerem alterações químicas e sensoriais indesejáveis.

2.3 Conceitos gerais sobre radiações

Radiações são ondas eletromagnéticas ou partículas que se propagam com alta velocidade e, portanto, alta energia, eventualmente sob carga elétrica e magnética e que, ao interagir, podem produzir variados efeitos sobre a matéria.

As radiações eletromagnéticas mais conhecidas são: luz, microondas, ondas de rádio, radar, laser, raios X e radiação gama. As radiações sob a forma de partículas, com massa, carga elétrica, carga magnética mais comuns são feixes de

elétrons, feixes de prótons, radiação β, radiação α. Das radiações particuladas, sem carga elétrica, a mais conhecida é o nêutron.

As radiações são denominadas ionizantes quando produzem íons, radicais e elétrons livres na matéria que sofreu interação. A ionização se deve ao fato das radiações possuírem energia alta, o suficiente para quebrar as ligações químicas ou expulsar elétrons dos átomos após colisões. As radiações eletromagnéticas do tipo raios X e γ são as mais penetrantes e, dependendo de sua energia, podem atravessar vários centímetros de tecido humano até metros de blindagem de concreto. A radiação gama é emitida pelo núcleo atômico com alta energia (estado excitado) após a transição de próton ou nêutron para nível de energia de valor menor, gerando uma estrutura mais estável (OKUNO; CALDAS; CECIL, 1992).

Em escala industrial, como na esterilização de materiais médico hospitalares, descontaminação de alimentos e drogas vegetais, dois tipos de fontes de radiação são comumente usados: cobalto 60, um isótopo radioativo (usado para irradiação gama) e aceleradores de elétrons (usados para irradiação com feixes de elétrons). Nos irradiadores gama, a fonte é constituída de várias varetas de aço inox, contendo pastilhas empilhadas de ^{60}Co metálico em seu interior. Quando recolhida, a fonte fica submersa em água, que funciona como mecanismo de blindagem para os operadores no processo de manutenção e ajustes. Durante a irradiação, a fonte é elevada até o nível de percurso dos *containers* em movimento contínuo na esteira. Todo o sistema é controlado externamente, uma vez que deve ser extremamente protegido e isolado devido à alta atividade da fonte (RUSSEL, 1982).

O parâmetro de medida utilizado em irradiação é a quantidade de energia depositada no material, que é referida como dose absorvida. A unidade da dose absorvida é o gray (Gy), sendo que 1 Gy equivale à absorção de 1 joule/kg.

A monitoração da dose absorvida e da distribuição das doses no material a ser irradiado deve ser realizada pela disposição de dosímetros em pontos estratégicos de modo que se determine as doses máxima e mínima atingidas. Os dosímetros de rotina mais empregados nos processos de irradiação são: alanina, filme ou solução radiocrômica, metacrilato de polimetila, sulfato cérico-ceroso e triacetato de celulose. É necessário que cada lote destes dosímetros de rotina seja

calibrado frente a dosímetros de referência ou de transferência, anteriormente ao uso (HANSEN; SHAFFER, 2001).

2.4 Emprego da radiação ionizante

Becqueres's foi quem, em 1895, descobriu a radioatividade e, neste mesmo ano, foi publicado no "German Medical Journal" um estudo para o uso da radiação como um método para inativar microrganismos patogênicos e esporulados em alimentos. No início do século XX, patentes foram solicitadas no Estados Unidos e no Reino Unido. Interessante citar que a tese de PhD que Madame Curie apresentava em 1929, consistia em estudo quanto à redução de contagem microbiana em produtos alimentícios. A partir da Segunda Grande Guerra os estudos quanto à utilização prática da radiação ionizante se intensificaram inicialmente nos Estados Unidos, propagando-se para países europeus e Canadá (DEL MASTRO, 1999).

Atualmente esta é uma prática que vem sendo adotada na maioria dos países, em grande parte para alimentos secos e especiarias além de produtos médico-hospitalares termo-sensíveis, por ser um método eficaz, livre de umidade e de alta temperatura (ONYENEKWE; OGBADU; HASHIMOTO, 1997; FARKAS, 1998; DEL MASTRO, 1999; HANSEN, SHAFFER, 2001).

Em setembro de 1997, a OMS, a *United Nations Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *International Atomic Energy Agency* (IAEA) organizaram um comitê com a finalidade de avaliar o uso de altas doses de radiação na descontaminação de alimentos. Este grupo de estudos concluiu que alimentos irradiados com qualquer dose apropriada para alcançar o objetivo tecnológico desejado podem ser considerados seguros ao consumidor (DIEHL, 2002).

No caso de irradiação de ervas e especiarias, a dose máxima permitida é 15 kGy na Holanda e Dinamarca, 30 kGy nos Estados Unidos e Argentina (MASOTTI; ZONTA, 1999).

No Brasil, a Resolução - RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, publicada no Diário Oficial da União em 29 de janeiro de 2001, autoriza a irradiação de qualquer tipo de alimento com a dose necessária para a obtenção do efeito de descontaminação, desde que não atinja as qualidades sensoriais e nutritivas do alimento (BRASIL, 2001).

Quanto ao emprego da radiação ionizante na descontaminação de drogas vegetais, vários autores têm relatado sua eficácia, à semelhança dos alimentos (AZIZ *et al.*, 1997; FANG; WU, 1998; MIGDAL; OWCZARCZYK, 1998; KIM; YOOK; BYUN, 2000; OWCZARCZYK; MIGDAL; KADZIA, 2000). Adicionalmente, estudos estão sendo realizados para verificação de possíveis alterações químicas nos princípios ativos vegetais (FANG; WU, 1998; MIGDAL; OWCZARCZYK, 1998).

2.5 Mecanismo de ação antimicrobiana da radiação ionizante

O efeito da radiação em células vivas é descrito pela somatória dos efeitos diretos em moléculas vitais (DNA ou RNA) e pelos efeitos indiretos nestas mesmas moléculas representados por alterações químicas em outras substâncias dentro da célula (principalmente na água), que são secundariamente transferidas às moléculas vitais. Estes danos no material genético e nos vários sistemas de reparo podem, entretanto, não ser as únicas reações importantes para a inativação dos microrganismos. Danos na membrana celular ou em outras estruturas necessárias ao funcionamento dos sistemas enzimáticos estão também envolvidos no processo (RUSSEL, 1982; HANSEN; SHAFFER, 2001).

Embora muitos fatores possam influenciar a resistência à radiação, diferenças na sensibilidade entre os microrganismos podem decorrer da capacidade de efetuar reparos no DNA alterado (BLOCK, 1991). Entre os microrganismos existem diferenças conforme os gêneros e mesmo as cepas de uma mesma espécie. As bactérias Gram-negativas, tanto aquelas deteriorantes como as patogênicas, são geralmente mais sensíveis do que as células vegetativas das

bactérias Gram-positivas. Os esporos de *Bacillus* e *Clostridium* são mais resistentes do que os anteriores (FRANCO; LANDGRAF, 1996)

Entre as formas vegetativas, existem algumas espécies altamente radiorresistentes como o *Deinococcus radiodurans, D. radiophilus, D. proteolyticus, Deinobacter grandis, Acinetobacter radioresistens* e *Rubrobacter radiotolerans.* Os *Deinococcus* são cocos Gram-positivos, os *Deinobacter* bacilos Gram-negativos, *Acinetobacter* cocos Gram-negativos e *Rubrobacter* bacilos Gram-positivos. O mecanismo de resistência dessas espécies ainda não está esclarecido. Supõe-se que a presença de envelope celular mais complexo possa ser um fator. Além disso, todos apresentam pigmentos e contêm vários carotenóides que sugerem alguma relação com a alta radiorresistência. Outro fator parece estar relacionado à presença de um eficiente mecanismo de reparo de seus ácidos nucléicos.

Entre as bactérias mais sensíveis à radiação podem ser citadas as pseudomonas e flavobactérias. Microrganismos radiossensíveis parecem ser incapazes de superar o efeito deletério causado pela formação de radicais livres e peróxidos provenientes da radiólise da água.

Em relação aos fungos, as leveduras são mais resistentes do que os bolores, sendo os dois geralmente mais resistentes do que as bactérias Gram-positivas. Os vírus são mais resistentes do que os esporos bacterianos (FRANCO; LANDGRAF, 1996)

O uso da radiação gama para inativar aflatoxinas foi investigado por alguns autores. Temcharoen e Thilly (1982) encontraram que a toxicidade de amendoim contaminado com aflatoxina B_1 diminuiu 75% e 100% após irradiação com doses de 1 e 10 kGy, respectivamente. A presença da água tem um papel importante na destruição de aflatoxinas pela radiação. Os radicais livres formados pela radiólise da água atacam o anel furano terminal da aflatoxina B_1, originando produtos com atividade biológica reduzida. Van Dyck *et al.*(1982) avaliaram a atividade mutagênica de aflatoxina B_1 em solução aquosa (5μg/mL) após irradiação com doses de 2,5, 5, 10 e 20 kGy, tendo observado redução de 34%, 44%, 74% e 100%, respectivamente.

Como para qualquer outro tratamento antimicrobiano, o número de microrganismos sobreviventes depende da quantidade inicial de células viáveis. Dependendo da carga, dos tipos de microrganismos e da composição química do material, doses de radiação entre 3 a 10 kGy podem reduzir a quantidade de microrganismos aeróbicos totais a níveis inferiores a 10^3 a 10^4 UFC/g em ervas e especiarias, com efeito microbicida semelhante ao processo de fumigação (FARKAS, 1988).

Revisando uma série de publicações, Farkas (1988) observou que não há diferença expressiva na resistência à radiação dos esporos aeróbicos comumente encontrados em especiarias em relação àquela de cepas puras em sistema aquoso. Além disto, a resistência não é significativamente influenciada pela atividade de água do meio, como ocorre em tratamentos térmicos ou químicos. Estudos comparativos em amostras de pimenta preta revelaram que, num intervalo de atividade de água de 0,25 a 0,75, a sensibilidade de esporos bacterianos à radiação não foi influenciada significativamente, enquanto que a eficácia do agente fumigante foi muito maior com maior atividade de água (0,75 e 0,5) (FARKAS; ANDRÁSSY, 1984).

Com relação à microflora presente em drogas vegetais, extratos e produtos fitoterápicos, Katusin-Razem, Novak e Razem (2001) realizaram estudos com o objetivo de avaliar a sua resistência à radiação ionizante. Os autores calcularam os valores $D_{90\%}$ (dose necessária para reduzir 90% da carga microbiana inicial) em drogas vegetais, extratos secos e líquidos, misturas de chás instantâneas e comprimidos contendo extrato vegetal seco. Os valores $D_{90\%}$ obtidos para esporos e aeróbicos totais em extratos, foram em média duas vezes maior do que nas drogas vegetais e, de modo geral, a microflora mais radiorresistente foi encontrada nas misturas instantâneas e nos comprimidos, sendo atribuída à presença de açúcar nas suas formulações.

2.6 Efeitos da irradiação sobre os constituintes químicos de drogas vegetais

As doses de radiação, altas o suficiente para esterilização de um alimento, também podem produzir efeitos indesejáveis como alterações de cor, sabor, odor, ou mesmo de outras propriedades físicas. Tais alterações podem ser causadas diretamente pela irradiação (efeitos primários) ou indiretamente por reações pós-irradiação (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Enquanto os efeitos primários são inespecíficos (ocorrem de forma randômica com qualquer molécula), os efeitos secundários dependem da estrutura química das substâncias presentes no meio e de suas afinidades em reagir com os radicais livres formados. O processo que leva à formação de produtos finais estáveis como consequência da irradiação de algum material é denominado radiólise, e os produtos dos efeitos primários e secundários são chamados de produtos radiolíticos (DIEHL, 1990).

Embora se tenha observado a persistência de radicais livres em alguns sistemas, eles podem ser altamente reativos através de vários tipos de reações como adição, combinação, dissociação, rearranjo e transferência de elétrons. O conteúdo de água, o estado físico, a temperatura e a disponibilidade de oxigênio, entre outros fatores, afetam a estabilidade dos radicais livres e, consequentemente, a extensão das alterações radiolíticas.

Se o sistema está em estado sólido, o movimento dos reagentes é restrito, diminuindo a oportunidade de reações. Da mesma forma, em materiais sólidos irradiados em estado seco, a difusão dos radicais também é limitada pela ausência de água, sendo as alterações químicas provocadas principalmente pela ação direta da radiação. Em materiais com alto teor de água, os efeitos indiretos são importantes, devido à alta reatividade dos produtos radiolíticos formados ($\cdot H$, $\cdot OH$, H_2O_2, H_2) (DIEHL, 1990). Fang e Wu (1998) observaram que os efeitos da irradiação aumentaram significativamente com o aumento do teor de água da droga vegetal. Cerca de 10% do teor de gentiopicrosídeo de raiz de genciana foi decomposto após irradiação com dose de 5 kGy, aumentando para 1/3 quando a droga continha 9% de água.

A extensão das alterações químicas também pode variar com a temperatura, que exerce influência na energia de ativação das reações químicas e na motilidade dos radicais livres e outros reagentes. Consequentemente, sob condições de baixas temperaturas, ocorre redução da capacidade de interação entre as moléculas, podendo os radicais livres não reagir por longo tempo. A presença ou ausência de oxigênio, durante a irradiação, pode ter importante influência no curso das radiólises, devido a sua capacidade de reagir com outros radicais, formando radicais peróxidos (URBAIN, 1986; DIEHL, 1990).

Diversos autores têm realizado estudos químicos detalhados com especiarias irradiadas. Análises qualitativas e quantitativas da composição de óleos voláteis de várias especiarias não revelaram alterações significativas. Porém, pequena alteração no teor pode ocorrer em alguns casos (FARKAS, 1988). Bachman e Gieszczynska (1973) encontraram que o conteúdo de alguns terpenos (α-terpinene, γ-terpinene e terpineole), diminuiu no óleo volátil de manjerona irradiada, com concomitante aumento da fração alcoólica do óleo.

Theivendirarajah e Jajewardene (1982) observaram diferenças quantitativas consideráveis nos constituintes do óleo volátil de amostra de canela irradiada a 10kGy, como por exemplo diminuição nos teores de linalol, α-terpenol e cinamaldeído, e aumento do álcool cinamílico.

Tjaberg, Underdal e Lunde (1972), investigaram os efeitos da irradiação de pimenta branca, noz-moscada e gengibre e observaram um discreto aumento da quantidade dos constituintes voláteis com o aumento das doses de radiação. Outros trabalhos também revelaram um aumento no rendimento de óleos voláteis de especiarias irradiadas em relação às não irradiadas (NEUMAYR *et al.* 1983; GRÜNEWALD, 1984). O aparente aumento destes constituintes em alguns casos, pode ocorrer devido à larga variação inerente à estimativa dos óleos voláteis. Todavia, tais observações podem estar relacionadas a variações no grau de extratibilidade do tecido vegetal devido à degradação de polissacarídeos como a pectina e o amido, que são facilmente atacados pela irradiação.

Kim, Yook e Byun (2000), estudaram o efeito da radiação gama no rendimento da extração de 20 ervas medicinais coreanas, obtendo aumentos de até

30% nas porcentagens de extratos das drogas irradiadas em relação às não irradiadas.

Um experimento utilizando animais de laboratório com o objetivo de avaliar a atividade farmacológica de medicamentos preparados à base de drogas vegetais antes e após irradiação com dose de 10 kGy revelou ausência de alterações significativas (OWCZARCZYK, MIGDAL e KADZIA, 2000).

Fang e Wu (1998), na China, realizaram estudo amplo com drogas vegetais e produtos fitoterápicos. Testes de toxicidade, de ação biológica e físico-químicos foram realizados antes e após a exposição a diferentes doses de radiação gama. Com exceção da raiz de genciana, que apresentou diminuição na ação antinflamatória após irradiação com dose de 10 kGy, nenhuma outra alteração foi observada nos testes biológicos e de toxicidade. Nos testes físico-químicos, com os quais foram analisados os principais componentes das 92 drogas vegetais investigadas, oito apresentaram alterações significativas após irradiação com 5 kGy, 17 com 10 kGy e nenhuma alteração química detectável após irradiação com 2 kGy. Estes resultados revelaram que os testes físico-químicos são mais sensíveis e confiáveis e que existe a necessidade de maiores investigações quanto às alterações nos princípios ativos.

2.7 Estabilidade microbiológica e química durante armazenamento de drogas vegetais irradiadas

Do ponto de vista da estabilidade microbiológica das drogas vegetais irradiadas, existe a preocupação principalmente com relação à contaminação fúngica. Durante o armazenamento, especialmente quando realizado em ambientes com umidade relativa e temperaturas elevadas, pode ocorrer proliferação dos fungos com conseqüente deterioração do material.

A capacidade de multiplicação de bolores sobreviventes em especiarias irradiadas tem sido estudada por diversos autores. Farkas (1988) observou que,

após quatro meses de armazenamento a 25°C e 80% de umidade relativa, a carga de bolores em páprica, irradiada com dose de 4 kGy, não aumentou. No entanto, com umidade relativa de 88%, houve aumento da carga de cerca de 3 ciclos logarítmicos.

Em experimentos realizados por Ito *et al.* (1985), a contagem de bolores em especiarias não irradiadas e acondicionadas em embalagens de polietileno aumentou até 10^8 UFC/g durante três meses de armazenamento a 30-35° C e umidade relativa abaixo de 80%, enquanto que as amostras irradiadas a 4 kGy se apresentaram isentas de bolores. Em estudo posterior, abrangendo outras especiarias, estes mesmos autores confirmaram que doses entre 4 e 6 kGy podem inibir o crescimento de bolores em especiarias acondicionadas em embalagens de polietileno mesmo em condições desfavoráveis de transporte e armazenamento (JÚRI *et al*, 1986).

Estes resultados podem ser explicados pelo fato dos microrganismos sobreviventes estarem injuriados e incapazes de se reproduzirem no meio em que foram submetidos à irradiação.

Com relação à estabilidade química, alguns autores relataram que a perda de óleos voláteis em especiarias durante o armazenamento não foi influenciada pela irradiação (FARKAS, 1988).

Na Coréia do Sul, Kwon *et al.* (2000) avaliaram a estabilidade química de ginseng branco, não irradiado e irradiado com dose de 5 kGy, durante armazenamento sob condições aceleradas (40°C e 90% de umidade relativa). Seis tipos de saponinas (ginsenosídeos) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) antes e após seis meses de armazenamento. Embora tenham sido observadas alterações quantitativas destas substâncias após o período de estocagem, não houve diferença significativa entre as amostras irradiadas e não irradiadas.

Trabalho semelhante foi realizado na Itália por Signoretti *et al.* (1998) com duas amostras comerciais de cáscara sagrada em pó. Além da determinação dos teores de cascarosídeos A, B, C, D, E e F por CLAE, os autores avaliaram a produção e o decaimento de radicais livres empregando técnica de ressonância

paramagnética eletrônica (EPR). Com relação aos teores dos cascarosídeos, os resultados não evidenciaram diferenças entre as amostras não irradiadas e irradiadas com dose de 10 kGy, mesmo após 4 meses de armazenamento. Observou-se aumento na concentração de alguns radicais livres, já existentes nas amostras não irradiadas, entretanto houve decaimento destes radicais de 70-80% na primeira semana, chegando bem próximo de zero em quarenta e cinco dias de armazenamento.

2.8 Características gerais das drogas vegetais utilizadas

2.8.1 Alcachofra

Originária do Norte da África, a alcachofra (*Cynara scolymus* L.) é cultivada desde a antigüidade. No apogeu de sua civilização, os Gregos e Romanos a utilizavam como alimento e produto dietético. Atualmente utiliza-se como medicamento hepatoprotetor, sendo cientificamente comprovado que promove o restabelecimento dos hepatócitos (POLUNIN; ROBBINS, 1992).

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

Quando seca em condições adequadas (ampla ventilação à baixa temperatura), a folha mantém sua coloração original: verde acinzentado no topo e esbranquiçada na base.

Os componentes ativos são os ácidos e álcoois fenólicos. Os ácidos cafeicos constituem cerca de 1% da planta fresca, dentre eles, destaca-se o ácido 1,5-dicafeilquínico, mais conhecido como cinarina. Outros ácidos são o málico,

succínico, láctico, fumárico e cítrico, que na somatória representam 0,8% da planta fresca. (BRUNETON, 1999).

A composição do extrato vegetal em ácidos fenólicos no extrato vegetal depende da forma de secagem das folhas e do seu processo extrativo, devido à possibilidade de reações de hidrólise e transesterificações que podem ocorrer em meio aquoso. Assim, a cinarina, citada usualmente como o componente principal, pode não ser detectada.

2.8.2 Camomila

A camomila, *Matricaria recutita* L. (também conhecida como *Matricaria chamomilla* L.), é uma planta herbácea, 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 antiguidade, pelo seu aroma peculiar. O nome Matricaria deriva do latim "mater" ou talvez "matrix" - útero, por ser utilizada em doenças femininas (POLUNIN; ROBBINS, 1992).

Degustada desde os tempos antigos, na forma de chá, é utilizada no tratamento sintomático de distúrbios gastrintestinais, e em inflamações e irritações de pele e mucosas (KINGHORN; BALANDRIN, 1993).

Com uso interno e externo em função das atividades antinflamatória, antiespasmódica, antibacteriana e levemente sedativa, também é comercializada na forma de tinturas e unguentos (POLUNIN; ROBBINS, 1992).

As flores da camomila contêm óleo volátil (0,4-1,5%) de intensa coloração azulada devido ao seu conteúdo de camazuleno (1-15%). Outros constituintes do óleo incluem o α-bisabolol e outros sesquiterpenos (até 50%). Enquanto a matricina e o (-)-α-bisabolol são isolados da planta, o camazuleno é formado durante o aquecimento das flores no preparo de infusos ou na extração do óleo volátil

(LEUNG; FOSTER, 1996). Entre os constituintes não voláteis, estão a apigenina e os glicosídeos flavonóicos relacionados, presentes em até 8% (peso seco) da droga (World Health Organization, 1999).

A ação antinflamatória da camomila parece estar relacionada principalmente aos compostos terpênicos matricina, camazuleno, (-)-α-bisaloloxidos A e B, e (-)-α-bisabolol. Entretanto, observando que as preparações mais comuns obtidas a partir das flores de camomila (extratos hidroalcoólicos e infusos) continham essencialmente a fração hidrofílica, e que esta, por sua vez apresentava baixos teores de substâncias lipofílicas tais como o (-)-α-bisabolol e camazuleno, Della Loggia *et al* (1986) testaram a ação antinflamatória das frações hidrofílica e lipofílica extraída das flores secas e de vários flavonóides purificados. Os autores observaram que a primeira fração apresentou maior ação antinflamatória que a segunda, e, que a apigenina e a luteolina possuíam ação semelhante à da indometacina. Além disso, considerando que a fração flavonoídica chega a perfazer 24% do extrato total e a lipofílica 7%, deduziram que a atividade antinflamatória atribuída à planta é devida, principalmente à presença dos flavonóides, ao contrário do que se acreditava.

A atividade espasmolítica tem sido atribuída à apigenina, 7-glicosil apigenina e ao (-)-α-bisabolol, sendo esta atividade, similar àquela da papaverina.(World Health Organization, 1999).

2.8.3 Ginkgo

O *Ginkgo biloba* L. é árvore oriunda há mais de 200 milhões de anos, na era Paleozóica, e representa uma espécie de "fóssil vivo", conforme mencionou o naturalista Charles Darwin. É alta, robusta, extremamente duradoura e possui folhas divididas em dois lóbulos, originando o nome de espécie "biloba" (BANOV; PAOLA; RIBEIRO, 1999). É uma planta nativa da China, porém, comercialmente cultivada na França e nos Estados Unidos (World Health Organization, 1999)

Os extratos desta droga têm sido utilizados no tratamento de doenças vasculares periféricas e de insuficiência cerebrovascular suave a moderada com os seguintes sintomas: perda da memória, condição emocional depressiva, vertigem, zumbido e dor de cabeça (World Health Organization, 1999). Atualmente, seu potencial na área cosmética está sendo explorado, principalmente em formulações de ação contra os radicais livres, atuando no combate ao envelhecimento cutâneo (BANOV, PAOLA, e RIBEIRO, 1999)

As folhas de ginkgo contêm uma grande variedade de compostos químicos, incluindo alcanos, lipídeos, esteróis, benzenos, carotenóides, fenilpropanóides, carboidratos, flavonóides e terpenóides. Os principais constituintes são os flavonóides, predominando o quenferol e a quercetina. Os terpenóides, compostos característicos desta planta, constituem dois grupos: o primeiro formado pelos diterpenos onde estão presentes os ginkgolídeos A, B, C, J e M, e o outro, representado pelo sesquiterpeno, bilobalídeo. Estudos recentes indicaram que os ginkgolídeos, particularmente o ginkgolídeo B, possuem atividade antagonista do fator de agregação de plaquetária (PAF) (World Health Organization, 1999).

2.8.4 Guaraná

O guaraná, *Paullinia cupana* H.B.K., é umas das espécies da Amazônia de maior potencial econômico. Seu cultivo por diversas tribos indígenas data da época pré-colombiana e seu uso tem persistido, durante séculos, por índios da tribo Santerê-Maué (HENMAN, 1982). Seu emprego foi muito difundido entre os colonizadores, sendo hoje amplamente utilizado na forma de bebidas, xaropes, pós e comprimidos (MOUSINHO, 1984). É um produto exportado para vários países, entre os quais estão o Japão e os Estados Unidos.

As sementes do guaraná são constituídas de cafeína, traços de teofilina e teobromina, saponinas, taninos (12%) (catequina, epicatequina e proantocianidiois), amido (até 60%), pectinas e mucilagens (SIMÕES, 2000).

O guaraná tornou-se popular 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 (MATTEI *et al.*, 1997). A cafeína, presente nas sementes em concentrações que variam de 2,5 a 5%, é estimulante do sistema nervoso central, exerce atividade sobre o sistema cardiovascular, provocando vasoconstrição cerebral e vasodilatação periférica, além de estimular a contração da musculatura estriada, reduzindo a fadiga muscular. O mecanismo de ação envolve a indução do acúmulo de AMPc, através da inibição da atividade da enzima fosfodiesterase, a mobilização de cálcio intracelular e, principalmente, o bloqueio de receptores de adenosina (SIMÕES, 2000).

3 OBJETIVOS

O trabalho teve como principais objetivos:

- Determinar a contaminação microbiana nas amostras das drogas vegetais selecionadas, no aspecto quantitativo e quanto à presença de microrganismos indicadores patogênicos;

- Avaliar o efeito da irradiação a doses distintas (5, 10 e 15 kGy), sobre a carga microbiana, das drogas vegetais alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.).

- Determinar possíveis alterações químicas provocadas pelo agente de descontaminação sobre os teores dos princípios ativos das drogas vegetais após exposição a diferentes doses de irradiação (5, 10 e 15 kGy).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As drogas vegetais utilizadas no estudo foram as seguintes: folhas de alcachofra (*Cynara scolymus* L.), flores de camomila (*Matricaria recutita* L.), folhas de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) e sementes de guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.). Estas foram obtidas de três fornecedores locais (A, B e C), em quantidade de cerca 12 kg de cada espécie vegetal para cada uma das fontes distintas. As amostras foram divididas em porções de 1 kg e embaladas em sacos de polietileno de espessura 0,16 mm e dimensão 50 cm x 80 cm.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação do teor de água nas drogas vegetais

A avaliação para cada espécie vegetal ocorreu no material conforme recebido (anteriormente ao acondicionamento). As determinações foram efetuadas em duplicata.

4.2.1.1 Preparo da amostra

O preparo da amostra se constituiu da redução da dimensão dos fragmentos das drogas para medida máxima de 3 mm (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.1.2 Perda por dessecação: método gravimétrico

Cerca de 2 a 5 gramas exatamente pesados de cada droga vegetal (amostra preparada conforme instruções anteriores), foram transferidos para pesa filtro chato tarado, previamente dessecado nas condições a serem adotadas para a amostra durante 30 minutos. A amostra foi dessecada em estufa a 105°C durante 5 horas antes da pesagem. O ensaio foi considerado concluído quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 5 mg. Foi calculada a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.

4.2.2 Avaliação da qualidade microbiana das amostras

4.2.2.1 Preparo das amostras

Para a realização dos ensaios microbiológicos, as amostras foram pulverizadas com auxílio de liquidificador provido de facas denteadas, previamente sanitizado com álcool 70%.

4.2.2.2 Validação do método de contagem microbiana (semeadura da amostra em profundidade)

A validação foi realizada com as drogas vegetais do fornecedor C irradiadas com dose de 11,7 kGy, para cada um dos microrganismos preconizados. As amostras foram submetidas a 3 diluições seriadas decimais. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram semeadas, em triplicata, em placas de Petri, juntamente com 1 mL de suspensão padronizada contendo aproximadamente 10^2 células de cada

microrganismo (*S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404). Após adição de Ágar Caseína-soja (Oxoid) para as bactérias e Ágar Sabouraud (Oxoid) para os fungos, as placas foram incubadas a 32,5 ± 2,5°C, por 72 horas, e a 22,5 ± 2,5°C, por 7 dias, respectivamente. O teste foi acompanhado por controle, no qual foram realizadas as contagens da suspensão de cada microrganismo e das amostras. (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2000; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999)

4.2.2.3 Contagem de microrganismos aeróbicos totais e fungos

Amostras de 10 g de cada droga vegetal foram adicionadas em 90 mL de solução peptonada (0,1% m/v) seguindo-se diluições seriadas decimais até 10^{-8}. Alíquotas de 1 mL de cada diluição da amostra foram transferidas, em três réplicas, para placas de Petri estéreis, vertendo-se em seguida cerca de 20 mL de meio de cultura sólido Ágar Caseína-soja (Oxoid) fundido e resfriado a cerca de 45°C, e 20 mL de meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid) 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, foi feita homogeneização com movimentos em 8 sobre a bancada.

Seguindo-se à solidificação dos meios de cultura, as placas de Ágar Caseína-soja foram incubadas a 32,5 ± 2,5°C por 48 horas e as de Ágar Sabouraud Dextrose a 22,5 ± 2,5°C por 5 dias.

As colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias considerando-se tanto o crescimento em profundidade como em superfície. O número médio das colônias detectadas nas réplicas, multiplicado pelo fator de diluição forneceu o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por unidade de peso da amostra. Quando não houve formação de colônias nas placas referentes à primeira diluição (1:10) da amostra, o resultado foi expresso como "menos que 10 microrganismos por grama da droga vegetal" (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999).

4.2.2.4 Contagem de enterobactérias

Quantidade de aproximadamente 10 g da amostra foi suspensa em 90 mL de solução peptonada (0,1% m/v) seguindo-se de diluições seriadas decimais. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas, em triplicata, para placas de Petri, vertendo-se em seguida aproximadamente 15 mL de meio de cultura Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (Difco) resfriado a temperatura de cerca de 45°C. Após homogeneização e solidificação do meio, foi adicionada uma camada (cerca de 10 mL) do mesmo meio de cultura. Após solidificação, as placas foram incubadas a 35-37°C por 18 a 24 horas.

Foram contadas as colônias vermelhas e ou avermelhadas e o número médio das colônias detectado nas réplicas, multiplicado pelo fator de diluição forneceu o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de enterobactérias por unidade de peso da amostra. Quando não houve formação de colônias nas placas referentes à primeira diluição (1:10) da amostra, o resultado foi expresso como "menos que 10 microrganismos por grama da droga vegetal".

4.2.2.5 Pesquisa de microrganismos patogênicos específicos

Foram realizadas as pesquisas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* sp, *Escherichia coli* e bolores do gênero *Aspegillus.* Trabalhou-se sempre com cepas representativas dos controles positivos, paralelamente à investigação de contaminantes.

4.2.2.5.1 Enriquecimento em meios de cultura não seletivos

Quantidade de aproximadamente 10 g da amostra foi transferida, de forma asséptica, para erlenmeyer contendo 90 mL de Caldo Lactose (Difco), para a pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* sp., com incubação em estufa, por 24 a 48 horas a 32,5 ± 2,5°C (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999). O mesmo procedimento foi utilizado empregando-se como meio de enriquecimento não seletivo o Caldo de Caseína-soja (Difco), para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa.*

4.2.2.5.2 Enriquecimento em meio seletivo para a pesquisa de *Salmonella* sp

Alíquotas de 1 mL da suspensão resultante do meio de enriquecimento (Caldo Lactose) foram transferidas respectivamente para 10 mL dos meios seletivos Caldo Tetrationato (Difco) e Caldo Selenito Cistina (Difco), com incubação por período de 12 – 24 horas, a 32,5 ± 2,5°C (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999).

4.2.2.5.3 Isolamento em meio seletivo

O crescimento obtido no Caldo Caseína-soja (item 4.2.2.5.1) foi transferido, com auxílio de alça de Henle, para placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura seletivo Ágar Vogel-Johnson (Oxoid) para o isolamento de *Staphylococcus aureus*, empregando-se técnica de semeadura em estria em superfície. A incubação foi por intervalo de tempo entre 24 – 48 horas a 32,5 ± 2,5°C. Resultando colônias pretas circundadas por uma zona amarela, foi indicativo de resultado positivo (UNITED STATES PHARMACOPHEIA, 1999).

Para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa,* foi transferida uma alçada do Caldo de Caseína-soja (item 4.2.2.5.1), para placa de Petri contendo 20 mL de Ágar Cetrimida (Difco), empregando-se técnica de semeadura em estria em superfície. A incubação foi conforme descrito para o microrganismo anteriormente citado. A presença de colônias esverdeadas e fluorescentes sob luz ultravioleta foi indicativa 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 24 – 48 horas, colônias esverdeadas a vista desarmada e azuis sob luz ultravioleta, respectivamente em cada um dos meios de cultura, indicaram resultado positivo para a detecção.

Alíquota do crescimento em Caldo Lactose foi transferida para placa de Petri contendo Ágar MacConkey (Difco) para o isolamento de *Escherichia coli.* Após incubação por 24 – 48 horas a 32,5 ± 2,5°C, a presença de colônias de coloração vermelho tijolo foi indicativa de resultado positivo para o teste. Neste caso, as colônias características foram transferidas para placa de Petri contendo 20 mL de Ágar Eosina e Azul de Metileno (Ágar EMB) (Oxoid). O crescimento de colônias de coloração azul escura e aspecto metálico, indicou resultado positivo (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999).

Para o isolamento de *Salmonella* sp., o crescimento obtido nos meios de enriquecimento seletivo (item 4.2.2.5.2), foi transferido para placa de Petri contendo Ágar Verde Brilhante (Difco), Ágar Sulfito de Bismuto (Difco), Ágar com Xilose, Lisina e Desoxicolato (Ágar XLD) (Oxoid), por técnica de estria em superfície. As placas foram incubadas por 24 – 48 horas a 32,5 ± 2,5°C. A presença de colônias pequenas, transparentes, incolores ou rosas a branco opaco frequentemente circundadas por zona rosa a vermelha no Ágar Verde Brilhante; colônias vermelhas com ou sem centros negros no Ágar XLD e colônias pretas ou verdes no Ágar Sulfito de Bismuto, indicaram resultado positivo para o teste (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999).

4.2.2.5.4 Identificação presuntiva

Colônias suspeitas obtidas dos meios seletivos foram submetidas à 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 foram observados cocos Gram-positivos formando grupamento semelhante a cachos de uva. Também foram efetuados testes para detecção de coagulase e desoxirribonuclease.

Pseudomonas aeruginosa: Na constatação de bastonetes 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 Infuso Cérebro-coração (Difco).

Escherichia coli: No caso de caracterização de bastonetes Gram-negativos, foram efetuados os seguintes testes: Ágar Tríplice Açúcar Ferro (Difco), Indol, Vermelho de Metila e Voges Proskauer e Citrato como única fonte de carbono.

Salmonella sp. : A detecção de bastonetes Gram-negativos e reação característica no teste Ágar Tríplice Açúcar Ferro, tiveram continuidade com os seguintes testes: Ágar de Lisina Ferro, teste de Citrato como única fonte de carbono, Urease e Fermentação da Lactose.

4.2.2.5.5 Identificação propriamente dita

Os microrganismos que apresentaram resultados característicos na identificação presuntiva foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia RD dos Laboratórios Stiefel Ltda e submetidos à identificação empregando sistema Vitek 32® da BioMerieux.

4.2.2.6 Pesquisa de bolores do gênero *Aspergillus*

Na presença de crescimento no Ágar Sabouraud Dextrose, colônias isoladas foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose e encaminhadas à Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz para identificação do gênero, e quando possível das espécies.

4.2.3 Exposição à radiação ionizante

A irradiação das amostras foi realizada no canal experimental de um irradiador de grande porte tipo JS 7500 da Empresa Brasileira de Radiações (EMBRARAD). O canal experimental ("research loop") é um equipamento que permite a irradiação de amostras sem interferir com o funcionamento normal da máquina. O sistema é composto por uma caixa de alumínio com paredes de aproximadamente 2 mm de espessura e com capacidade para 20 litros, cuja função, além da sustentação mecânica dos conjuntos a serem irradiados, é proporcionar o equilíbrio eletrônico. A caixa de alumínio é suspensa por trilhos que permitem o seu movimento através do labirinto da câmara de irradiação, até a sua posição de irradiação estática. A radiação proveniente da fonte de ^{60}Co atravessa primeiro o material que estiver passando pelo plano inferior de irradiação antes de atingir a caixa de alumínio do canal experimental.

A monitoração da dose alvo foi realizada através da disposição de dosímetros de metacrilato de polimetila (Perspex®) na face e no fundo da caixa. O processo foi realizado a temperatura ambiente e na presença de oxigênio.

As doses alvo selecionadas foram 5, 10 e 15 kGy, sendo que para cada uma delas foram realizados três ciclos. Os ciclos foram efetuados com embalagens de 1 kg de cada droga vegetal proveniente dos três distintos fornecedores, perfazendo um total de 12 kg por ciclo.

4.2.4 Análise da eficácia descontaminante do processo

As amostras irradiadas foram submetidas ao mesmo processo de contagem microbiana descrito no item 3 deste mesmo capítulo, para determinação da carga de aeróbicos totais, fungos e enterobactérias (UFC/g) e pesquisa de patogênicos específicos.

A análise da eficácia descontaminante do processo foi realizada através de estudos comparativos dos resultados obtidos antes e após a irradiação.

4.2.5 Análise de alterações nos teores dos princípios ativos das drogas vegetais

A determinação dos princípios ativos foi realizada com as drogas dos três fornecedores (A, B e C) no caso das drogas vegetais não irradiadas. Após irradiação, a análise de cada espécie vegetal foi efetuada com amostra de um fornecedor. Para cada dose de radiação estudada, quantidades similares de cada ciclo foram amostradas formando-se um "pool". A partir deste "pool", foi realizada a determinação do marcador de cada espécie vegetal em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico.

Como etapa preliminar ao doseamento dos marcadores, foram determinados os parâmetros de validação preconizados para metodologias farmacopeicas, conforme RDC 84 de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002).

4.2.5.1 Validação dos métodos cromatográficos

4.2.5.1.1 Linearidade

Para a determinação da linearidade da resposta na faixa de concentrações aplicáveis, foram empregadas 5 diluições do padrão de cada princípio ativo vegetal analisado, correspondente às porcentagens de 70, 85, 100, 115 e 130 da concentração teórica esperada nas análises. Cada diluição foi injetada no cromatógrafo pelo menos 3 vezes, sendo o desvio padrão relativo (DPR) entre as injeções menor que 2%. Os resultados foram plotados e foi calculado o coeficiente de correlação linear (r^2) para a reta obtida (BRASIL, 2002; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2002).

4.2.5.1.2 Exatidão

Após o estabelecimento da linearidade, foi verificada a exatidão através de 9 determinações contemplando o limite de variação do procedimento, ou seja, concentrações baixa, média e alta, contendo, respectivamente, teores de princípio ativo ao redor de 70%, 100% e 130% do valor teórico, com três réplicas de cada (BRASIL, 2002). Estas soluções foram preparadas através da adição de concentração conhecida de padrão ao extrato líquido da droga vegetal. Paralelamente foi determinada a concentração do princípio ativo no extrato sem padrão adicionado que foi denominada como "branco". As concentrações foram calculadas através das retas de calibração e corrigidas em função dos valores dos "brancos" (PENNINCKX, 1994; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2002) A exatidão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{teor médio experimental} \times 100}{\text{teor teórico}}$$

4.2.5.1.3 Precisão

Foi verificada a repetibilidade do método através de 6 determinações da mesma amostra, incluindo o procedimento de extração. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo, segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada (BRASIL, 2002)

4.2.5.2 Determinação dos marcadores das drogas vegetais

Para a determinação dos princípios ativos naturais (antes e após a irradiação) foram adotados os métodos descritos na Farmacopéia Americana, e em artigos científicos de referência.

4.2.5.2.1 Camomila

O conteúdo de 7-glicosil apigenina foi determinado empregando metodologia descrita na Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999). A determinação quantitativa do α-bisabolol foi realizada empregando metodologia descrita por BICCHI *et al.* (2001).

4.2.5.2.1.1 Determinação de 7-glicosil apigenina

Diluição do ácido fosfórico: 5,0 mL de ácido fosfórico foram transferidos para frasco volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água, completando-se o volume com água.

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

Solução B: mistura de acetonitrila – metanol (65:35)

Fase móvel: foram utilizadas misturas em proporções variáveis da solução A e da solução B.

Preparo do padrão: quantidade exata de padrão 7-glicosil apigenina foi dissolvida em metanol, e diluída quantitativamente obtendo-se solução contendo aproximadamente 25,0 μg de 7-glicosil apigenina por mL.

Preparo da amostra: Foi transferido cerca de 1,0 g de camomila, exatamente pesado, para um frasco acoplado a um condensador de refluxo e adicionado 80 mL de metanol. Esta mistura foi aquecida sob refluxo por 1 hora. O frasco foi resfriado a temperatura ambiente, o extrato metanólico foi filtrado em papel de filtro e coletado em balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com metanol e submetido à filtração. Volume 25 mL da solução filtrada foi transferido a frasco acoplado a um condensador de refluxo, onde foram adicionados 5 mL de solução aquosa contendo 0,4 g de hidróxido de sódio. Esta mistura foi aquecida sob refluxo por 25 minutos. O frasco foi resfriado e o pH da solução ajustado até 5,0 - 6,2 com ácido clorídrico. Quantitativamente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, diluída com metanol até o volume, homogeneizada e filtrada, descartando-se os primeiros 10 mL do filtrado.

Sistema cromatográfico: Foi empregado sistema de cromatografia líquida *Thermo Separation Products* (TSP) PC1000 equipado com um detector de 335 nm e uma coluna octadecilsilano (ODC) com 4,6 mm x 15,0 cm, e foi programado para fluxo de 1 mL por minuto, uma variável mistura de solução A e solução B, sendo a porcentagem da solução B de 26% no momento que cada espécie foi injetada no cromatógrafo, e permanecendo neste nível por 3 minutos. A porcentagem de solução B foi aumentada linearmente para 85% nos 19 minutos seguintes e depois diminuída linearmente nos seguintes 5 minutos para 26%, nível este, que permaneceu nos próximos 3 minutos antes da próxima injeção.

Procedimento: Separadamente, foram injetadas em volumes iguais (cerca de 15 μL) a solução padrão e a solução da amostra no cromatógrafo, em triplicata. Os cromatogramas foram registrados, e foram medidas as áreas dos sinais para todos os picos observados no cromatograma de cada amostra. O DPR entre as réplicas não foi maior que 2 % para as soluções de amostra e padrão. A porcentagem de 7-glicosil apigenina na porção tomada de camomila foi calculada segundo a fórmula: $12(C/W)(r_u/r_s)$, onde C é a concentração em mg/mL do padrão 7-glicosil apigenina; W é o peso em gramas da amostra de camomila; r_u e r_s são as áreas dos sinais obtidos para a amostra e para o padrão, respectivamente.

4.2.5.2.1.2 Determinação de α-bisabolol

A extração do óleo volátil foi realizada empregando método de destilação por arraste a vapor, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988). Após a obtenção do óleo volátil, foi realizada a quantificação de α-bisabolol empregando cromatografia gasosa (CG) segundo metodologia descrita por BICCHI *et al.* (2001), com algumas modificações.

Solução padrão interno: quantidade exatamente pesada de ftalato de dibutila (FDB) foi dissolvida quantitativamente em acetona obtendo-se uma solução de aproximadamente 0,4 mg/mL (ANDRÉ *et al*, 1991).

Solução padrão de α-bisabolol: quantidade exata de padrão de α-bisabolol foi dissolvida em quantidade suficiente de solução de padrão interno de modo que se obteve uma solução final de concentração aproximada de 0,5 mg/mL.

Solução da amostra: Aproximadamente 10 mg exatamente pesados de óleo volátil foram dissolvidos em 1mL de solução padrão interno.

Sistema cromatográfico: Foi utilizado sistema de cromatografia gasosa HP 6890 modelo G1530A, equipado com coluna capilar DB-5 (30m x0,25mm x 0.25μm) e detector por ionização de chama FID. Fase móvel: fluxo de N_2 a 1 mL/min. Temperaturas: injetor-250°C, detector-290°C. A temperatura da coluna foi

programada da seguinte forma: 80°C a 140°C numa razão de 10°C/min, 1 minuto estável; 140°C a 155°C numa razão de 1°C/min, 1 minuto estável; 155°C a 240°C numa razão de 10°C/min, 5 minutos estável.

Procedimento: Foram injetados no cromatógrafo, em triplicata, 1μL das soluções de padrão e de amostra nas condições acima descritas, registrando-se a área dos sinais. Foram calculadas as médias das áreas dos sinais para α-bisabolol e FDB. Foi calculada a concentração de α-bisabolol na solução teste em função da relação entre as respostas para o padrão interno e para o α-bisabolol. A partir da concentração de α-bisabolol na solução de amostra, foi calculada a sua porcentagem (m/m) no óleo volátil.

4.2.5.2.2 Ginkgo

O conteúdo de glicosídeos flavonoídicos foi determinado segundo método descrito pela Farmacopéia Americana edição 24 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1999), com algumas adaptações embasadas em método utilizado pela Finzelberg (2000).

4.2.5.2.2.1 Determinação de glicosídeos flavonoídicos

Solvente de extração: solução de acetona em água 70%.

Solução de ácido clorídrico: Transferiu-se 10 mL de ácido clorídrico para balão volumétrico de 50 mL, diluindo com água até o volume.

Fase móvel: Foi preparada uma mistura de solução de ácido cítrico 0,6%, acetonitrila e álcool isopropílico (100:47:5).

Solução padrão: Quantidade exata de padrão de quercetina foi dissolvida em metanol para a obtenção de uma solução de concentração cerca de 0,2 mg/mL (Solução padrão estoque). Alíquota de 10 mL da solução padrão estoque foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, e foram adicionados 5 mL de água e 15 mL de solução de ác. clorídrico. O conteúdo do frasco foi diluído com metanol até o volume e homogeneizado, obtendo-se solução padrão de concentração conhecida de aproximadamente 0,04 mg/mL.

Solução de amostra: Cerca de 5 g de ginkgo previamente pulverizado e exatamente pesados foram aquecidos sob refluxo com cerca de 50 mL de solvente de extração por 1 hora. Após resfriamento, procedeu-se uma filtração, sendo o filtrado recolhido em balão volumétrico de 100 mL. O resíduo do filtro, foi extraído da mesma maneira, com 30 mL de solvente de extração e o filtrado coletado no mesmo balão volumétrico de 100 mL. O conteúdo do balão foi completado com o solvente de extração até o volume, homogeneizado e filtrado em papel de filtro. Alíquotas de 10 mL do filtrado foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL. Foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico metanólico e o volume foi completado com metanol. Após homogeneização, foram transferidos 10 mL para um frasco de vidro âmbar que foi vedado e lacrado com tampa de alumínio, seguindo-se aquecimento em água fervente por 25 minutos e resfriamento à temperatura ambiente.

Sistema cromatográfico: Foi empregado sistema de cromatografia líquida *Thermo Separation Products* (TSP) PC 1000 equipado com um detector de 370 nm e uma coluna octadecilsilano (ODC) com 4,6 mm x 12,5 cm. A razão de fluxo foi de 1,5 mL por minuto.

Procedimento: Foram injetados volumes iguais (cerca de 10 μL) da solução padrão e da solução da amostra. Os cromatogramas foram registrados, sendo medidas as áreas dos maiores sinais e somadas as áreas destes sinais, esperados para quercetina, quenferol e isoarmetina no cromatograma da solução de amostra. A partir da área do sinal obtido para a solução padrão e da soma das áreas dos maiores sinais para a solução teste, determinou-se a concentração, em mg por mL, de glicosídeos flavonoídicos na solução da amostra. Os valores obtidos foram multiplicados por um fator de massa molecular de 2,514 e foi calculada a

porcentagem de glicosídeos flavonoídicos, como 3-O-(2-O-[6-O-{p-hidroxi-trans-cinamoil}-β-D-glicosil]-α-L-ramnosil) quercetina, com massa molecular de 756,7.

4.2.5.2.3 Guaraná

O conteúdo de cafeína do guaraná foi determinado segundo a metodologia proposta por Salvadori *et al.* (1994).

4.2.5.2.3.1 Determinação de cafeína

Solução Reagente de Carrez 1 – Foram dissolvidos 21,9 g de acetato de zinco dihidratado em água, com adição de 3 mL de ácido acético glacial e o volume completado para 100 mL com água.

Solução Reagente de Carrez 2 – Preparou-se solução de 0,106 mg/mL de ferrocianeto de potássio em água.

Fase Móvel: água – acetonitrila (15 + 1 v/v)

Solução padrão de cafeína: 0,1% (m/v) em água.

Solução de amostra: Para um frasco de 250 mL foram adicionados 0,25 g de guaraná previamente pulverizado e 30 mL de água. A mistura foi aquecida a 80°C, sob refluxo, por 1 hora e resfriada à temperatura ambiente. Após clarificação com 0,25 mL de cada solução 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, completando-se o volume com água.

Sistema cromatográfico: Sistema de cromatografia líquida *Thermo Separation Products* (TSP) PC 1000 equipado com detector de 267 nm e coluna octadecilsilano

(ODC) com 4 mm x 10,0 cm. A razão de fluxo foi de 1 mL por minuto. A coluna foi mantida a uma temperatura abaixo de 35°C durante toda a análise.

Procedimento: Foi injetada uma alíquota de 10 μL no sistema de CLAE, em triplicata, sendo o desvio padrão entre as réplicas menor que 2%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manutenção das características de qualidade inerentes ao produto ou matéria-prima está diretamente relacionada ao seu material de acondicionamento assim como às condições de seu armazenamento. Desta forma, as decisões relativas às condições de armazenamento devem ser fundamentadas em estudos específicos visando alcançar a estabilidade físico-química e microbiológica do material. A especificação correta do material de acondicionamento pressupõe, por sua vez, o domínio quanto ao conhecimento do material a ser acondicionado e de seu constituintes. A inércia do material empregado, atrelada ao seu prazo de vida útil, deve ser conhecida. A sua reatividade, representada pela capacidade de adsorver substâncias, de ser permeável a gases ou vapores no sentido do ambiente ou do interior da embalagem ou de ceder componentes para o produto, pode comprometer a qualidade final do produto. Deve-se dar preferência aos materiais porosos que permitam ocorrer trocas gasosas (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

No presente estudo, drogas vegetais, provenientes de três diferentes fornecedores foram recebidas acondicionadas em distintos materiais conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1- Descrição do material de acondicionamento das drogas vegetais conforme recebidas dos fornecedores A, B e C.

Fornecedor	Alcachofra (*C. scolymus* L.)	Camomila (*M. recutita* L.)	Ginkgo (*G. biloba* L.)	Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)
A	Saco de polietileno com embalagem de ráfia.	Saco de ráfia.	Saco de polietileno com embalagem de ráfia.	Saco de polietileno com embalagem de ráfia.
B	Saco de ráfia.	Caixa de papelão.	Saco de ráfia.	Saco de papel com embalagem de polietileno.
C	Saco de ráfia.	Caixa de papelão	Saco de ráfia.	Saco de polietileno.

No caso das drogas provenientes do fornecedor A, excetuando-se a camomila, que se apresentou apenas acondicionada em saco de ráfia, as demais apresentaram, embalagem desse material e polietileno como material de acondicionamento. Tal decisão demonstrou preocupação relacionada aos possíveis contaminantes ambientais tais como poeira, partículas, materiais estranhos além de contaminantes biológicos. Entretanto, a embalagem de polietileno pode propiciar microambiente que permita a proliferação da carga contaminante microbiana inicialmente presente, em função da retenção da umidade inerente à droga. A ráfia, confeccionada empregando fitas de material polimérico trançadas, embora dificulte a retenção de umidade no material não se constitui em barreira física eficaz.

Quanto ao procedimento empregando caixa de papelão, a escolha deste material por 2 fornecedores (B e C) para o acondicionamento da camomila pode estar relacionada ao fato de que óleos fixos e voláteis existentes em drogas podem interagir com embalagens plásticas (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). Porém, preocupação adicional refere-se à possível fonte de contaminação microbiana e de emissão de partículas oriundas desse material.

Tendo em vista os diferentes materiais empregados para acondicionar as drogas vegetais, torna-se necessário estudo objetivando avaliar a influência das distintas condições de acondicionamento na qualidade das drogas. Tais estudos devem ser conduzidos visando comparar a qualidade do material imediatamente antes e após seu acondicionamento a determinados intervalos de tempo. No presente estudo não foi possível avaliar a influência do material de acondicionamento e embalagem na qualidade das drogas em função do desconhecimento das características originais (anteriores ao acondicionamento) de qualidade dos materiais e de seu armazenamento. Numa outra abordagem não se localizou qualquer orientação normativa quanto ao acondicionamento de material de origem vegetal.

Com referência à presença de materiais estranhos, no decorrer do acondicionamento do material foi detectada a presença de contaminantes de origem mineral, vegetal, animal além de fragmento de cigarro indicando condições impróprias de manipulação do material conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Descrição de material estranho encontrado nas drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C.

Fornecedor	Alcachofra (*C. scolymus* L.)	Camomila (*M. recutita* L.)	Ginkgo (*G. biloba* L.)	Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)
A	—	Material animal (insetos)	Material mineral (pedras)	—
B	—	—	Cigarro, epicarpo de amendoim	—
C	Material mineral (pedras)	Material animal (insetos)	—	—

(—) Ausência de material estranho.

Analisando os diferentes fornecedores (Tabela 2) não foi possível definir qual deles deve gerar maior preocupação relativa a esse aspecto. O fornecedor B apresentou ausência de materiais estranhos em três das quatro drogas avaliadas. Porém, no caso específico do ginkgo foi observada presença de fragmento de cigarro. A presença de material de tal natureza reflete a ausência de boas práticas na manipulação dessa droga. De forma comparativa, entre os fornecedores avaliados, a única droga que apresentou ausência de elemento estranho foi o guaraná. Tal fato pode ser justificado por tratar-se de droga constituída de semente, o que possivelmente facilita a remoção de elementos estranhos.

A presença de quantidade elevada de água propicia a proliferação de microrganismos e de insetos assim como favorece reações enzimáticas e/ou hidrolíticas dos constituintes da droga, com conseqüente deterioração do material vegetal. Bactérias e fungos necessitam de teores de água de cerca de 40-45% e 15-20%, respectivamente. Para a ação de enzimas, a faixa ideal de teor de água encontra-se entre 20-25% (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). Além disso, para drogas vegetais que serão submetidas à radiação, o conteúdo de água exerce importante influência na extensão das alterações químicas nos seus constituintes devido à alta reatividade dos produtos radiolíticos formados. Desta forma, a determinação do teor de água constituiu fator de fundamental importância no presente estudo.

Os resultados relativos à determinação da umidade agregada ao material conforme recebido podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3- Determinação do teor de água* nas drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C.

Droga vegetal	Fornecedor		
	A	B	C
Alcachofra (*C. scolymus* L.)	13,34%	11,85%	10,56%
Camomila (*M. recutita* L.)	13,68%	13,92%	16,62%
Ginkgo (*G. biloba* L.)	10,90%	10,62%	10,94%
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	11,01%	10,20%	9,13%

(*) Média dos resultados obtidos a partir de duas réplicas.

Quanto ao teor de água, com exceção da camomila proveniente do fornecedor C (16,62%), todas as drogas apresentaram resultados entre 8 e 14%, faixa recomendada pelo compêndio oficial adotado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Não foi possível correlacionar estes resultados com a biocarga da droga, conforme pode ser observado nas Tabelas 8 e 9, respectivamente para contagem de microrganismos aeróbicos totais e fungos.

Objetivando avaliar possível interferência da amostra na determinação da biocarga nas drogas vegetais, foi realizada a validação da metodologia empregando inoculação de cerca de 100 UFC nas amostras, conforme preconizado nos compêndios oficiais. Ensaio preliminar foi realizado utilizando a droga vegetal antes de ser submetida ao processo de descontaminação. Entretanto, a contaminação presente nas amostras (superior a 10^3 para aeróbicos totais e 10^2 para fungos) foi, no mínimo, 10 vezes maior que o inóculo impossibilitando o cálculo da porcentagem de recuperação. Assim sendo, efetuou-se procedimento alternativo empregando amostras do fornecedor C submetidas à radiação de dose média 11,7 kGy (ciclo I, Tabela 21). Os resultados obtidos na validação da técnica estão apresentados nas Tabelas 4 a 7.

Tabela 4- Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente à alcachofra (*C. scolymus* L.) proveniente do fornecedor C, irradiada com dose média de 11,7 kGy.

Inóculo Interno	Inóculo Padronizado*	Recuperação %*		
		Diluição da amostra		
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Aspergillus niger	$1,2x10^2$	99	80	89
Candida albicans	$7,0x10^1$	91	84	83
Escherichia coli	$1,4x10^2$	99	88	88
Pseudomonas aeruginosa	$1,1x10^2$	93	103	114
Staphylococcus aureus	$1,0x10^2$	83	80	81

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

Tabela 5- Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente à camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor C, irradiada com dose média de 11,7 kGy.

Inóculo Interno	Inóculo Padronizado*	Recuperação %*		
		Diluição da amostra		
		10^{-1} /	10^{-2}	/ 10^{-3}
Aspergillus niger	$1,2x10^2$	96	96	90
Candida albicans	$7,0x10^1$	114	92	90
Escherichia coli	$1,4x10^2$	90	99	91
Pseudomonas aeruginosa	$1,1x10^2$	101	103	105
Staphylococcus aureus	$1,0x10^2$	78	92	82

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

Tabela 6- Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente ao ginkgo (*G. biloba* L.) proveniente do fornecedor C, irradiado com dose média de 11,7 kGy.

Inóculo Interno	**Inóculo Padronizado***	**Recuperação %***		
		Diluição da amostra		
		10^{-1} /	**10^{-2}**	**/ 10^{-3}**
Aspergillus niger	$1,2x10^2$	101	94	80
Candida albicans	$7,0x10^1$	81	96	96
Escherichia coli	$1,4x10^2$	100	94	88
Pseudomonas aeruginosa	$1,1x10^2$	97	109	111
Staphylococcus aureus	$1,0x10^2$	84	104	104

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

Tabela 7- Validação da metodologia de contagem microbiana, com inóculo interno, referente ao guaraná (*P. cupana* H.B.K.) proveniente do fornecedor C, irradiado com dose média de 11,7 kGy.

Inóculo Interno	**Inóculo Padronizado***	**Recuperação %***		
		Diluição da amostra		
		10^{-1}	**10^{-2}**	**10^{-3}**
Aspergillus niger	$1,2x10^2$	102	110	84
Candida albicans	$7,0x10^1$	102	97	94
Escherichia coli	$1,4x10^2$	86	100	90
Pseudomonas aeruginosa	$1,1x10^2$	105	110	106
Staphylococcus aureus	$1,0x10^2$	81	94	94

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

Para as quatro drogas vegetais, observaram-se porcentagens de recuperação situadas entre 78 e 114% e, portanto, superiores ao limite mínimo de 70% especificado pela Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2002), indicando a não interferência das amostras no crescimento microbiano.

Com relação à biocarga detectada, verificaram-se elevados níveis de carga microbiana em todas as amostras. Esses resultados corroboram com trabalhos anteriores que avaliaram a qualidade microbiana de drogas vegetais (NEGRETTI, 1983; KATUSIN-RAZEM; NOVAK; RAZEM, 2001; PINTO; SATOMI, 2002). Esta coerência de resultados pode ser justificada em função da origem do material assim como da ausência de procedimentos de descontaminação, não devendo ser considerada surpreendente.

Os resultados obtidos na determinação de microrganismos aeróbicos totais, fungos e enterobactérias estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 8- Contagem de microrganismos aeróbicos totais* (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade, nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação

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

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

Para a carga de microrganismos aeróbicos totais, os resultados apresentados na Tabela 8 variaram entre $2,3x10^3$ UFC/g (guaraná fornecedor C) e $4,7x10^7$ UFC/g

(alcachofra fornecedor B). A análise das mesmas drogas obtidas por distintos fornecedores revelou diferenças de aproximadamente 3 e 4 ciclos logarítmicos entre a maior e a menor contaminação, respectivamente para o ginkgo e o guaraná. Para a alcachofra e a camomila, os resultados apresentaram maior uniformidade com carga microbiana média da ordem de 10^6 UFC/g.

Tabela 9- Contagem de fungos* (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade, nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

Droga vegetal	Fornecedor		
	A	B	C
Alcachofra (*C. scolymus* L.)	$4{,}6 \times 10^5$	$1{,}4 \times 10^5$	$1{,}5 \times 10^2$
Camomila (*M. recutita* L.)	$1{,}1 \times 10^4$	$4{,}0 \times 10^4$	$6{,}5 \times 10^3$
Ginkgo (*G. biloba* L.)	$2{,}5 \times 10^2$	$2{,}3 \times 10^3$	$6{,}0 \times 10^2$
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	$1{,}6 \times 10^4$	$3{,}3 \times 10^6$	$6{,}1 \times 10^4$

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

Os resultados relativos à contagem de fungos revelaram ocorrência desses microrganismos em níveis entre 10^2 e 10^6 UFC/g, conforme Tabela 9. Os dados obtidos não apresentaram uniformidade entre as diferentes drogas provenientes de distintos fornecedores, assim como para as drogas de um mesmo fornecedor. Durante a contagem dos fungos, pôde-se observar que a quantidade de bolores foi superior à de leveduras em todas as amostras analisadas.

Em função da carga fúngica, o risco relacionado à presença de aflatoxinas em drogas vegetais foi investigado por Lutomsky e Kedzia (1980). Em trabalho realizado em 1980, estes autores constataram que 60% de 246 amostras de drogas vegetais analisadas apresentaram contagem de contaminantes fúngicos variando de 10^2 a 10^4 UFC/g e 30% com nível superior a 10^4 UFC/g. As cepas toxigênicas foram raras, sendo que apenas 2 produziram aflatoxinas B_1.

Os resultados encontrados no presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Lutomsky e Kedzia (1980). A carga fúngica de 67% das amostras se apresentou entre 10^2 e 10^4 UFC/g e acima de 10^4 UFC/g em 33%.

Tabela 10- Contagem de enterobactérias* (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade, nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

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

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

Com referência aos resultados obtidos para enterobactérias anteriormente à irradiação, as drogas vegetais obtidas do fornecedor A e B apresentaram contagens similares (Tabela 10). As amostras provenientes do fornecedor C, excetuando-se o ginkgo, apresentaram resultados distintos quando comparadas com as amostras dos fornecedores A e B.

A reduzida carga de enterobactérias encontrada em todas as amostras do fornecedor C pode ser em decorrência de procedimentos diferenciados com relação ao cultivo, coleta, tempo e temperatura de secagem e condições higiênicas do local de trabalho, ou ainda, de eventual utilização de algum método de descontaminação (embora não se tenha solicitado). Também pode estar relacionada ao tempo de sobrevivência de tais microrganismos entre a coleta e a análise. Entretanto, tal hipótese não foi possível ser investigada, pois, embora solicitado, os fornecedores não disponibilizaram informações referentes aos registros de coleta e período de armazenamento.

É interessante observar que para todos os fornecedores o ginkgo apresentou reduzida carga de enterobactérias. Não se pode descartar a hipótese de possível resistência intrínseca da droga à contaminação por esta classe microbiana, embora a atividade antimicrobiana do ginkgo seja pouco investigada quando comparada às outras propriedades farmacológicas. Alguns autores observaram ação antifúngica (HUANG; XIE; GONG, 2000) e contra *Pneumocystis carinii* (ATZORI *et al.*, 1998) e *Listeria monocytogenes* (XIE; HETTIARACHCHY; JOHNSON, 2003).

A Tabela 11 apresenta as médias das contagens de microrganismos aeróbicos totais e fungos nas 4 drogas para cada fornecedor.

Tabela 11- Comparação entre os distintos fornecedores quanto à carga microbiana das drogas vegetais.

Fornecedor	Microrganismos aeróbicos totais (UFC/g)*	Fungos (UFC/g)*
A	$7,5x10^6$	$1,2x10^5$
B	$1,8x10^7$	$8,7x10^5$
C	$2,6x10^5$	$1,7x10^4$

(*) Média dos resultados obtidos nas quatro espécies vegetais.

Observaram-se menores cargas microbianas nas drogas obtidas daquele identificado como C e maiores para o fornecedor B. Pode-se inferir que as drogas obtidas deste fornecedor apresentaram nível de qualidade inferior, quando comparada àquelas provenientes das demais empresas. Estes resultados podem indicar procedimentos diferenciados nas etapas de cultivo, colheita, tempo e temperatura de secagem e condições de armazenamento das drogas. Desta forma, o conhecimento da origem, condições de higiene da obtenção da droga, assim como de seu armazenamento, constituem-se informações de fundamental importância na interpretação dos resultados obtidos.

Embora nas monografias farmacopêicas os requisitos quanto aos limites microbianos no que se diz respeito à ausência de patógenos ou seus indícios variem

para distintas drogas vegetais, foi adotada forma padronizada de pesquisa, abrangendo: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* sp, *Escherichia coli* e bolores do gênero *Aspegillus.* No que se refere à pesquisa de patógenos específicos os resultados estão apresentados nas Tabelas 12 a 15.

Tabela 12- Provas bioquímicas para identificação presuntiva de contaminantes microbianos isolados das amostras de alcachofra (*C. scolymus* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

Pesquisa de	Provas bioquímicas	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado / % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar McConkey	(+) / (+) / (-)	Presença / 33,3 %
	Ágar eosina azul de Metileno	(+) / (-) / NA	
	Coloração de Gram	BGN / NA / NA	
	Ágar Tríplice açúcar - ferro	(+) / NA / NA	
	Teste de Indol	(+) / NA / NA	
	Teste de Vermelho de Metila	(+) / NA / NA	
	Teste de Voges Proskauer	(+) / NA / NA	
	Citrato	(+) / NA / NA	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Produção de Fluoresceína	NA / NA / NA	
	Produção de Piocianina	NA / NA / NA	
	Citocromo-oxidase	NA / NA / NA	
	Crescimento a 41°C	NA / NA / NA	
Salmonella sp	Meio de Diferenciação Ágar Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	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	NA / NA / NA	
	Urease	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(-) / (-) / (+)	Ausência / 0%
	Coloração de Gram	NA / NA / CGP	
	Coagulase	NA / NA / (-)	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / (-)	

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

Tabela 13- Provas bioquímicas para identificação presuntiva de contaminantes microbianos isolados das amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

Pesquisa de	Provas Bioquímicas	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado / % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar McConkey	(+) / (+) / (-)	Ausência / 0%
	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	NA / NA / NA	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Produção de Fluoresceína	NA / NA / NA	
	Produção de Piocianina	NA / NA / NA	
	Citocromo-oxidase	NA / NA / NA	
	Crescimento a 41°C	NA / NA / NA	
Salmonella sp	Meio de Diferenciação Ágar Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	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	NA / NA / NA	
	Urease	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Coagulase	NA / NA / NA	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / NA	

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

Tabela 14- Provas bioquímicas para identificação presuntiva de contaminantes microbianos isolados das amostras de ginkgo (*G. biloba* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

Pesquisa de	Provas Bioquímicas	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado / % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar McConkey	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	Ágar eosina azul de Metileno	NA / NA / 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	NA / NA / NA	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Produção de Fluoresceína	NA / NA / NA	
	Produção de Piocianina	NA / NA / NA	
	Citocromo-oxidase	NA / NA / NA	
	Crescimento a 41°C	NA / NA / NA	
Salmonella sp	Meio de Diferenciação Ágar Verde Brilhante	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	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	NA / NA / NA	
	Urease	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(-) / (-) / (-)	Ausência / 0%
	Coloração de Gram	NA / NA / NA	
	Coagulase	NA / NA / NA	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / NA	

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

Tabela 15- Provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

Pesquisa de	Provas Bioquímicas	Resultados	
		Fornecedores A/B/C	Resultado e % isolamento
Escherichia coli	Meio de Diferenciação Ágar McConkey	(+) / (+) / (-)	Presença / 33,3 %
	Ágar eosina azul de Metileno	(-) / (+) / NA	
	Coloração de Gram	NA / BGN / NA	
	Ágar Tríplice açúcar - ferro	NA / (+) / NA	
	Teste de Indol	NA / (+) / NA	
	Teste de Vermelho de Metila	NA / (+) / NA	
	Teste de Voges Proskauer	NA / (+) / NA	
	Citrato	NA / (+) / NA	
Pseudomonas aeruginosa	Meio de Diferenciação Ágar cetrimida	(+) / (+) / (-)	Presença / 66,7%
	Coloração de Gram	BGN / BGN / NA	
	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 / 0%
	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	NA / NA / NA	
	Urease	NA / NA / NA	
	Fermentação da lactose	NA / NA / NA	
Staphylococcus aureus	Meio de Diferenciação Ágar Vogel Jonhson	(-) / (-) / (+)	Ausência / 0%
	Coloração de Gram	NA / NA / CGP	
	Coagulase	NA / NA / (-)	
	Desoxiribonuclease	NA / NA / (-)	

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

Os microrganismos que apresentaram resultados característicos na identificação presuntiva, foram identificados pelo sistema Vitek®. Os resultados obtidos nas provas bioquímicas estão relacionados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16- Provas bioquímicas realizadas empregando Sistema Vitek® para confirmação da identidade das cepas de *E. coli* isoladas das drogas vegetais

Provas Bioquímicas	Droga Vegetal / Fornecedor	
	Alcachofra / A	Guaraná / B
Urease	-	-
Maltose	+	+
Inositol	-	-
Arabinose	+	+
Glucose (oxidativa)	+	+
Citrato	-	-
Manitol	+	+
Adonitol	-	-
Glucose (fermentativa)	+	+
Malonato	-	-
Xilose	+	+
p-cumárico	-	+
Arginina	-	-
Acetamida	-	-
Triptofano deaminase	-	-
Rafinose	-	-
H_2S	-	-
Lisina	+	-
Esculina	-	-
Polimixina-B	-	-
Sorbitol	+	+
p-nitrofenil-β,d-galactopiranosídeo	+	+
Ornitina	-	-
Plant indicam	-	-
Lactose	+	+
Sucrose	-	-
Ramnose	+	+
Oxidase	-	-

(+) Reação positiva
(-) Reação negativa

Tabela 17- Provas bioquímicas realizadas empregando Sistema Vitek® para confirmação da identidade das cepas de *P. aeruginosa* isoladas das drogas vegetais.

Provas Bioquímicas	Droga Vegetal / Fornecedor	
	Guaraná / A	Guaraná / B
Ácido azelaico	-	-
Histidina (assimilação)	+	+
Itaconato (assimilação)	+	+
Ácido d-L-β-hidroxibutírico	+	+
Maltotriose	-	-
Ácido sebácico	-	-
Alanina (assimilação)	+	+
Ácido heptanoico	-	+
Ácido L-aspártico	+	+
d-manose	-	-
Suberato (assimilação)	-	-
n-acetil-d-glucosamina	+	-
Citrato	+	+
Arabinose	-	-
Sucrose	-	-
Ácido propiônico	+	+
Ácido adipico	-	-
Acetato de sódio	+	+
Galactose	-	-
Trealose	-	-
L-prolina	+	+
Ácido glucônico	+	+
Inositol	-	-
Glucose (fermentativa)	+	+
Xilose	-	-
d-L-lactato (assimilação)	+	+
Manitol	+	+
Maltose	-	-

(+) Reação positiva
(-) Reação negativa

Tabela 18- Identificação dos microrganismos isolados das drogas vegetais isoladas dos fornecedores A e B empregando Sistema Vitek®.

Droga Vegetal	Fornecedor	Identificação presuntiva	Identificação empregando Sistema Vitek®*
Alcachofra (*C. scolymus* L.)	A	*E. coli*	*E.coli* (99%)
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	A	*P. aeruginosa*	*P.aeruginosa* (99%)
	B	*E. coli*	*E.coli* (98%)
		P. aeruginosa	*P.aeruginosa* (98%)

(*) Porcentagem de identificação.

Os resultados obtidos na identificação empregando o Sistema Vitek® confirmaram a identificação presuntiva dos microrganismos contaminantes com elevadas porcentagens de identificação.

Pôde se observar que espécie vegetal que se mostrou mais contaminada foi o guaraná, com presença de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras dos fornecedores A e B, e *Escherichia coli* na amostra do fornecedor B. *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* não foram detectados em qualquer das amostras. Nas amostras obtidas do fornecedor C, não foram detectados os microrganismos pesquisados.

Durante pesquisa de bolores do gênero *Aspergillus* procedeu-se à identificação de contaminantes de outros gêneros, e quando possível, à identificação das espécies. Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 19.

Tabela 19- Pesquisa de bolores do gênero *Aspergillus*, nas drogas vegetais não submetidas à irradiação.

Droga vegetal	Fornecedor	Resultados	
		Gênero *Aspergillus*	**Outros fungos isolados**
Alcachofra (*C.scolymus* L.)	A	*A. niger, A. fumigatus*	—
	B	*A. niger, A. fumigatus*	*Chaetomium*
	C	*A. niger, A. flavus*	*Chaetomium, Penicillium crysogenum*
Camomila (*M. recutita* L.)	A	*A. flavus*	—
	B	*Aspergillus* sp, *A. flavus*	—
	C	*Aspergillus* sp, *A. fumigatus*	—
Ginkgo (*G. biloba* L.)	A	—	—
	B	*A. niger*	*Penicillium crysogenum, Penicillium* spp
	C	*A. niger*	—
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	A	*A. niger*	—
	B	*A. niger*	—
	C	—	—

Na identificação dos bolores contaminantes, observou-se presença do gênero *Aspergillus* em 83% das amostras, sendo a espécie *Aspergillus niger* mais freqüente, seguida de *Aspergillus flavus* (25%) e *Aspergillus fumigatus* (25%).

Hitokoto *et al.* (1978) encontraram resultados semelhantes durante investigação dos contaminantes fúngicos em drogas vegetais. Os gêneros mais freqüentes foram *Aspergillus* e *Penicillium.* Entre o gênero *Aspergillus, A. niger* foi a espécie predominante, seguida de *A. glaucus* e *A. flavus.*

Na Índia, Roy e Chourasia (1989) detectaram fungos do gênero *Aspergillus* em 27 amostras de plantas medicinais dentre as 37 analisadas. Após identificação das espécies, foi investigada a produção de aflatoxinas por 50 cepas de *A. flavus* isoladas das drogas, sendo que 21 eram potencialmente produtores de aflatoxina B_1. Os autores concluíram que as condições de armazenamento empregadas (25-35°C e 55-90% de U.R.) propiciaram a proliferação de bolores e possivelmente a produção de aflatoxinas nas drogas vegetais.

Com relação à determinação de aflatoxinas em drogas vegetais, um estudo realizado por Selim *et al.* (1996) revelou que, de 31 amostras de plantas medicinais, 29% estavam contaminadas com aflatoxina B_1 em concentrações de 24 a 105 ppb.

No presente trabalho, como não se determinou a presença de aflatoxinas, mesmo nas amostras mais contaminadas por bolores, não se pôde avaliar o risco, entretanto, os elevados níveis de fungos indicam condições inadequadas de conservação das drogas vegetais analisadas.

Alguns autores, após avaliação da qualidade microbiana de plantas medicinais ou de suas partes, não observaram relação entre a carga microbiana e a parte do vegetal considerada (LUTOMSKY; KEDZIA, 1980; NEGRETTI, 1983). Em contraste, Kedzia e Kolderna (1984) encontraram que os frutos, sementes e cascas apresentam menor carga bacteriana e fúngica quando comparadas a folhas, flores, rizomas e o vegetal todo. De forma semelhante, Katusin-Razem, Novak e Razem (2001) consideraram que flores e folhas apresentam maior contaminação microbiana que frutos e sementes devido à superfície com maior área de contato. Negretti (1983) detectou microrganismos patogênicos mais frequentemente em raízes,

rizomas, cascas e folhas, comparando com frutos e com a planta considerada no todo. A Tabela a seguir relaciona as médias de contaminação por aeróbicos totais e fungos dos três fornecedores, para cada droga vegetal.

Tabela 20- Comparação da carga microbiana entre as 4 drogas vegetais.

Droga vegetal	Microrganismos aeróbicos totais (UFC/g)*	Fungos (UFC/g)*
Alcachofra (*C. scolymus* L.)	$2,3x10^6$	$2,0x10^5$
Camomila (*M. recutita* L.)	$3,7x10^6$	$1,9x10^4$
Ginkgo (*G. biloba* L.)	$3,3x10^6$	$1,0x10^3$
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	$7,1x10^6$	$1,1x10^6$

(*) Média dos resultados obtidos para os três fornecedores.

No presente trabalho, dentre as drogas vegetais estudadas duas constituíam-se de folhas (alcachofra e ginkgo), uma de flores (camomila) e uma de sementes (guaraná). Pela análise dos resultados encontrados na Tabela 20 (média de todos os fornecedores para cada droga), não foi possível relacionar a carga contaminante com a parte utilizada do vegetal, até mesmo devido à baixa representatividade das amostras relativas aos diferentes órgãos vegetais. Entretanto, o guaraná foi a espécie que apresentou, em média, maiores contagens para microrganismos aeróbicos totais e fungos, bem como maior frequência de patógenos específicos.

Este fato se torna preocupante do ponto de vista de saúde pública, visto que é uma droga amplamente comercializada em farmácias e drogarias, principalmente na forma de pós ou cápsulas. Durante as etapas de produção, estas especialidades não passam por qualquer procedimento com a finalidade de reduzir a carga microbiana, podendo até mesmo ocorrer contaminação secundária nas etapas de moagem, tamização e encapsulamento.

Em trabalho realizado por Fischer (1992), dentre as 84 especialidades fitoterápicas submetidas à análise microbiológica, 27 eram produtos contendo

guaraná nas formas de pós, cápsulas e comprimidos. Cerca de 85% das amostras apresentaram número mais provável (NMP) de bactérias mesófilas entre 10^4 e 10^8/g, 14 amostras com coliformes totais, uma com *Escherichia coli* e uma com suspeita de *Salmonella* sp. Resultados semelhantes foram encontrados para os produtos a base de alcachofra (5 cápsulas e 1 comprimido) que apresentaram contaminação entre 10^3 e 10^6 NMP/g.

No que se refere aos padrões microbianos, a legislação vigente (RDC 17, de 24/02/00) (BRASIL, 2000) cita que a pesquisa de contaminantes microbiológicos deve seguir critérios da Farmacopéia Brasileira ou da Organização Mundial da Saúde. Entretanto, na edição vigente da Farmacopéia Brasileira (1988) não constam especificações referentes à qualidade microbiana de drogas vegetais.

Comparando os resultados da contagem de microrganismos aeróbicos totais (Tabela 8) com as especificações da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1998), nenhuma das drogas vegetais excedeu o valor de 10^7 UFC/g, limite especificado para materiais destinados ao preparo de infusos ou ao uso tópico. No caso de uso interno distinto, para o qual o limite é 10^5 UFC/g, as amostras de alcachofra, camomila e guaraná provenientes dos fornecedores A e B, e de ginkgo do fornecedor B, estariam em desacordo. Para ginkgo e camomila, a Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2003) estabelece limite de 10^4 UFC/g, quesito atendido, embora no limite superior, apenas pelas amostras de ginkgo dos fornecedores A e B.

Em relação à contaminação fúngica, os limites preconizados pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1998), são de 10^4 UFC/g para drogas destinadas ao preparo de infusos e uso tópico e 10^3 UFC/g para uso interno. Analisando os resultados apresentados na Tabela 9, as amostras de alcachofra dos fornecedores A e B e guaraná do fornecedor B estariam impróprias para consumo, mesmo que tratadas com água fervente para o preparo de infusos. Para outras formas de uso interno, apenas as amostras de alcachofra e camomila provenientes do fornecedor C e ginkgo provenientes dos três fornecedores estariam dentro do limite especificado. Entretanto, se compararmos com os limites definidos pela Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2003), o ginkgo do fornecedor B e a camomila do C também estão acima do limite aceitável.

Confrontando os resultados obtidos na contagem de enterobactérias (Tabela 10) com os padrões da OMS (World Health Organization, 1998), as amostras de camomila e alcachofra provenientes dos fornecedores A e B estão acima do limite especificado para uso tópico e para uso interno.

A questão dos padrões microbianos para produtos fitoterápicos tem sido amplamente discutida no meio científico (LENOBLE *et al.*, 1980; FISCHER, 1992; FISCHER; OHARA; SAITO, 1996). Ao considerar os produtos fitoterápicos como forma alternativa de terapêutica difundida ao nível mundial, evidencia-se a importância de níveis de qualidade adequados que garantam a pureza microbiana. Se por um lado é evidente a necessidade de padrões microbianos específicos para drogas vegetais com suas particularidades, não se pode dissociar do fato de que as especialidades farmacêuticas são medicamentos. Portanto, devem apresentar padrão de qualidade, o que não se verifica na prática, expondo o consumidor a eventuais riscos. Desta forma, o controle da contaminação microbiana nas matérias-primas vegetais é de fundamental importância para a obtenção de produtos fitoterápicos de qualidade microbiana aceitável.

Mesmo após os processos de extração empregando solventes alcoólicos e/ou temperaturas elevadas, parte da carga microbiana inicialmente presente nas drogas vegetais pode sobreviver, e até mesmo contaminação secundária pode ser esperada, acarretando contaminação nos produtos (medicamentos ou cosméticos) aos quais os extratos serão adicionados. Negretti (1983) avaliou a contaminação microbiana em extratos de drogas vegetais encontrando 29,99% dos extratos secos com carga bacteriana superior a 10^3 UFC/g. *Pseudomonas aeruginosa* esteve presente em uma amostra de extrato seco e em uma de extrato líquido, enquanto que *Staphylococcus aureus* foi encontrado em 7 extratos.

Da mesma forma, Katusin-Razem, Novak e Razem (2001) encontraram extratos de drogas vegetais com elevado nível de contaminação. Os extratos aquosos de funcho apresentaram carga bacteriana da ordem de 10^4 UFC/g e os extratos secos de hipérico, alcachofra, melissa, menta e valeriana entre 10^2 e 10^3 UFC/g.

No caso de drogas vegetais utilizadas para o preparo de infusos, embora a maioria dos microrganismos presentes possa ser inativada pela temperatura elevada, o infuso pode permanecer com carga microbiana relativamente elevada, dependendo das espécies e do nível de contaminação inicial da droga. O resultado pode ser o crescimento dos microrganismos sobreviventes quando o chá não é consumido de imediato, prejudicando a estabilidade e causando alterações das características organolépticas. Além disso, bactérias esporuladas, incluindo espécies que causam intoxicações ou toxinfecções (*Bacillus cereus, Clostridium sporogenes, Clostridium perfringens*) são normalmente encontradas em drogas vegetais (KATUSIM-RAZEM *et al.*, 1983).

Em Portugal, Martins *et al.* (2001) avaliaram a qualidade sanitária de 62 plantas medicinais destinadas ao preparo de infusos, as quais foram adquiridas no comércio local. Praticamente todas as amostras (96,8%) estavam contaminadas com *Bacillus cereus,* sendo 19,2% com níveis maiores que 10^3 UFC/g. Esporos de *Clostridium perfringens* foram detectados em 83,9% das amostras e, com nível superior a 10^3 UFC/g, em 19,2%. O nível médio de contaminação fúngica entre as amostras foi de 10^5 UFC/g.

A sobrevivência microbiana após a infusão em amostras de camomila, tília, menta e rosa canina foi estudada por Katusin-Razem *et al.* (1988). Foi realizada a determinação de microrganismos aeróbicos totais inicialmente presentes nas amostras e nos respectivos infusos, após 10 minutos do preparo. A porcentagem de microrganismos sobreviventes variou em média de 1,8% para camomila e tília, e, 80% para menta e rosa canina.

Em trabalho semelhante, Araújo (1998) avaliou a qualidade microbiana de drogas vegetais comercializadas em feiras do município de São Paulo e de seus infusos. Embora tenha constatado baixa qualidade sanitária das amostras, considerou como sendo seguro o consumo após adição de água fervente, já que houve inativação dos microrganismos patogênicos.

Em abordagem de outro âmbito, o processo de irradiação deve ser controlado, de modo que se conheça a dose atingida no material a ser descontaminado. A não homogeneidade da dose é aceitável, entretanto, doses

muito elevadas devem ser evitadas a fim de não acarretar alterações no material vegetal, e, ainda, deve ser assegurado que todos os pontos do lote irradiado recebam a dose mínima que garanta a eficácia do processo.

No presente trabalho, o processo de irradiação foi monitorado por dosímetros. Os valores das doses máxima e mínima atingidas nas drogas vegetais, bem como das razões entre elas estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21- Monitoração das doses durante o processo de irradiação das drogas vegetais.

Ciclo	Dose (kGy)				Razão $D_{máx}$ / $D_{mín}$
	Planejada	Detectada			
		Faixa (mínima – máxima)	Média / ciclo	Média - ciclos	
I		5,0 – 5,6	5,3		1,1
II	5	5,1 – 6,4	5,7	5,5	1,2
III		5,2 – 5,8	5,5		1,1
I		10,8 – 12,6	11,7		1,2
II	10	9,9 - 12,4	11,1	11,4	1,2
III		10,4 - 12,5	11,4		1,2
I		16,1 – 20,2	18,1		1,2
II	15	15,0 – 19,2	17,1	17,8	1,3
III		17,0 – 19,2	18,1		1,1

Para finalidade de pesquisa, uma razão entre $D_{máx}$ e $D_{mín}$ de 1,4 ou 1,2 é desejada e pode ser alcançada, portanto os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios. Entretanto, em situações comerciais, razões até três são frequentemente consideradas aceitáveis, especialmente em materiais de densidade irregular. A OMS reconhece que a dose máxima atingida em alimentos irradiados pode ser até 50% maior (DIEHL, 1990).

A eficácia da irradiação na redução da carga microbiana das drogas vegetais pode ser visualizada nas Tabelas 22 a 27.

Tabela 22- Contagem de microrganismos aeróbicos totais (UFC/g) nas drogas vegetais antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy) e a redução da carga microbiana em ciclos logarítmicos.

Droga vegetal	Fornecedor	Contagem (UFC/g)*		Redução ciclos log**	Contagem* (UFC/g)	Redução ciclos log**	Contagem* (UFC/g)	Redução ciclos log**
		Antes da irradiação	Após 5,5kGy		Após 11,4kGy		Após 17,8kGy	
Alcachofra (*C. scolymus* L.)	A	$1,3x10^7$	$5,1x10^4$	2	$1,4x10^2$	5	6	6
	B	$4,7x10^7$	$6,6x10^4$	2	$1,8x10^2$	5	5	7
	C	$8,4x10^5$	$9,9x10^2$	3	3	6	5	6
Camomila (*M. recutita* L.)	A	$3,0x10^6$	$6,3x10^4$	1	4	6	<10	6
	B	$7,8x10^6$	$4,9x10^6$	1	$3,2x10^4$	3	6,3x10	5
	C	$1,7\ x10^5$	$1,4x10^3$	2	1	5	<10	5
Ginkgo (*G. biloba* L.)	A	$1,8x10^4$	$2,0x10^2$	2	2	4	<10	4
	B	$9,8x10^6$	8,8x10	5	1	7	<10	7
	C	$1,2x10^4$	2,7x10	3	2	4	1	4
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	A	$1,4x10^7$	$5,2x10^3$	3	2,2x10	6	<10	7
	B	$7,3x10^6$	$1,6x10^3$	4	2,0x10	6	1	7
	C	$2,3x10^3$	$2,3x10^2$	1	5	3	1	3

(*) Média dos valores obtidos nos três ciclos. Valores <10 indicam ausência de crescimento nas três réplicas.
(**) Valores aproximados. Para efeito de cálculo, números acima de 5,0 foram considerados como um valor exponencial acima.

Tabela 23- Contagem de fungos (UFC/g) nas drogas vegetais antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy) e a redução da carga microbiana em ciclos logarítmicos.

Droga vegetal	Fornecedor	Contagem (UFC/g)		Redução ciclos log**	Contagem (UFC/g)	Redução ciclos log**	Contagem (UFC/g)	Redução ciclos log**
		Antes da irradiação	Após 5,5kGy*		Após 11,4kGy*		Após 17,8kGy*	
Alcachofra (*C. scolymus* L.)	A	$4,6x10^5$	1,0x10	4	1,3x10	4	2	5
	B	$1,4x10^5$	1,0x10	4	1,0x10	4	3	5
	C	$1,5x10^2$	9	1	3	2	4	2
Camomila (*M. recutita* L.)	A	$1,1x10^4$	3	4	5	4	<10	4
	B	$4,0x10^4$	1,2x10	3	3	4	3	4
	C	$6,5x10^3$	4	4	5	4	3	4
Ginkgo (*G. biloba* L.)	A	$2,5x10^2$	2	2	2	2	2	2
	B	$2,3x10^3$	3	3	3	3	<10	3
	C	$6,0x10^2$	5	3	3	3	3	3
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	A	$1,6x10^4$	3	4	1	4	1	4
	B	$3,3x10^6$	3,3x10	5	1,2x10	5	3	6
	C	$6,1x10^4$	1	5	3	5	1	5

(*) Média dos valores obtidos nos três ciclos. Valores <10 indicam ausência de crescimento nas três réplicas.
(**) Valores aproximados. Para efeito de cálculo, números acima de 5,0 foram considerados como um valor exponencial acima.

Tabela 24- Contagem de enterobactérias (UFC/g) nas drogas vegetais antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).

Droga vegetal	Fornecedor	Contagem (UFC/g)			
		Antes da descontaminação	Após 5,5kGy*	Após 11,4kGy*	Após 17,8kGy*
Alcachofra (*C. scolymus* L.)	A	$4,1x10^5$	<10	<10	<10
	B	$5,0x10^5$	<10	<10	<10
	C	<10	<10	<10	<10
Camomila (*M. recutita* L.)	A	$4,5x10^5$	$3,2x10^3$	<10	<10
	B	$8,7x10^6$	$1,0x10^5$	<10	<10
	C	<10	<10	<10	<10
Ginkgo (*G. biloba* L.)	A	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10
	C	<10	<10	<10	<10
Guaraná (*P. cupana* H.B.K.)	A	$6,5x10^2$	<10	<10	<10
	B	$1,5x10^3$	<10	<10	<10
	C	<10	<10	<10	<10

(*) Média dos valores obtidos nos três ciclos. Valores <10 indicam ausência de crescimento nas três réplicas.

Tabela 25- Pesquisa de microrganismos patogênicos específicos em drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, após irradiação (dose média de 5,5 kGy).

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

(+) Crescimento típico
(-) Crescimento atípico

Tabela 26- Pesquisa de microrganismos patogênicos específicos em drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, após irradiação (dose média de 11,4 kGy).

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

(+) Crescimento típico
(-) Crescimento atípico

Tabela 27- Pesquisa de microrganismos patogênicos específicos em drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, após irradiação (dose média de 17,8 kGy).

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

(+) Crescimento típico
(-) Crescimento atípico

Após irradiação com dose média de 5,5 kGy, observou-se a não uniformidade entre as amostras na redução da carga de microrganismos aeróbicos totais, que variou de 1 a 5 ciclos logarítmicos (Tabela 22). Ao realizar análise comparativa entre as espécies vegetais, observou-se população microbiana com maior radiorresistência entre as amostras de camomila e menor entre as amostras de ginkgo. Com exceção da camomila do fornecedor B, após irradiação com dose média de 11,4 kGy todas as amostras apresentaram contagem menor ou igual a 10^2 UFC/g de microrganismos aeróbicos totais. Após dose média de 17,8 kGy, e novamente excetuando-se a camomila do fornecedor B, todas as amostras apresentaram carga menor que 10 UFC/g.

No caso da camomila, observou-se que, apesar das três amostras apresentarem cargas microbianas iniciais similares, aquela proveniente do fornecedor B apresentou população microbiana mais resistente à radiação permanecendo com carga de $3{,}2 \times 10^4$ UFC/g após irradiação com dose média de 11,4 kGy (Tabela 22). Ao confrontar estes resultados com aqueles apresentados na Tabela 1, observa-se que o material de acondicionamento empregado pelo fornecedor B, para a camomila, foi a caixa de papelão.

Com relação ao efeito da irradiação sobre a carga fúngica (Tabela 23), constatou-se que a menor dose média aplicada (5,5 kGy) foi suficiente para reduzir a contagem inicial para valores aceitáveis em todas as amostras.

Os resultados encontrados são coerentes, pois, de acordo com dados encontrados em literatura, doses de 3 a 10 kGy podem reduzir o número de microrganismos aeróbicos totais a níveis menores que 10^3 a 10^4 UFC/g, e doses entre 16 e 20 kGy a menos que 10 UFC/g (FARKAS, 1988). Aziz *et al.* (1997) constataram que dose de 5 kGy foi eficaz para eliminação de bolores em plantas medicinais.

De acordo com dados de literatura, bactérias da família *Enterobacteriaceae* são relativamente sensíveis à radiação mesmo em materiais secos e, na maioria dos casos, dose de cerca 5 kGy é eficaz para a eliminação da carga inicial (FARKAS, 1988). Os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 24) apresentam coerência com os mencionados por Farkas, excetuando-se as amostras de

camomila dos fornecedores A e B que apresentaram, respectivamente, contagens da ordem de 10^3 e 10^5 UFC/g após irradiação com dose média de 5,5 kGy.

Diversos trabalhos têm demonstrado a eficácia da irradiação na redução da carga microbiana de drogas vegetais (KATUSIM-RAZEM *et al.*, 1983; FARKAS, 1988; KATUSIM-RAZEM *et al.*, 1988; AZIZ *et al.*, 1997). Com relação aos seus efeitos sobre os constituintes químicos alguns autores concluíram pela ausência de alterações significativas (MIDGAL; OWCZARCZYK, 1998; SIGNORETTI *et al.*, 1998). Entretanto devido à complexidade e às particularidades de cada droga vegetal, a descontaminação empregando radiação ionizante, bem como qualquer outro agente, deve ser estudada criteriosamente para cada caso, com vistas a manter a integridade dos princípios ativos.

Fang e Wu (1998) avaliaram os efeitos da irradiação sobre drogas vegetais empregando testes de atividade biológica e testes químicos, e concluíram que os testes químicos são mais sensíveis e mais confiáveis.

A escolha do método analítico para a determinação dos marcadores vegetais, bem como a sua validação, deve ser criteriosa visando a obtenção de resultados seguros, principalmente quando se trata de pesquisa de alterações nos teores.

No presente trabalho, foi priorizada a utilização de métodos farmacopeicos por serem devidamente validados e, portanto, com maior grau de confiabilidade. Para a determinação de 7-glicosil apigenina em camomila e dos glicosídeos flavonoídicos, em ginkgo, a Farmacopéia Americana apresenta em suas monografias metodologias que empregam a técnica de CLAE. Na Farmacopéia Brasileira (1977) a monografia do guaraná apresenta método gravimétrico para a determinação de cafeína. Entretanto, neste caso, utilizou-se método encontrado em literatura que emprega técnica de CLAE, por apresentar maior sensibilidade e especificidade, quando comparada com a técnica adota pela Farmacopéia Brasileira.

Para a determinação do marcador da alcachofra, o ácido 1,5-dicafeilquínico (cinarina), a Farmacopéia Brasileira 3ª edição (1977) descreve metodologia empregando espectrofotometria. Entretanto, a descrição da técnica é superficial, além de não conter os métodos de extração e preparo da amostra (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

Sabe-se que os ácidos cafeoilquínicos são altamente instáveis podendo sofrer reações de isomerização através de hidrólise e posterior transesterificação intramolecular durante a extração. Esta característica faz com que a composição do extrato dependa do solvente utilizado no processo (ADZET; PUIGMACIA, 1985).

A cromatografia líquida de alta eficiência seria a técnica mais adequada para a realização destas análises. Neste sentido, foi testada metodologia encontrada em literatura para extração e identificação/determinação (ADZET; PUIGMACIA, 1985). Entretanto, nesta publicação faltaram informações essenciais para a reprodução do método, como por exemplo a quantidade de solvente de extração e a concentração da fase móvel.

Outra tentativa foi realizada com metodologia para determinação de ácidos cafeoilquínicos em extratos padronizados de acordo com o método da empresa Finzelberg da Alemanha (FINZELBERG, 2000). Os resultados para a droga vegetal *in natura* não foram satisfatórios, não tendo sequer detectado resposta para a cinarina.

Tendo em vista a falta de metodologia adequada à determinação do marcador, não foi possível realizar a análise para a determinação de seu teor e de possível alteração do mesmo após o tratamento descontaminante.

Com relação à determinação de α-bisabolol em camomila, foi empregado método descrito em artigo científico, devido à ausência de informações nos compêndios oficiais.

O desenvolvimento de metodologias para a determinação de terpeno lactonas, em folhas de ginkgo, têm sido amplamente discutido no meio científico. As dificuldades encontradas estão relacionadas ao baixo teor destes compostos na droga (cerca de 0,1%) e, principalmente, à presença de grandes quantidades de impurezas como: ácidos ginkgólicos, biflavonas e clorofila.

Para a determinação de um marcador que representasse esta classe como, por exemplo, o ginkgolídeo B ou o bilobalídeo, a idéia inicial era utilizar metodologia descrita por Van Beek *et al.* (1991) que emprega técnica de CLAE. Entretanto, tal metodologia apresenta etapa de purificação que utiliza mais de uma coluna de

separação em fase sólida, com demanda adicional de tempo de análise, além de não ter apresentado robustez satisfatória. Adicionalmente o detector empregado é o UV, considerado por trabalhos posteriores como inadequado devido ao fato dos ginkgolídeos possuírem valores de absortividade muito baixos (VAN BEEK, 2002).

Na 26ª edição da Farmacopéia Americana foi incluída metodologia para a extração e a determinação de terpeno lactonas em folhas de ginkgo. Trata-se de técnica por CLAE com detecção por espalhamento de luz (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2003). A utilização deste tipo de detector apresenta vantagens com relação ao UV, como: menor variação nos fatores de resposta, maior estabilidade da linha de base e maior sensibilidade (VAN BEEK, 2002). Seria a opção mais adequada para a determinação dos ginkgolídeos, principalmente por se tratar de metodologia oficial. Entretanto não foi possível ser realizada pela indisponibilidade do detector empregado. Sendo assim, o ginkgo foi avaliado somente com relação ao teor de glicosídeos flavonoídicos.

Na etapa preliminar às determinações dos marcadores nas drogas vegetais, foram verificados alguns parâmetros de validação para se estabelecer a confiabilidade dos métodos cromatográficos utilizados. Os parâmetros avaliados foram aqueles requeridos para metodologias farmacopeicas (linearidade, exatidão e precisão) conforme preconizado pela RDC nº 84 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002).

Após definição das faixas de concentração para as análises, foram construídas as curvas de calibração para os marcadores: 7-glicosil apigenina, α-bisabolol, quercetina e cafeína (Figuras 1 a 4).

Figura 1- Curva de calibração para a validação da metodologia de determinação de 7-glicosil apigenina em camomila. Método: CLAE.

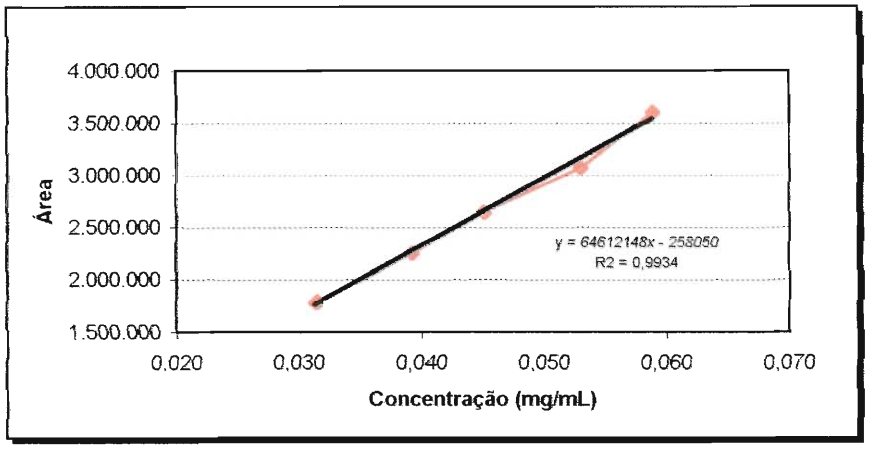


Figura 2- Curva de calibração para a validação da metodologia de determinação de α-bisabolol em óleo volátil de camomila. Método: CG.

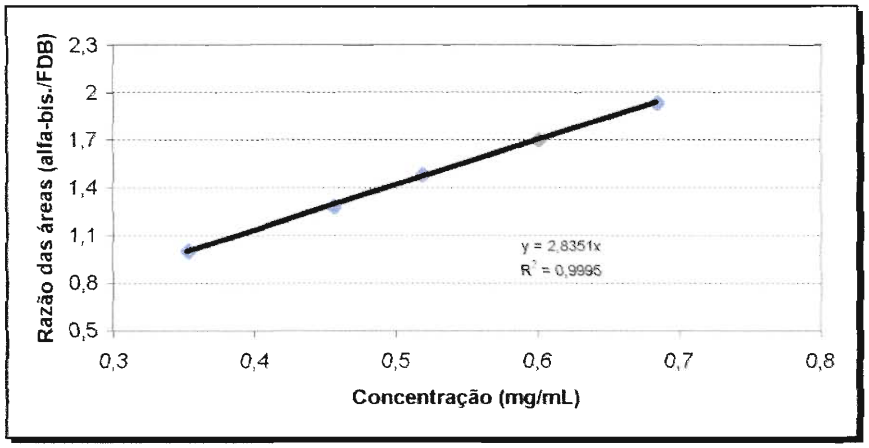


Figura 3- Curva de calibração da quercetina para a validação da metodologia de determinação de glicosídeos flavonoídicos em ginkgo. Método: CLAE.

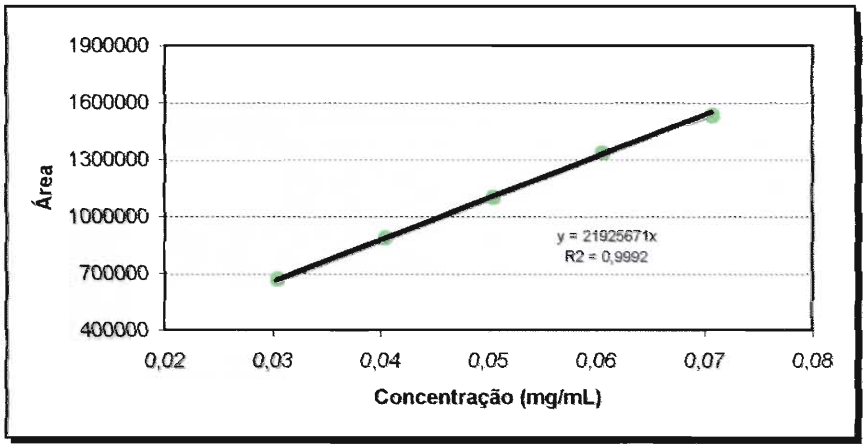
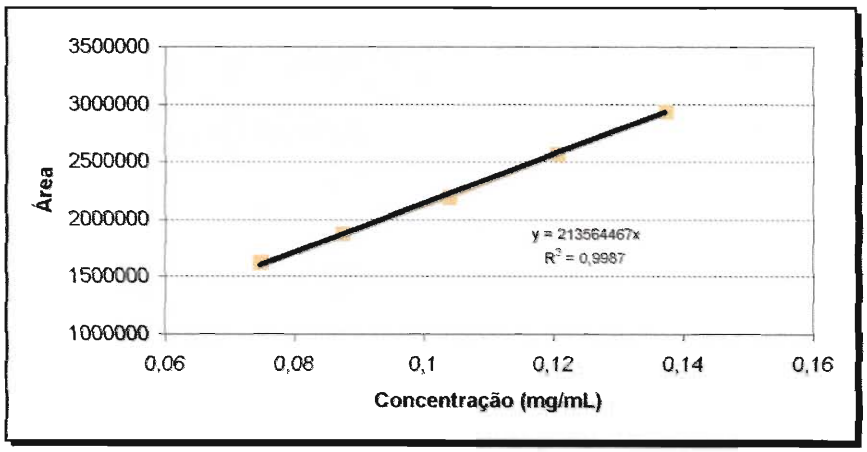


Figura 4- Curva de calibração para a validação da metodologia de determinação de cafeína em guaraná. Método: CLAE.



Para as 4 curvas obteve-se linearidade satisfatória ($r^2 > 0,99$) entre as áreas dos picos e as concentrações dos analitos.

As Tabelas 28 a 31 mostram os resultados obtidos para os testes de recuperação dos marcadores.

Tabela 28- Avaliação da exatidão para a metodologia de determinação de 7-glicosil apigenina em camomila, empregando CLAE.

Concentração de padrão adicionado (μg/mL)	Concentração de padrão recuperado (μg/mL)	Recuperação (%)
9,80	9,59	97,91
22,54	21,48	95,31
35,28	33,90	96,09

Tabela 29- Avaliação da exatidão para a metodologia de determinação de α-bisabolol em óleo volátil de camomila, empregando CG.

Concentração de padrão adicionado (μg/mL)	Concentração de padrão recuperado (μg/mL)	Recuperação (%)
98,4	80,3	81,61
246,0	197,6	80,33
393,6	326,1	82,85

Tabela 30- Avaliação da exatidão para a metodologia de determinação de glicosídeos flavonoídicos em ginkgo, empregando CLAE.

Concentração de padrão adicionado (μg/mL)	Concentração de padrão recuperado (μg/mL)	Recuperação (%)
10,10	12,30	121,78
25,25	27,10	107,33
40,40	42,90	106,19

Tabela 31- Avaliação da exatidão da metodologia de determinação de cafeína em guaraná, empregando CLAE.

Concentração de padrão adicionado (μg/mL)	Concentração de padrão recuperado (μg/mL)	Recuperação (%)
20,80	22,10	106,25
52,00	52,20	100,38
83,20	84,60	101,68

Os resultados de recuperação dos padrões apresentaram-se na faixa de 95,30% a 106,01% para as metodologias por cromatografia líquida e em média 82% para a metodologia por cromatografia gasosa. Foram considerados satisfatórios por

se tratar de extratos vegetais que possuem vários interferentes, nem totalmente eliminados pelo processo de extração.

Para determinação da precisão, os ensaios abrangeram todo o preparo da amostra, inclusive o processo extrativo. Os resultados estão apresentados nas Tabela 32 e 33.

Tabela 32- Avaliação da repetibilidade das metodologias de determinação por CLAE dos marcadores das drogas vegetais, realizadas com as amostras provenientes do fornecedor C.

Droga vegetal marcador	Concentração média*	DP	DPR
camomila 7-glicosil apigenina	0,52%	0,03	5,70%
ginkgo glicosídeos flavonoídicos	1,12%	0,06	5,77%
guaraná cafeína	4,03%	0,50	12,35%

(*) Média de 6 determinações. DP: Desvio padrão. DPR: Desvio padrão relativo.

Tabela 33- Avaliação da repetibilidade da metodologia de determinação por CG de α-bisabolol em camomila, realizada com amostra proveniente do fornecedor C.

Droga vegetal marcador	Concentração média*	DP	DPR
camomila α-bisabolol	5,66%	0,58	10,27%

(*) Média de 6 determinações. DP: Desvio padrão. DPR: Desvio padrão relativo.

O desvio padrão relativo, calculado com os resultados de seis determinações, foi inferior a 15% (BRASIL, 2000) para todas as análises, entretanto pode-se observar que os menores valores foram para as metodologias farmacopeicas. Com

relação à repetibilidade intra-corrida, o desvio padrão relativo entre as injeções foi sempre menor que 2%.

Com relação ao teor de constituintes químicos de espécies vegetais, sabe-se que pode variar consideravelmente com a época e local de coleta, formas de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento, entre outros. Sendo assim, a definição do limite mínimo aceitável baseia-se em estudos científicos sistemáticos, os quais permitiram a definição dos teores em matérias-primas de qualidade aceitável. A classe de substâncias a ser analisada deve, preferencialmente, estar relacionada com a atividade terapêutica da droga vegetal. Contudo, isto nem sempre é possível, pois em certos casos ainda não existe uma correlação precisa entre os constituintes químicos, as atividades farmacológicas descritas para o vegetal e seu emprego terapêutico (SIMÕES, 2000).

Nas Tabelas 34 a 42 constam os resultados obtidos na determinação dos marcadores nas drogas vegetais não submetidas à irradiação, bem como os resultados obtidos nas análises de variância para comparação entre os fornecedores.

Tabela 34- Teores de 7-glicosil apigenina (% (m/m)) nas amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação. Método: CLAE.

Fornecedor	7-glicosil apigenina (%)*	Desvio Padrão
A	0,57	0,02
B	0,51	0,04
C	0,52	0,03

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.

Figura 5- Representação gráfica dos teores e desvios padrão de 7-glicosil apigenina, nas amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

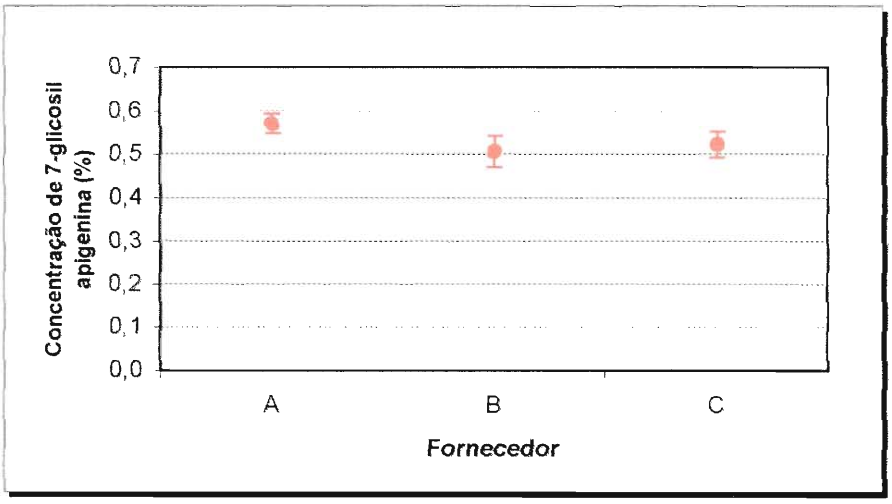


Tabela 35- Análise de variância para a comparação dos fornecedores A, B e C quanto aos teores de 7-glicosil apigenina nas amostras de camomila.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Fornecedor	2	0,0062	0,0031	3,66	0,074	NS
Erro	8	0,0068	0,0008			
Total	10	0,0130				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância NS: não significativo (p>0,05)

Tabela 36- Teores de óleo volátil (em % (v/m)) nas amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação. Método: destilação por arraste a vapor.

Fornecedor	Óleo volátil (%)*
A	0,1
B	0,1
C	0,1

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.

Tabela 37- Teores de α-bisabolol (% (m/m)) no óleo volátil das amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação. Método: CG.

Fornecedor	α-bisabolol (%)*	Desvio Padrão
A	6,18	0,76
B	5,97	0,58
C	5,66	0,58

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.

Figura 6- Representação gráfica dos teores e desvios padrão de α-bisabolol no óleo volátil das amostras de camomila (*M. recutita* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

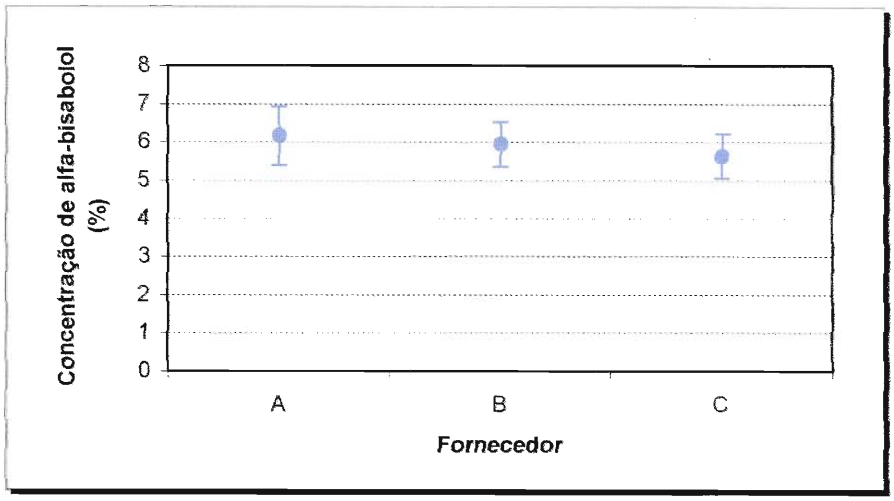


Tabela 38- Análise de variância para comparação dos fornecedores A, B e C quanto aos teores de α-bisabolol nas amostras de camomila.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Fornecedor	2	0,59	0,295	0,76	0,496	NS
Erro	9	3,504	0,389			
Total	11	4,094				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância NS: não significativo (p>0,05)

No caso da camomila, a maioria das farmacopéias preconiza um teor mínimo de 0,4% de óleo volátil. Entretanto, com relação ao conteúdo de flavonóides, apenas a Farmacopéia Americana possui especificações, preconizando o teor mínimo de 0,3% de 7-glicosil apigenina. No presente trabalho, a determinação deste flavonóide nas amostras de camomila não submetidas à irradiação foi realizada para os três fornecedores, sendo que todas apresentaram teores estatisticamente semelhantes (valor de p>0,05) e superiores ao limite mínimo especificado (Tabelas 34 e 35).

Bottcher *et al.* (2001) determinaram o teor de 7-glicosil apigenina em 4 amostras de camomila cultivadas na Alemanha. Os resultados apresentaram maior variação entre os fornecedores: entre 0,29 e 0,64%.

Com relação ao teor de óleo volátil (Tabela 36), os resultados também não diferiram entre os fornecedores, entretanto encontram-se abaixo do teor mínimo especificado nos compêndios farmacopeicos.

Na Itália, Miraldi Giachetti e Ferri (2001) avaliaram a qualidade de 14 amostras comerciais de drogas vegetais aromáticas. Embora tenham encontrado maiores rendimentos de óleo essencial nas amostras de camomila, estes também estavam abaixo de 0,4%, variando entre 0,20 e 0,39%.

Para a melhor interpretação dos resultados obtidos, seriam necessárias informações referentes ao local de cultivo, data de coleta, tempo e condições de armazenamento, fatores estes que influenciam de forma significativa o teor de óleos voláteis em drogas vegetais. No caso da camomila, a coleta deve ser realizada na época de plena floração e, preferencialmente bem cedo pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar importante perda quantitativa do óleo (SIMÕES, 2000).

A proporção entre os constituintes do óleo também é influenciada por fatores externos, além de fatores genéticos. A influência da posição geográfica e condições climáticas na composição do óleo foi avaliada em amostras de camomila cultivada em 4 países diferentes: Turquia, Finlândia, Áustria e Alemanha. As concentrações de farneseno e camazuleno foram mais elevadas nas amostras alemãs (FRANZ *et al.*, 1986). Matos *et al.* (1993) analisaram a constituição do óleo essencial em camomila cultivada na região sul do Brasil e encontraram resultados semelhantes aos obtidos em outras partes do mundo.

A influência da secagem na composição química do óleo essencial da camomila foi investigada por Mishra *et al.* (1999). Foi verificado que o conteúdo de farneseno foi maior nas flores secas à sombra, enquanto que o de bisabolol e azulenos foram maiores nas flores secas ao sol.

Bottcher *et al.* (2001) avaliaram a influência do período pós-coleta (80 horas entre a coleta e a secagem) em 3 temperaturas: 10, 20 e 30°C no óleo essencial da camomila. Observaram decréscimos de até 20% no rendimento de óleo. Entre os seus constituintes, a maior parte deles sofreram pequenos decréscimos (até 20%), enquanto que o α-bisabolol e seus óxidos apresentaram perdas entre 20 a 90%. Comparando os resultados entre as diferentes temperaturas, observaram que a melhor temperatura para manutenção do teor de camazuleno foi 10°C. Em contraste, o α-bisabolol e seus óxidos foram melhor mantidos na temperatura de 20°C.

No presente trabalho, os resultados obtidos na determinação de α-bisabolol no óleo essencial (Tabela 37) e na análise de variância (Tabela 38) revelaram ausência de diferenças significativas (valor de $p>0,05$) entre os distintos fornecedores, indicando uniformidade dos processos produtivos.

De forma contrária, um trabalho realizado em Minas Gerais com o objetivo de avaliar a qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila, revelou que os constituintes ativos do óleo essencial foram detectados em apenas metade das amostras analisadas (BRANDÃO; FREIRE; VIANNA-SOARES, 1998).

Bottcher *et al.* (2001) não encontraram resultados semelhantes entre as 4 amostras de camomila analisadas. Os teores de α-bisabolol encontrados foram 20,3%, 20,9%, 3,34% e 5,42%. Na Estônia, os teores encontrados em diferentes lotes analisados variaram entre 3 e 8% (ORAV *et al.*, 2001).

Tabela 39- Teores de glicosídeos flavonoídicos expressos em % (m/m) de quercetina nas amostras de ginkgo (*G. biloba* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação. Método: CLAE.

Fornecedor	Glicosídeos flavonoídicos (%)*	Desvio Padrão
A	1,08	0,02
B	1,05	0,02
C	1,12	0,06

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.

Figura 7- Representação gráfica dos teores e desvios padrão de glicosídeos flavonoídicos, nas amostras de ginkgo (*G. biloba* L.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

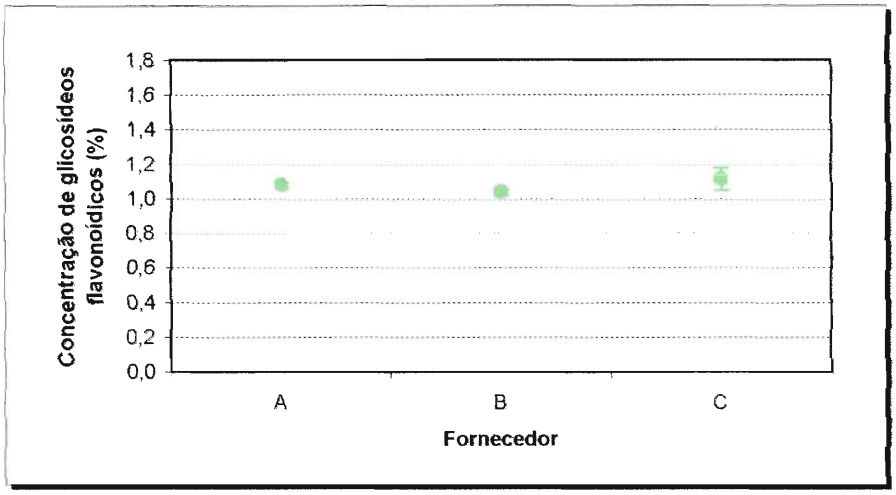


Tabela 40- Análise de variância para a comparação dos fornecedores A, B e C quanto aos teores de glicosídeos flavonoídicos nas amostras de ginkgo.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Fornecedor	2	0,0112	0,0056	2,29	0,157	NS
Erro	9	0,0220	0,0024			
Total	11	0,0332				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância NS: não significativo (p>0,05)

Com relação à determinação de glicosídeos flavonoídicos em ginkgo, o teor mínimo especificado pela 25ª edição da Farmacopéia Americana é de 0,8%

(UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2002). Entretanto, em sua penúltima edição a especificação tornou-se menos rígida e o limite mínimo passou a ser de 0,5% (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2003). Os resultados obtidos para os 3 fornecedores (Tabela 39) foram muito próximos entre si e acima da especificação (média de 1,08%).

As investigações realizadas por Sticher (1993) revelaram concentrações entre 0,5 a 1% de glicosídeos flavonoídicos em amostras comerciais de folhas secas de ginkgo e não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes meses de coleta (junho a novembro).

Tabela 41- Teores de cafeína (% (m/m)) nas amostras de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

Fornecedor	Cafeína (%)*	Desvio Padrão
A	4,18	0,04
B	3,79	0,00
C	4,03	0,50

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.

Figura 8- Representação gráfica dos teores e desvios padrão de cafeína nas amostras de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da irradiação.

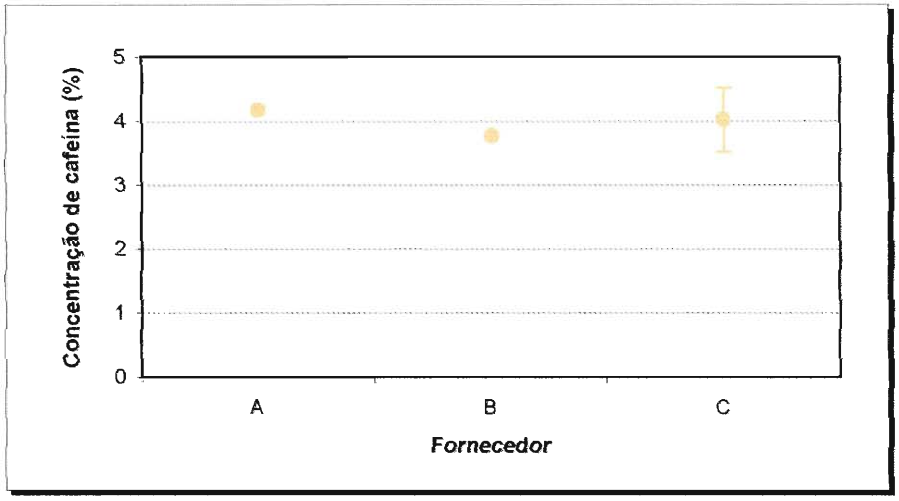


Tabela 42- Análise de variância para comparação dos fornecedores A, B e C quanto aos teores de cafeína nas amostras de guaraná.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Fornecedor	2	0,157	0,079	0,44	0,658	NS
Erro	7	1,239	0,177			
Total	9	1,396				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância NS: não significativo (p>0,05)

Os resultados apresentados na Tabela 41, reforçados pela análise estatística (Tabela 42) revelaram uniformidade entre os fornecedores, com relação ao teor de cafeína, nas amostras de guaraná. Os teores nas amostras analisadas foram superiores a 3,25%, concentração preconizada pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

Resultados semelhantes foram obtidos por Carlson e Thompson (1998) que analisaram 4 amostras comerciais de guaraná com teores de 3,8 a 4,1% de cafeína.

Os resultados obtidos na determinação dos marcadores nas drogas vegetais e os valores de recuperação após irradiação, acompanhados dos resultados das análises estatísticas estão apresentados nas Tabelas que seguem.

Tabela 43- Teores de 7-glicosil apigenina (% m/m) e valores de recuperação na amostra de camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor B, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy). Método: CLAE.

Dose (kGy)	7-glicosil apigenina **(%)***	**DP**	**Recuperação(%)****
0	0,51	0,036	—
5,5	0,48	0,001	94,02
11,4	0,37	0,003	73,69
17,8	0,32	0,011	62,47

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.
DP: Desvio padrão.
(**) Razão entre as concentrações de 7-glicosil apigenina nas amostras de camomila antes e após irradiação, multiplicada por 100.
(—) Não se aplica.

Figura 9- Representação gráfica dos teores e desvios padrão de 7-glicosil apigenina na amostra de camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor B, antes a após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).

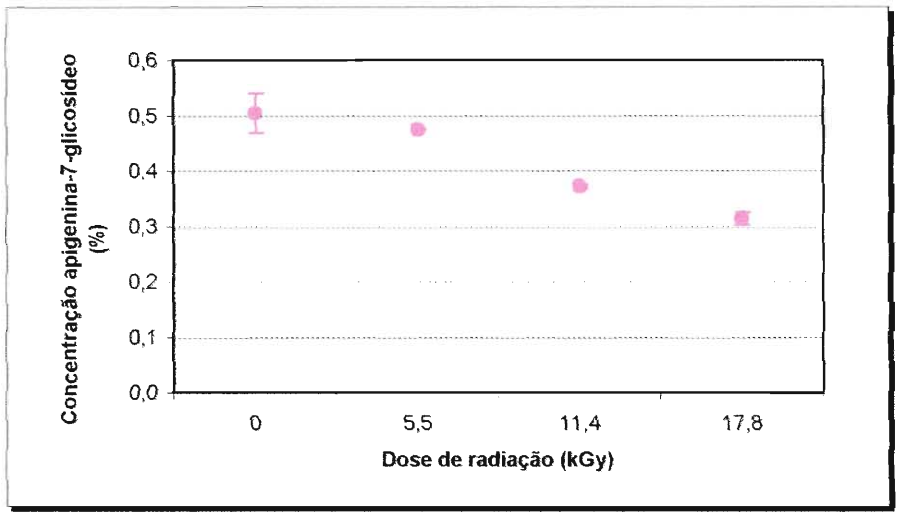


Tabela 44- Análise de variância para comparação das amostras de camomila (*M. recutita* L.) irradiadas e não irradiada quanto aos teores de 7-glicosil apigenina.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Irradiação	3	0,047	0,0156	44,28	0,002	S
Erro	4	0,001	0,0003			
Total	7	0,048				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância S: significativo (p<0,05)

Nas amostras de camomila submetidas à irradiação, observaram-se reduções de 6%, 26% e 38% nos teores de 7-glicosil apigenina, respectivamente para as doses de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy, conforme Tabela 43. Entretanto, mesmo após a dose mais alta aplicada, o teor deste marcador permaneceu acima do especificado pela Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2003).

Os resultados da análise de variância (Tabela 44) revelaram que as diferenças encontradas entre as amostras irradiadas e não irradiada podem ser consideradas estatisticamente significativas. Foi então realizado teste de Tukey com o objetivo de verificar entre quais doses de radiação houve significância, conforme Tabela abaixo:

Tabela 45- Teste de Tukey para avaliação das diferenças de teores de 7-glicosil apigenina nas amostras de camomila (*M. recutita* L.), em função das doses de irradiação.

Comparação	Limite inferior	Centro	Limite Superior	Conclusão
0 e 5 kGy	-0,10695	-0,03029	0,04636	DNS
0 e 10 kGy	-0,20989	-0,13324	-0,05658	DS
0 e 15 kGy	-0,26669	-0,19004	-0,11338	DS
5 e 10 kGy	-0,17960	-0,10294	-0,02628	DS
5 e 15 kGy	-0,23640	-0,15974	-0,08308	DS
10 e 15 kGy	-0,13346	-0,05680	0,01986	DNS

DNS: diferença não significante (o intervalo contém o zero)
DS: diferença significativa (o intervalo não contém o zero).

Entre as amostras não irradiada e irradiada com dose de 5 kGy e, entre as amostras irradiadas com 10 e 15 kGy não houve diferença significativa. Entretanto

pode-se observar diferenças significativas entre doses 0 e 10 kGy, 0 e 15 kGy, 5 e 10 kGy, e entre 5 e 15 kGy. À medida que houve aumento da dose de radiação, ocorreu diminuição da concentração de 7-glicosil apigenina.

Os autores Zareena *et al* (2001) verificaram que a irradiação pode provocar a lise de glicosídeos carotenóides do açafrão, com aumento da fração de agliconas. Desta forma, a redução do teor de 7-glicosil apigenina encontrada no presente trabalho pode indicar quebra da ligação glicosídica, embora não se tenha realizado a avaliação do teor de apigenina livre em relação ao glicósido.

Tabela 46- Teores de óleo volátil (% (v/m)) e valores de recuperação na amostra de camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor B, antes e após irradiação (doses médias de 5,5. 11,4 e 17,8 kGy). Método: destilação por arraste a vapor.

Dose (kGy)	Óleo volátil (%)*	DP	Recuperação (%)**
0	0,1	0	—
5,5	0,1	0	100
11,4	0,1	0	100
17,8	0,1	0	100

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.
DP: Desvio padrão.
(**) Razão entre os rendimentos de óleo essencial nas amostras de camomila antes e após irradiação, multiplicada por 100.
(—) Não se aplica.

Tabela 47- Teores de α-bisabolol (%(m/m)) e valores de recuperação no óleo volátil da amostra de camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor B, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy). Método: CG.

Dose (kGy)	α-bisabolol (%)*	DP	Recuperação (%)**
0	5,97	0,577	—
5,5	6,45	0,250	108,13
11,4	6,18	0,298	103,63
17,8	5,76	0,294	96,46

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.
(DP): Desvio Padrão.
(**) Razão entre as concentrações de α-bisabolol no óleo essencial das amostras de camomila antes e após irradiação, multiplicada por 100.
(—) Não se aplica.

Figura 10- Representação gráfica dos teores e desvios padrão de α-bisabolol na amostra de camomila (*M. recutita* L.) proveniente do fornecedor B, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).

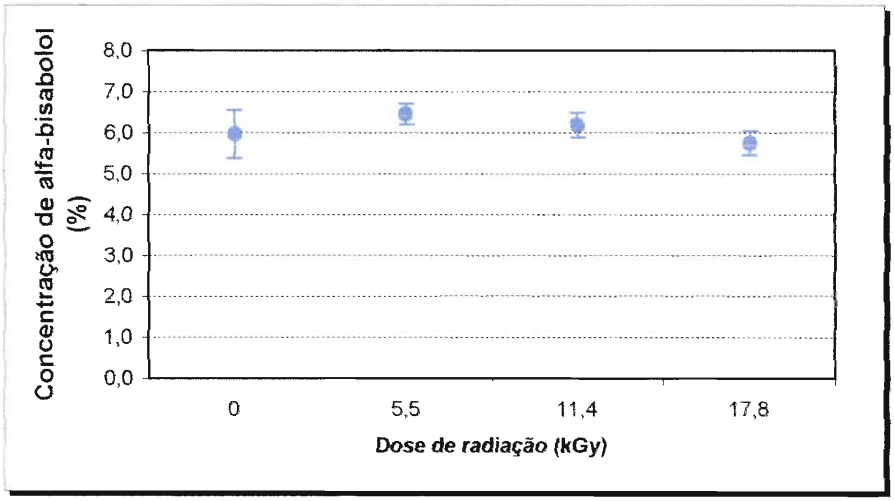


Tabela 48- Análise de variância para comparação das amostras de camomila (*M. recutita* L.) irradiadas e não irradiada quanto aos teores de α-bisabolol.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Irradiação	3	0,800	0,267	1,87	0,213	NS
Erro	8	1,141	0,143			
Total	11	1,942				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância NS: não significativo (p>0,05)

Com relação aos teores de óleo volátil, não houve diferença quantitativa entre as amostras não irradiada e irradiadas. Qualitativamente, não foram observadas alterações estatisticamente significativas no teor de α-bisabolol após irradiação, corroborando com os resultados encontrados por Katusin-Razem *et al.* (1983).

Tabela 49- Teores de glicosídeos flavonoídicos expressos em quercetina (%(m/m)) e valores de recuperação na amostra de ginkgo (*G. biloba* L.) proveniente do fornecedor C, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy). Método: CLAE.

Dose (kGy)	Glicosídeos flavonoídicos (%)*	DP	Recuperação (%)**
0	1,12	0,065	—
5,5	1,07	0,069	108,13
11,4	1,02	0,052	91,27
17,8	1,02	0,033	90,70

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.
(DP): Desvio padrão.
(**) Razão entre as concentrações de glicosídeos flavonoídicos nas amostras de ginkgo antes e após irradiação, multiplicada por 100.
(—) Não se aplica.

Figura 11: Representação gráfica dos teores e desvios padrão de glicosídeos flavonoídicos na amostra de ginkgo (*G. biloba* L.) proveniente do fornecedor C, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).

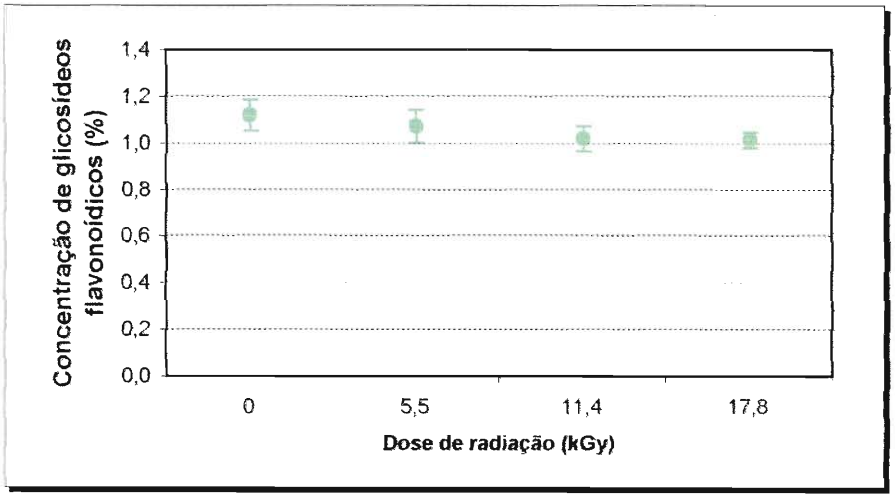


Tabela 50- Análise de variância para comparação das amostras de ginkgo (*G. biloba* L.) irradiadas e não irradiada quanto aos teores de glicosídeos flavonoídicos.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Irradiação	3	0,030	0,0102	2,96	0,079	NS
Erro	11	1,038	0,0034			
Total	14	1,069				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância NS: não significativo (p>0,05)

Embora o ginkgo apresente atividade anti-radicais livres, atribuída principalmente aos glicosídeos flavonoídicos, não houve redução estatisticamente significativa destes compostos nas amostras irradiadas (Tabelas 49 e 50). De forma semelhante, Katusin-Razem *et al.* (1985) não encontraram alteração significativa no teor de flavonóides totais expressos como rutina em amostra de tília irradiada com dose de 10 kGy.

Tabela 51- Teores de cafeína (% (m/m)) e valores de recuperação na amostra de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) proveniente do fornecedor C, antes e após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy). Método: CLAE.

Dose (kGy)	Cafeína (%)*	DP	Recuperação (%)**
0	4,03	0,497	—
5,5	4,17	0,033	103,45
11,4	4,12	0,138	102,41
17,8	4,23	0,046	105,17

(*) Média dos resultados obtidos a partir de três determinações.
DP: Desvio padrão.
(**) Razão entre as concentrações de cafeína antes e após irradiação, multiplicada por 100.
(—) Não se aplica.

Figura 12- Representação gráfica dos teores e desvios padrão de cafeína na amostra de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) proveniente do fornecedor C, antes a após irradiação (doses médias de 5,5, 11,4 e 17,8 kGy).

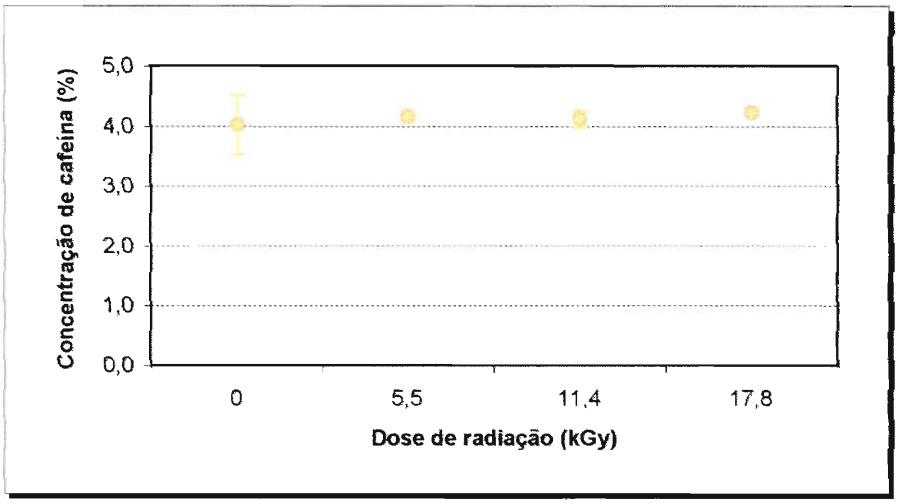


Tabela 52- Análise de variância para comparação das amostras de guaraná (*P. cupana* H.B.K.) irradiadas e não irradiada quanto aos teores de cafeína.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	p	Conclusão
Irradiação	2	0,157	0,079	0,44	0,658	NS
Erro	7	1,239	0,177			
Total	9	1,396				

F: parâmetro estatístico p: nível de significância NS: não significante (p>0,05)

Com relação ao guaraná, as variações encontradas entre as amostras irradiadas e não irradiadas, quanto aos teores de cafeína (Tabelas 51 e Figura 12), não foram estatisticamente significativas (Tabela 52) e, portanto, foram consideradas como erro analítico.

6 CONCLUSÃO

6.1 Não há um consenso entre os fornecedores de drogas vegetais, com relação ao material de acondicionamento utilizado.

6.2 Quanto ao conteúdo de água, com exceção da camomila do fornecedor C, todas as drogas vegetais apresentaram-se dentro dos limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira 3ª edição.

6.3 As drogas vegetais alcachofra, camomila, ginkgo e guaraná apresentaram elevada carga microbiana: média de $4,1 \times 10^6$ para microrganismos aeróbicos totais e $3,3 \times 10^5$ para fungos, sendo que dentre as drogas, o guaraná apresentou-se com maiores níveis de contaminação, bem como maior frequência de microrganismos potencialmente patogênicos.

6.4 A dose média de 11,4 kGy reduziu a carga de microrganismos aeróbicos totais a níveis menores ou iguais a 10^2 em todas as drogas, com exceção da camomila do fornecedor B. A menor dose aplicada (5,5 kGy) foi suficiente para reduzir a contagem de fungos para níveis da ordem de 10 UFC/g, bem como para eliminar os microrganismos patogênicos encontrados anteriormente à irradiação.

6.5 Anteriormente à irradiação, as amostras de camomila, ginkgo e guaraná provenientes dos 3 fornecedores apresentaram respectivamente teores de 7-glicosil apigenina, glicosídeos flavonoídicos e cafeína acima dos limites preconizados pelos compêndios oficiais.

6.6 Após submissão ao processo de descontaminação, não houve alterações estatisticamente significativas nos teores de α-bisabolol, glicosídeos flavonoídicos e cafeína respectivamente em camomila, ginkgo e guaraná. Houve redução no teor de 7-glicosil apigenina na camomila, proporcionalmente às doses de radiação aplicadas, entretanto, as concentrações permaneceram acima do limite especificado pela Farmacopéia Americana mesmo após a maior dose.

6.7 Com relação à alcachofra, não foi possível avaliar os efeitos da radiação sobre seus constituintes químicos.

6.8 O processo de descontaminação empregando radiação ionizante pode ser considerado eficaz para as drogas vegetais avaliadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADZET, T.; PUIGMACIA, M. High-performance liquid chromatography of caffeolquinic acid derivatives *Cynara scolymus* L. leaves. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.348, p.447-453, 1985.

ANDRE, D. *et al.* Determination of α-bisabolol and d-panthenol in cosmetic products by gas chromatography. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.13, p.137-142, 1991.

ARAÚJO, A.L.A. **Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feira do município de São Paulo e de infusos derivados**. São Paulo, 1998. 82p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ATZORI *et al.* Activity of bilobalide, a sesquiterpene from Ginkgo biloba on *Pneumocystis carinii. Antimicrobial Agents Chemother.*,v.37, n.7, p.1492-1496, 1993. *Apud* CHAVEZ, M.L.; CHAVEZ, P.I. Ginkgo (Part 1): history, use, and pharmacologic properties. **Hosp. Pharm.**, St. Louis, v.33, n.6, p.658-660, 663-668, 671-672, 1998.

AZIZ, N.H. *et al.* Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal florae contaminating medicinal plants. **Appl. Radiat. Isot.**, Oxford, v.48, n.1, p.71-76, 1997.

BACHMAN, S.; GIESZCZYNSKA, J. Studies on some microbiological and chemical aspects of irradiated spices. In: *Aspects of the Introduction of Food Irradiation in* Developing Countries, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1973. *Apud* FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients.** Florida: CRC Press, 1988. p.1-76.

BANOV, D.; PAOLA, M.R.V.; RIBEIRO, M.E. *Ginkgo biloba* na fitocosmética. **Cosmet. Toiletries: Ed. Port.**, São Paulo, v.11, jul/ago, p.44-48, 1999.

BICCHI, C.; BRUNELLI, C.; GALLI, M.; SIRONI, A. Conventional inner diameter short capillary columns: an approach to speeding up gas chromatographic análisis of medium complexity samples. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.931, p.129-140, 2001.

BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4.ed. Philadelfia: Lea & Febiger, 1991. p.566-579.

BOTTCHER, H.; GUNTHER, I.; FRANKE, R.; WARNSTORFF, K. Physiological postharvest responses of Matricaria (*Matricaria recutita* L.) flowers. **Postharvest Biol. Technol.**, Clare, v.22, p.39-51, 2001.

BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C.D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: verificação da qualidade de diferentes amostras de camómila. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.14, n.3, p.613-616, 1998.

*As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.123 de 19 de outubro de 1994. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.200, 20 de out. 1994. Seção 1, p.15903-15904.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Portaria n. 6 de 31 de janeiro de 1995. **Lex Coletânea de Legislação e Jurisprudência,** São Paulo: LEX editora S/A, v.59, p. 423-427, jan./fev./mar. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução n.17 de 24 de fevereiro de 2000. **Lex Coletânea de Legislação e Jurisprudência,** São Paulo: LEX Editora, v.64, p. 1050-1058, fev.2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução n.21 de 26 de janeiro de 2001. **Lex Coletânea de Legislação e Jurisprudência,** São Paulo: LEX Editora, v.65, p. 870-874, jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução n.84 de 19 de março de 2002. **Lex Coletânea de Legislação e Jurisprudência,** São Paulo: LEX Editora, v.66, p. 1005-1014, mar. 2001.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2000. p. A278.

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

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.33, n.2, p.179-189, 2000.

CARLSON M.; THOMPSON, R.D. Liquid chromatographic determination of methylxantines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.81, n.4, p.691-701, 1998.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v.2, p.1057-1075, p.748-749.

DELLA LOGIA, R., *et al.* **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.213, p.481, 1986. *Apud* FONSECA, F.N. **Técnicas modernas de separação e análise de extratos vegetais.** São Paulo, 2002. 297p. Tese de Doutorado – Instituto de Química - Universidade de São Paulo.

DEL MASTRO, N.L. Development of food irradiation in Brazil. **Prog. Nucl. Energy**, Amsterdam, v.35, n.3/4, p.229-248, 1999.

DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods**. New York: Marcel Decker, 1990.p.29-89.

DIEHL, J.F. Food irradiation: past, present and future. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.63, p.211-215, 2002.

FANG X.; WU, J. Feasibility of sterilizing traditional medicines by gamma-irradiation. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.52, n.1-6, p.53-58, 1998.

FARKAS, J.; ANDRÁSSY, É. Comparative Investigation of some effects of gamma radiation and ethylene oxide on aerobic bacterial spores in black pepper. In: 12th Int. Symp.: Microbial Associations and Interactions in Food, Budapest, 1984. *Apud* FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.1-76.

FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients. Boca Raton**: CRC Press, 1988. p.1-76.

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.44, p.189-204, 1998.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p.800, 829.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. p. v.4.2.3, v. 4.2.6, v.2.9, v.5.1.6, v.5.1.7.

FINZELBERG. **Testing procedure G20, quantitative determination of the ginkgo-flavonglycosides in *Folia Ginkgo bilobae* and in *Ginkgo biloba* preparations**. Andernac, 2000.

FINZELBERG. **Testing procedure C05, quantitative HPLC determination on caffeoylquinic acids (calculated as clorogenic acid) in extracts from artichoke leaves.** Andernac, 2000.

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

FISCHER, D.C.H.; OHARA, M.T.; SAITO, T. Padrão microbiano em medicamentos não estéreis de uso oral: enquadramento de produtos fitoterápicos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v.1, jan/jun, p.29-54, 1996.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.134-139.

FRANZ, C. *et al.* Influence of ecological factors on yield and esencial oil of camomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert syn. *Matricaria chamomilla).* **Acta Hortic.**, Leuven, v.188, p.157-162, 1986.

GARCIA, E.S. *et al.* Fitoterápicos, INCQS. Disponível em: http://www.bdt.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10. Acesso em: 21 mar. 2001.

GRÜNEWALD, Th. Untersuchungen zur Bestrahlung von Trockenprodukten, BFE-R-84-02, Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernáhrung, Karlsruhe, 1984. *Apud* FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.1-76.

HANSEN, J.M.; SHAFFER, H.L. Sterilization and preservation by radiation sterilization. In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 5.ed. Philadelphia: Liooincott Williams & Wilkins, 2001. p.729-746.

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

HITOKOTO, H. *et al.* Fungal contamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.36, n.2, p.252-256, 1978.

HUANG, K.C. **The pharmacology of Chinese herbs**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1999. p.97-99.

HUANG, X.; XIE, W.; GONG, Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters**, v.478, p.123-126, 2000.

ITO, H. *et al.* Distribution of microorganisms in spices and their decontamination by gamma-irradiation. In: IAEA/FAO Int. Symp. On Food Irradiat. Proc., Washington, 1985. *Apud* FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.1-76.

JURI, M.L *et al.* Distribution of microorganisms in spices and their decontamination by gamma-irradiation. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.50, n.2, p.347-355, 1986.

KATUSIN-RAZEM, B. *et al.* Radiation treatment of herb tea for the reduction of microbial contamination (Flores chamomillae). **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.22, n.3/5, p.707-713, 1983.

KATUSIN-RAZEM, B. *et al.* Radiation decontamination of tea herbs. **J. Food Sci.**, Chicago, v.53, n.4, p.1120-1126, 1988.

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

KEDZIA, B.; HOLDERNA, E. Wystepowanie bakterü tlenowych in grzybów surowcach zielarskich. *Herb. Polon.,* Póznan, v.30, n.1, p.59-70, 1984. *Apud* FISCHER, D.C.H. **Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida**. São Paulo, 1992. 161p. Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

KIM, M.; YOOK, H.; BYUN, M. Effects of gamma irradiation on microbial contamination and extraction yields of Korean medicinal herbs. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.57, p.55-58, 2000.

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

KWON, J. *et al.* Comparative effect of gamma irradiation and phosphine fumigation on the quality of white ginseng. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.57, p.309-313, 2000.

LEA, D.E. **Actions of radiations on living cells**. London: Cambridge University Press, 1946. 402p.

LENOBLE, M. *et al.* Contrôle de la qualité microbiologique d'échantillons de *Mentha piperita* de diverses origins géographiques. **Ann. Pharm. Fr.**, Paris, v.38, n.4, p.333-342, 1980.

LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. **Encyclopedia of common natural ingredients**. 2.ed. New York: John Whiley, 1996. p.145-147.

LUTOMSKY, J.; KEDZIA, B.P. Mycoflora of crude drugs. **Planta Med.**, Sttutgart, v.40, n.2, p.212-217, 1980.

MARTINS, H.M. *et al.* Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.68, p.149-153, 2001.

MASOTTI, P.; ZONTA, F. Food irradiation: an update of legal and analytical aspects. **Ital. J. Food Sci.**, Pinerolo, v.11, n.4, p.305-316, 1999.

MATOS, F.J.A. *et al.* Constituents of Brazilian chamomile oil. **J. Essent. Oil Res.**, v.5, p.337-339, 1993.

MATTEI, R. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*): Toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. **J. Ethnopharmacol.**, Clare, v.60, p.111-116, 1998.

MIGDAL, W.; OWCZARCZYK, B. The effect of ionizing radiation on microbiological decontamination of medical herbs and biologically active compounds. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.52, n1/6, p.91-94, 1998.

MIRALDI, E.; GIACHETTI, D.; FERRI, S. Quality control of aromatic drugs reported in European Pharmacopoeia 3rd edition. **Farmaco**, v.56, p.365-371, 2001.

MISHRA, D.K. *et al.* Effect of drying *Matricaria chamomilla* flowers on chemical composition of essential oil. **J. Medicinal Aromatic Plant Sci.**, v.21, n.4, p.1020-1025, 1999.

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

NEGRETTI, F. Ricerche sulla contaminazione microbica dei prodotti fitoterapici. **Boll. Chim. Farm.**, v.122, p.441-451, 1983.

NEUMAYR, L. *et al.* Gewürzentkeimung, verfahren und Notwendigkeit, Abschlussbericht für die Adalbert-Raps-Stuffung zum Forschungsvorhaben, 1983. *Apud* FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.1-76.

OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CECIL, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1982. p.2-25.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.6-22.

ONYENEKWE, P.C.; OGBADU, G.H.; HASHIMOTO, S. The effect of gamma-radiation on the microflora and essential oil of Ashanti pepper (*Piper guineense)* berries. **Postharvest Biol. Technol.**, Clare, v.10, p.161-167, 1997.

ORAV, A.; KAILAS, T.; IVASK, K. Volatile constituents of *Matricaria recutita* L. from Estonia. **Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.**, v.50, n.1, p.39-45, 2001.

OWCZARCZYK, H.B.; MIGDAL, W.; KADZIA, B. The pharmacological activity of medical herbs after microbiological decontamination by irradiation. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.57, p.331-335, 2000.

PADULA, L.Z.; RONDINA, R.V.D.; COUSSIO, J.D. Quantitative determination of essential oil, total azulenes and chamazulene in german chamomile (*Matricaria chamomilla)* cultivated in Argentina. **Planta Med.**, Stuttgart, v.30, p.273-280, 1976.

PENNINCKX, W. Detection of the bias in analytical methods. **Analusis**, Paris, v.22, n.5, p.M22-M23, 1994.

PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; RAVA, A. Analysis of terpenes from *Ginkgo biloba* L extracts by reversed phase high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.29, n.5/6, p.251-253, 1990.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 309p.

PINTO, T.J.A.; SATOMI, L.C. Evaluation of medicinal plants sanitary quality. In: AOAC INTERNATIONAL ANNUAL MEETING & EXPOSITION, 116, Los Angeles, 2002. **Meeting Book**. California: Association of Analytical Communities, 2002. p.111.

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

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v.39, p.603-613, 2001.

ROY, A.K.; CHOURASIA, H.K. Aflatoxin problems in some medicinal plants under storage. **Int. J. Crude Drug Res.**, v.27, n.3, p.156-160, 1989.

RUSSEL, A.D.; HUGO, B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles & practice of desinfection**: preservation & sterilization. Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 1982. p.513-533.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chem.**, Oxford, v.59, n.1, p.57-67, 1997.

SALVADORI, M.C. *et al.* Determination of xantines by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography in horse urine after ingestion of guaraná powder. **Analyst**, London, v.119, p.2701-2703, 1994.

SANTOS, P.R.V.; OLIVEIRA, A.C.X.; TOMASSINI, T.C.B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.31, n.1, p.35-38, 1995.

SCOLARI, G.; ZACCONI, C.; VESCOVO, M. Microbial contamination of tea and aromatic herb-tea products. **Ital. J. Food Sci.**, Pinerolo, n.4, v.13, p.429-432, 2001.

SELIM, M.I. *et al.* Aflatoxin B_1 in common egyptian foods. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.79, n.5, p.1124-1128, 1996.

SIGNORETTI, E.C. *et al.* Ionizing radiation induced effects on medicinal vegetable products. Cascara bark. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.53, p.525-531, 1998.

SIMÕES, C.M.O., org. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: FRGS, 2000. 821p.

STICHER, O. Quality of *Ginkgo* preparations. **Planta Med.**, Stuttgart, v.59, p.2-11, 1993.

TEMCHAROEN, P.; THILLY, W.G. Removal of aflatoxin B1 toxicity but not mutagenicity by 1 megarad gamma radiation of peanut meal. *J. Food Safety,* v.4, p.199-205, 1982. *Apud* RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chem.**, v.59, n.1, p.57-67, 1997.

THEIVENDIRARAJAH, K.; JAJEWARDENE, A.L. The effect of gamma irradiation (^{60}Co) on spices and red onion. In: FAO/IAEA Res. Coordination Meet. On the Asian Regional Cooperative Project in Food Irradiation, Bangkok, 1982. *Apud* FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.1-76.

TJABERG, T.B.; UNDERDAL, B.; LUNDE, G. The effect of ionizing radiation on the microbiological content and volatile constituents of spices. **J. Appl. Bacteriol.**, v.35, p.473-478, 1972.

TOOFANIAN, F.; STEGEMAN, H. Comparative effect of ethylene oxide and gamma irradiation on the chemical, sensory and microbial quality of ginger, cinnamon, fennel and fenugreek. **Acta Aliment.**, Budapest, v.17, n.4, p.271-281, 1988.

UNITED States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.2435, 1814, 2458.

UNITED States Pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p. 1954

UNITED States Pharmacopeia. 26.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p. 2717, 2756.

URBAIN, W.M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986. p.22-37, 222-268.

VAN BEEK, T.A. *et al.* Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.543, p.375-387, 1991.

VAN BEEK, T.A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **J. Chromatogr. A**, v.967, p.21-55, 2002.

VAN DYCK, P.J. *et al.* Sensitivity of aflatoxin B1 to ionizing radiation. *Appl. Environ. Microbiol.,* v.43, p.1317-1319, 1982. *Apud* RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v.59, n.1, p.57-67, 1997.

XIE, L.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M.G. Antimicrobial activity of *Ginkgo biloba* leaf extract on *Listeria monocytogenes*. **J. Food Sci.**, v.68, n.1, p.268-270, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO, 1999. v.1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 1998.

ZAREENA, A.V. *et al.* Chemical investigation of gamma-irradiated saffron (*Crocus sativus* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.687-691, 2001.