

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

Avaliação da contaminação microbiológica de drogas vegetais
e potencial descontaminação por plasma

Siliane Bertoni Kalkaslied de Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^ª Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2007

Siliane Bertoni Kalkaslied de Souza

Avaliação da contaminação microbiológica de drogas vegetais e potencial
descontaminação por plasma

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador/presidente

Prof. Dr. Dominique Corinne Hermine Fischer
1^o. examinador

Prof^a Dr^a Adriana Bugno
2^o. examinador

São Paulo, 24 ~~setembro~~^{agosto} de 2007.

**Ao meu esposo Álvaro José, por todo amor, dedicação e apoio.
Aos meus filhos Rachel e Álvaro José, pelo carinho e entendimento precoce,
pois souberam entender a sua mãe.**

À professora Terezinha por sua confiança, dedicação, extrema competência, sempre acompanhando meus progressos com acolhimento, sabedoria e firmeza.

AGRADECIMENTOS

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

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento da bolsa.

À professora Edna Tomiko Myake Kato pelo apoio e contribuições.

À professora Telma M. Kaneko, pela percepção, ensinamentos e sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, Irene Satiko Kikuchi, Miriam Matuo, José de Sousa Sobrinho, Débora Cristina Oliveira, Juliano Moraes, Michelle R. Boscarol.

Ao Adir José Moreira do Laboratório de Sistemas Integráveis por seu comprometimento.

À professora Marina Baquerizo Martinez do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela identificação das espécies bacterianas.

À Adriana Bugno Chefe de Seção de Esterilidade e Potência Microbiológica, pelos auxílios diversos, inclusive pela intermediação junto a Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz e esta, no sentido da identificação dos fungos.

Aos amigos do CONFAR pelo apoio e ensinamentos.

À bibliotecária Leila Aparecida Bonadio pelo apoio e revisão das referências bibliográficas.

RESUMO

A qualidade, eficácia e segurança no emprego de drogas vegetais dependem, entre outras questões, de sua qualidade sanitária. Sua origem e manuseio, em condições no geral inadequadas, propiciam biocarga elevada e abrangente, o que implica riscos para saúde. O presente trabalho objetivou conhecimento da microbiota das plantas estudadas e o desenvolvimento de estudos de sua descontaminação por plasma, tendo-se analisado os parâmetros físicos que influenciaram este processo. O projeto possibilitou a descontaminação de drogas vegetais com alta carga microbiana. Estudou-se a alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), adotando parâmetros de processo que alegadamente permitem a integridade dos princípios ativos termossensíveis. Para isso, foi empregado reator disponível no Laboratório de Sistemas Integráveis, pertencente à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, em sistema com acoplamento capacitivo modo RIE (*Reactive Ion Etching*). Neste sistema, trabalhou-se com oxigênio adicionado de peróxido de hidrogênio. Todos os processos de descontaminação foram desenvolvidos a temperatura ambiente, sob diferentes parâmetros físicos complementares. A eficácia do processo foi investigada, empregando-se contagem de microrganismos heterotróficos, assim como pesquisa de indicadores de patogênicos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*). As avaliações microbiológicas, quantitativas e qualitativas, assim como os estudos decorrentes dos dados obtidos, foram desenvolvidos no Laboratório de Controle Biológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Os resultados obtidos após a descontaminação por plasma de oxigênio (100%), a potência de 150 W, evidenciaram redução de até 4 ciclos de aeróbicos totais. No processo por plasma peróxido de hidrogênio (20%) e oxigênio (80%), a uma potência de 150 W, observou-se a redução de até 4 ciclos log de aeróbios totais para as drogas vegetais deste estudo. A presença de substâncias químicas complexas da camomila, que contêm óleo volátil, flavonóides, aminoácidos, ácidos graxos, sais minerais, cumarinas, mucilagens e ácidos orgânicos, interferem no processo por plasma provavelmente em decorrência de a mucilagem formar um filme protetor, impedindo a difusão gasosa em ambos os processos por plasma. Assim, não só a camomila mas também o guaraná, com biocargas iniciais

respectivamente de $6,6 \times 10^6$ UFC/g e $2,7 \times 10^6$ UFC/g, mantiveram-se com níveis de contaminação da mesma ordem de grandeza, após os desafios com plasma. A contagem bacteriana da alcachofra (fornecedor B), que foi submetida ao processo de descontaminação através do plasma O_2 (100%), (potência de 150 W, pressão de 100 mTorr e vazão de 200 sccm), sofreu redução de dez vezes, independentemente do tempo do processo. Possivelmente este resultado, que aparenta inconsistência, decorre da ação apenas superficial do plasma. A descontaminação por processo de plasma de oxigênio e de peróxido de hidrogênio para a alcachofra (fornecedor B) não foi eficaz, devido à predominância de elementos lignificados. As amostras de alcachofra (fornecedor C), com baixa percentagem de vasos de xilema lignificados e fibras lignificadas evidenciaram a maior eficácia do processo por plasma, pois possibilitou grande difusão gasosa sobre as amostras. O estudo permitiu ainda concluir que a aplicabilidade do plasma na descontaminação de drogas vegetais depende da resistência dos microrganismos, mas igualmente das características da planta, sejam aquelas de natureza morfoanatômica, enzimática ou química. Estudos específicos devem ser desenvolvidos para cada situação.

ABSTRACT

The quality, effectiveness and safety of vegetal drugs usage depend, among others issues, on their sanitary quality. Their origin and handling, usually under inadequate conditions, propitiate high bioburden, what presents risks to health. This project aimed at the evaluation of the microbiota of the plants studied and the development of studies concerning their decontamination by plasma, after the analysis of the physical parameters that influence this process. This project made the vegetal drugs decontamination with high microbiana load possible. Artichoke (*Cynara scolymus* L.), chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) and guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) were studied through parameters that allowed the integrity of thermal sensible active principles. The achievement of our purpose depended on the use of a reactor with RIE (*Reactive Ion Etching*) capacitive coupled systems, available in the Laboratory of Integrating Systems from Escola Politécnica, University of São Paulo. In this system we worked with oxygen, with hydrogen peroxide addition. All decontamination processes were developed at room temperature, under different complementary physical parameters. The process effectiveness was investigated using counting of heterotropic microorganisms, as well as pathogenic register research (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*). The microbiological, quantitative and qualitative evaluations, as well as the studies of the data obtained were developed in the Laboratory of Biological Control of Pharmaceutical Sciences Faculty - USP. The results obtained after decontamination by plasma, oxygen (100%) at 150 W potency, evidenced reduction of up to 4 cycles of total aerobics. In the process by plasma hydrogen peroxide (20%) and oxygen (80%) at 150 W potency, a reduction of up to 4 cycles of total aerobics was observed in vegetal drugs. The presence of chamomile chemical complex substances, which contain volatile oil, flavonoids, aminoacids, fatty acids, mineral salts, coumarins, mucilages and organic acids, interfere in the process by plasma, probably due to the fact that the mucilage forms a protective film, preventing the gaseous diffusion in both processes by plasma. Thus not only chamomile but also guaraná, with initial bioburden of respectively $6,6 \times 10^6$ UFC/g and $2,7 \times 10^6$ UFC/g, kept similar contamination levels after the challenges with plasma. The bacterial count of artichoke (supplier B), which was submitted to decontamination process by plasma O₂ (100%), (150 W potency, 100mTorr pressure

and 200sccm) was reduced ten times, independently of the time of process. This apparently inconsistent result is possibly a consequence of a superficial plasma action. The decontamination by Oxygen and Hydrogen Peroxide plasma process for artichoke (supplier B) was not efficient due to the predominance of lignitic elements. The samples of artichoke from supplier C, which low percentage of lignitic xylem vessels and fibres evidenced higher efficacy of the process by plasma, what eased great gaseous diffusion over the samples of artichoke leaves (supplier C). Thus the study of plasma applicability in vegetal drug decontamination depends not only of microorganisms resistance but also of the plant characteristics, either the morphoanatomic, enzymatic, or chemical ones. A specific study must then be developed for each situation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do material e acondicionamento das drogas vegetais conforme recebidas dos três fornecedores: alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth).	45
Tabela 2	Materias estranhas detectadas nas drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C: alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth).	46
Tabela 3	Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, referente à alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) proveniente do fornecedor B, esterilizada por calor úmido a 121°C.	49
Tabela 4	Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, referente à alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) proveniente do fornecedor C, esterilizada por calor úmido a 121°C.	49
Tabela 5	Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, referente ao ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) proveniente do fornecedor A, esterilizada por calor úmido a 121°C.	49
Tabela 6	Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, referente ao ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) proveniente do fornecedor C, esterilizada por calor úmido a 121°C.	50
Tabela 7	Valores médios obtidos na contagem de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade, nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth) antes da submissão ao processo plasma.	51
Tabela 8	Valores médios obtidos na contagem de fungos (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade, nas drogas vegetais obtidas dos três fornecedores alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth) antes da submissão ao processo plasma.	52

Tabela 9	Valores médios obtidos na contagem de enterobactérias (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade, nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth) antes da submissão ao processo plasma (nas condições de venda).	53
Tabela 10	Comparação da carga microbiana viável média das quatro drogas vegetais analisadas: alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth).	55
Tabela 11	Resultado das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) provenientes dos fornecedores B e C antes da submissão ao processo plasma.	57
Tabela 12	Resultados das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de camomila (<i>Chamomilla recutita</i> L.) provenientes dos três fornecedores antes da submissão ao processo plasma.	58
Tabela 13	Resultados das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) provenientes dos fornecedores A e C antes da submissão ao processo plasma.	59
Tabela 14	Resultado das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth) provenientes dos três fornecedores antes da submissão ao processo plasma.	60
Tabela 15	Identificação dos microrganismos isolados alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth) dos três fornecedores.	61
Tabela 16	Identificação de isolados fúngicos detectados nas drogas vegetais alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.), camomila (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert), ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth) previamente ao processo plasma.	65

Tabela 17	Valores médios obtidos na contagem de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma O ₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm), para amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C).	67
Tabela 18	Valores médios obtidos na contagem de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma O ₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm), para amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C).	68
Tabela 19	Valores médios obtidos na contagem de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%), (potência de 150 W, pressão 100mTorr e vazão 200 sccm) para amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C).	70
Tabela 20	Valores médios obtidos na contagem de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%), (potência de 150 W, pressão 100mTorr e vazão 20,0 sccm), para amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C).	71
Tabela 21	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 45g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor B) antes e após processo plasma O ₂ .	75
Tabela 22	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma O ₂ .	78
Tabela 23	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 45g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma O ₂ .	80
Tabela 24	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma O ₂ .	82
Tabela 25	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor A) antes e após processo plasma O ₂ .	84

Tabela 26	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma O ₂ .	87
Tabela 27	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor B) antes e após processo plasma H ₂ O ₂ .	89
Tabela 28	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma H ₂ O ₂ .	91
Tabela 29	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor A) antes e após processo plasma H ₂ O ₂ .	94
Tabela 30	Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma H ₂ O ₂ .	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sistema de plasma modo RIE	35
Figura 2	Curva de letalidade de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma O ₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm) em amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C).	67
Figura 3	Curva de letalidade de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma O ₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm) em amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C).	68
Figura 4	Curva de letalidade de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%) , (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm) em amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C).	70
Figura 5	Curva de letalidade de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm) em amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C).	72
Figura 6	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O ₂ (100%) em amostras de 45g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor B).	76
Figura 7	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O ₂ (100%) em amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor B).	78
Figura 8	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O ₂ (100%) em amostras de 45g de alcachofra (<i>Cynara. scolymus</i> L.) (fornecedor C).	80
Figura 9	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O ₂ (100%) em amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C).	82
Figura 10	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O ₂ (100%) em amostras de 10g de ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor A).	84

Figura 11	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O ₂ (100%) em amostras de 10g de ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C).	87
Figura 12	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%) em amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor B).	89
Figura 13	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%) em amostras de 10g de alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.) (fornecedor C).	91
Figura 14	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%) em amostras de 10g de ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor A).	94
Figura 15	Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H ₂ O ₂ (20%) e O ₂ (80%) em amostras de 10g de ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i> L.) (fornecedor C).	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
2.1 Contaminação Microbiana em Drogas Vegetais	19
2.2 Padrões Microbianos em Drogas Vegetais	21
2.3 Métodos de Descontaminação de Drogas Vegetais	23
2.3.1 Óxido de Etileno	23
2.3.2 Radiação Gama	24
2.3.3 Plasma	24
2.4 Conceitos Gerais acerca do Processo Plasma	26
2.5 Mecanismo de ação descontaminante do Plasma	27
2.6 Drogas vegetais estudadas	29
2.6.1 Alcachofra	30
2.6.2 Camomila	30
2.6.3 Ginco	31
2.6.4 Guaraná	32
3. OBJETIVO	33
4. MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Material Vegetal	34
4.2 Métodos	34
4.2.1 Descrição das amostras	34
4.2.2 Pesquisa de matérias estranhas	34
4.2.3 Preparação das amostras	35
4.2.4 Métodos de coloração para estudos histológicos de drogas vegetais	35
4.2.5 Avaliação da Qualidade Microbiológica	35
4.2.5.1 Validação do método de contagem microbiana por semeadura em profundidade	35
4.2.5.2 Contagem de bactérias aeróbias e fungos	35
4.2.5.3 Contagem de enterobactérias	36
4.2.5.4 Pesquisa de microrganismos patogênicos específicos	36
4.2.5.4.1 Enriquecimento não seletivo	37

4.2.5.4.2 Pesquisa de <i>S. aureus</i>	37
4.2.5.4.3 Pesquisa de <i>P. aeruginosa</i>	37
4.2.5.4.4 Pesquisa de <i>E. coli</i>	38
4.2.5.4.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	38
4.2.5.4.6 Identificação de fungos contaminantes	39
4.2.5.4.7 Identificação de microrganismos por Sistema Vitek®	39
4.2.5.5 Análise do processo por plasma sobre a contaminação natural	39
4.2.6 Descontaminação por plasma	40
4.2.6.1 Testes preliminares para definição da potência	41
4.2.6.2 Testes de desafios	41
4.2.6.2.1 Fase I	41
4.2.6.2.2 Fase II	42
4.2.7 Validação da eficácia descontaminante do plasma	42
4.2.8 Análise da eficácia descontaminante do processo	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Descrição de amostras	44
5.2 Pesquisa de matérias estranhas	46
5.3 Avaliação microbiológica	48
5.4 Validação da eficácia descontaminante do plasma	66
5.5 Análise da eficácia do processo por plasma sobre a contaminação natural	73
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais desempenharam um importante papel no processo de descoberta de fármacos. Atualmente os produtos naturais são responsáveis direta ou indiretamente, por cerca de 40% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna e se considerarmos aqueles utilizados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem é de aproximadamente 70% (YUNES; CALIXTO, 2001).

A terapêutica moderna, composta por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais derivados das plantas superiores (YUNES; CALIXTO, 2001).

No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos sintéticos disponíveis, o restante encontra nos produtos de origem natural, e especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (DI STASI, 1996).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) não só reconhece, como também estimula o uso de plantas medicinais pela população de países em desenvolvimento, embora recomende cuidados especiais no seu uso, orientando estudos científicos que confirmem sua segurança e a eficácia clínica (YUNES; CALIXTO, 2001).

A qualidade, eficácia e segurança no emprego de drogas vegetais dependem, entre outras questões, da sua qualidade sanitária. Sua origem natural propicia carga microbiana elevada devido às contaminações ambientais e às condições rústicas em que ocorrem o cultivo e a colheita de plantas medicinais, assim como a secagem e processamento, armazenamento e transporte em condições inadequadas e precárias.

A Resolução RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000, estabelece que a pesquisa de contaminantes microbianos deve atender a critérios farmacopeicos ou recomendações da OMS. O capítulo "Atributos microbiológicos de produtos farmacêuticos não estéreis" da Farmacopéia Americana na sua 28ª edição (USP, 2005), enfatiza o monitoramento de matérias-primas de origem animal ou botânica, especialmente aquelas que permitem o crescimento microbiano ou que não se tornam estéreis durante o processamento subsequente". A ausência de microrganismos patogênicos viáveis como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e bolores do gênero *Aspergillus* consiste também em exigência fundamental (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Tendo por meta a redução da biocarga presente nas drogas de origem natural, aplicam-se processos de descontaminação, sendo particularmente adotadas a exposição ao óxido de etileno e a irradiação por raios γ . Objetivando avaliar a adequabilidade de processos mais compatíveis para descontaminação, o presente estudo avaliou a eficiência do processo empregando plasma aplicado às drogas vegetais, alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) na presente investigação.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1 Contaminação Microbiana em Drogas Vegetais

Por sua origem natural plantas medicinais contêm numerosos microrganismos entre eles os bolores e bactérias patogênicas potenciais como *Pseudomonas aeruginosa* e microrganismos da família *Enterobacteriaceae*. A contaminação secundária provém do solo onde se encontram os microrganismos *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, fungos que produzem micotoxinas, coliformes fecais (*Escherichia coli*) e *Staphylococcus aureus* provenientes da manipulação das drogas vegetais brutas durante a colheita, processamento e transporte.

Alexander, Wilson e Davidson (1997) estudaram 425 medicamentos fitoterápicos licenciados, e avaliaram quantitativamente o nível de contaminação microbiológica e confrontaram com o limite farmacopeico de 5×10^5 UFC/g para bactérias aeróbias e de 5×10^4 UFC/g para fungos (Farmacopéia Européia, 1996). Em 250 amostras de comprimidos, 46 amostras na forma de pós e grânulos, 58 amostras de líquido oral e 71 amostras de produtos para uso tópico, sendo 22% e em 33% das amostras de comprimidos e de pós ou grânulos, respectivamente apresentaram contaminação por bactérias aeróbias superior a 10^5 UFC/g. Em 20% das amostras foram detectadas populações fúngicas superiores a 10^4 UFC/g. Todas estas amostras foram submetidas ao teste para detecção de bactérias patogênicas. Os autores detectaram amostras contendo *Enterobacter spp* (28%), *Enterococcus faecalis* ou *E. faecium* (9%), *Clostridium perfringens* (4%) e *Klebsiella pneumoniae* (2%).

Negretti (1983) investigou a contaminação de 350 drogas vegetais comercializadas na Itália, sendo que 43,13% apresentaram carga bacteriana entre 10^3 e 10^5 UFC/g e 50,57% com carga fúngica entre 10^2 e 10^4 UFC/g, além disto, o índice de contaminação por microrganismos patogênicos foi de 23,14%.

Em Portugal, Martins *et. al* (2001) estudaram a qualidade microbiológica de 62 amostras compostas por 7 tipos de plantas medicinais, dentre elas a camomila, e constataram a presença de *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* em 96,8% e 83,9% das amostras, respectivamente. Os níveis de contaminação fúngica foram superiores a 10^5 UFC/g tendo sido detectada a presença de *Fusarium spp*,

Penicillium spp, *Aspergillus flavus*, com predominância do *Aspergillus niger* em todas amostras. Algumas espécies de leveduras foram encontradas nas inflorescências de camomila, entre elas *Cryptococcus laurentii* (28,1%) e *Rhodotorula mucilaginosa* (22,8%) com níveis de contaminação superiores a 10^4 UFC/g.

Fischer *et. al* (1993) avaliaram 84 amostras de especialidades fitoterápicas de uso oral, nas formas de cápsula, comprimido e pó, comercializadas na cidade de São Paulo, e constataram que 70,3% e 32,1% das amostras, respectivamente, apresentaram contagens superiores a 10^3 UFC de bactérias aeróbias /g e superiores a 10^2 UFC de bolores e leveduras/g. A presença *Escherichia coli* foi detectada em 6% das amostras, foram encontradas contagens de ordem de 10^2 UFC/g.

Santos *et. al* (1995) analisaram a qualidade microbiológica de 51 amostras de fitoterápicos, na forma de pó (guaraná), extrato fluído, cápsulas e comprimidos e comprovaram os altos níveis de contaminação em cerca de 56,8% das amostras, e que segundo as especificações da OMS os produtos estavam impróprios para o consumo. Verificaram contagens de bactérias aeróbias superiores a 10^3 UFC/g e contagens de fungos e leveduras superiores a 10^2 UFC/g, com valores mínimos de contagens muito próximos aos limites máximos permitidos pela OMS para produtos de origem vegetal para uso interno sendo 10^5 UFC/g para bactérias aeróbias e 10^3 UFC/g para bolores e leveduras. Detectaram as espécies potencialmente patogênicas como *Enterobactérias*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* em 37,2% dos produtos testados.

Lutomski e Kedzia (1980) pesquisaram os níveis de contaminação fúngica de 246 drogas vegetais brutas e verificaram a ocorrência dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Thamnidium*. Os resultados dos experimentos indicaram que apenas 10% das drogas vegetais apresentaram níveis de contaminação menores ou iguais a 10^2 UFC/g em concordância com os limites da Federação Farmacêutica Internacional (FIP) e 66% das amostras apresentaram níveis de 10^2 a 10^4 UFC/g e 24% das amostras apresentaram contagens superiores a 10^4 UFC/g.

2.2 Padrões Microbianos em Drogas Vegetais

As primeiras citações sobre padrões de insumos farmacêuticos surgiram em consequência a problemas clínicos relacionados à má qualidade sanitária de medicamentos farmacêuticos derivados de produtos animais como comprimidos de pó de tireóide (KALLINGS et al, 1968), assim como a administração de cápsulas de vermelho de carmin, empregado como agente marcador no diagnóstico de doenças digestivas (KOMARMY; OXLEY; BRECHER, 1967).

Em 1980, Lenoble e colaboradores elaboraram especificações relativas a qualidade microbiológica de espécies vegetais que se destinam a infusão e assim foram estabelecidos os limites de 5×10^5 UFC/g de microrganismos aeróbios mesófilos e 5×10^4 UFC/g de enterobactérias.

A última edição da Farmacopéia Brasileira, estabelece a metodologia para a pesquisa e identificação de microrganismos patogênicos em produtos farmacêuticos não estéreis e matérias-primas usadas diretamente em sua fabricação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Define-se nesta, os mesmos atributos de pesquisa de microrganismos específicos que constam da 23ª edição da Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 1995), complementados por indicadores de maior risco dependendo da via de administração; para via de administração oral, como: *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

As primeiras citações sobre limites microbianos surgiram na 11ª e 12ª edições, e posteriormente foram acrescentadas algumas alterações na 13ª edição da *United States Pharmacopeia* (USP). Na 18ª edição, sendo que no capítulo "Atributos microbiológicos de produtos farmacêuticos não estéreis", e 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 estas matérias-primas que deveriam ser rotineiramente testados quanto à presença de patogênicos específicos, e contagem de microrganismos viáveis totais. Na USP XXIII e NF, especificação de qualidade microbiana consta em 50 monografias de matérias-primas, com limite de carga microbiana viável permitida oscilando entre 10^2 a 10^3 UFC/g (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Abordando os fitoterápicos, a Portaria nº 123 de 19 de outubro de 1994, da secretaria de Vigilância Sanitária, que define na Norma Técnica para Registro de Fitoterápicos, estabelece as seguintes especificações para matérias-primas vegetais (planta fresca, droga vegetal): menos que 10^5 UFC/g de viáveis totais; menos que 10^4 UFC/g de leveduras ou bolores; 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 nas legislações seguintes e também a resolução RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000 e a Resolução RDC nº 48 de 16 março de 2004 que estabelecem que a pesquisa de contaminantes microbianos deve estar de acordo com critérios da Farmacopéia Brasileira ou com as recomendações da OMS (BRASIL, 1995).

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

- Para matéria prima vegetal no estado bruto submetida a descontaminação por métodos físicos e químicos:
 - *Escherichia coli*: máximo de 10^4 UFC/g;
 - Bolores: máximo de 10^5 UFC/g.
- Para drogas vegetais submetidas a processo de redução de sua carga microbiana antes do uso, (por exemplo, em infusos) ou para produto de origem vegetal pré-tratado de aplicação tópica:
 - 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;
 - *Salmonella*: ausência.
- Produtos de origem vegetal para uso interno:
 - Bactérias aeróbicas: máximo de 10^5 UFC/g;
 - Bolores e leveduras: máximo de 10^3 UFC/g;
 - *Escherichia coli*: máximo de 10UFC/g;
 - Outras enterobactérias: máximo de 10^3 UFC/g;
 - *Salmonella*: ausência.

A regulamentação de fitoterápicos RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000 elaborada pela Agência de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2000) que em seu anexo “Regulamento Técnico sobre Registro de Fitoterápicos”, onde constam as necessidades da pesquisa de contaminantes microbiológicos, menciona a utilização de métodos para eliminação destes contaminantes assim como orienta a pesquisa de eventuais alterações na matéria-prima, em decorrência de sua aplicação.

2.3 Métodos de Descontaminação de Drogas Vegetais

Os métodos de descontaminação de drogas vegetais devem atender os seguintes critérios: apresentar eficácia descontaminante, oferecer segurança ao consumidor e ao operador, possuir capacidade de penetração na embalagem e no produto, possibilitar aplicação em grandes volumes de material e não alterar as características organolépticas e os princípios ativos do produto (MIDGAL; OWZARCZYK, 1998).

A preocupação com a qualidade microbiológica das plantas medicinais revela a necessidade de se buscar alternativas de processos descontaminantes eficazes e compatíveis com a integridade dos princípios ativos termosensíveis.

2.3.1 Óxido de Etileno

Como processo químico descontaminante emprega-se gás óxido de etileno que inativa amplamente os microrganismos. Entretanto diversos autores, entre os quais Fang e Wu (1998) estudaram os efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos resíduos de óxido de etileno, e concluíram que por induzir sérios riscos o seu uso tem sido restringido, ou até mesmo proibido em certos países, como aqueles da União Européia. Resultados semelhantes de toxicidade foram obtidos no emprego do gás óxido de etileno em especiaria promovendo resíduos tóxicos de difícil remoção e que permanece por vários meses após o processamento de alimentos (CHMIELEWSKI; MIDGAL, 2005).

2.3.2 Radiação Gama

Outro método físico de descontaminação amplamente adotado é a radiação Gama, devendo-se investigar as incompatibilidades e também desenvolver estudos de estabilidade, inclusive com avaliação toxicológica, tendo em vista a possibilidade de ocorrerem alterações químicas e sensoriais indesejáveis (AZIZ *et al*, 1997; FANG; WU, 1998; MIGDAL; OWCZARCZYK, 1998; KIM; YOON; BYUN, 2000; OWCZARCZYK; MIGDAL, KADZIA, 2000).

Soriani, Satomi e Pinto (2005) desenvolveram trabalho de descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno do ginkgo e guaraná. As contagens de aeróbicos totais iniciais apresentaram níveis de 10^4 a 10^6 UFC/g para o ginkgo e níveis de 10^3 a 10^4 UFC/g para o guaraná respectivamente e níveis de 10^3 a 10^7 UFC/g para o ginkgo e níveis de 10^4 a 10^6 UFC/g para o guaraná respectivamente, antes dos processos de descontaminação. As amostras submetidas a irradiação de 11,4 kGy apresentaram valores de contagem de aeróbicos totais ≤ 10 UFC/g para as duas drogas e ≤ 10 UFC/g após 60 minutos de exposição ao óxido de etileno. Enterobactérias são sensíveis à radiação, que em dose de 5 kGy foi suficiente para eliminá-las. Dose de 17,8 kGy preservou os princípios ativos do guaraná e ginkgo.

2.3.3 Plasma

O processo empregando plasma apresenta-se como possibilidade a ser averiguada por ser realizado à baixa temperatura, preservando assim a integridade dos princípios ativos termossensíveis, além de não promover a formação de resíduos tóxicos ou oferecer riscos ocupacionais de qualquer natureza.

O processo de descontaminação empregando o plasma deve apresentar alguns atributos quanto a sua eficácia, amplo espectro antimicrobiano produzindo rápida letalidade do microrganismo, ser atóxico para os operadores e aplicável aos vários materiais não produzindo corrosão nas superfícies dos mesmos, além de não produzir danos ecológicos.

O processo empregando plasma aproxima-se do ideal, pois é realizado à baixa temperatura, apresentando compatibilidade com o maior número de materiais, facilidade de adaptação em qualquer ambiente (hospitalar ou industrial),

possibilidade de ser monitorado e facilidade de operação (SHINTANI, 1995) . Outra vantagem está no fato de o plasma promover a reação química com as unidades moleculares que compõem os microrganismos muito rapidamente, viabilizando esse processo em curto espaço de tempo (CASSOLA; MARTINHO, 1997). Para compreender melhor este mecanismo, deve-se considerar que a produção de um plasma consiste em realizar uma transferência de energia (campo eletromagnético, rádio-freqüência entre outros) em um gás a baixa pressão, cujo resultado é a produção de pares elétron-íon, e espécies ativas (CHAPMAN, 1980; CINELLI, 1994).

Assim, através de um fluxo contínuo, por exemplo, de peróxido de hidrogênio, ocorre à difusão das espécies reativas criadas no plasma até a superfície de materiais a serem tratados. No final do processo têm-se como produtos de degradação oxigênio e água sem deixar resíduos tóxicos (CASSOLA; MARTINHO, 1997). Também o oxigênio puro pode ser empregado como gás de origem.

Os processos empregando plasma foram caracterizados por meio de um sistema de espectrometria de emissão que é baseado na emissão de fótons das espécies excitadas. Durante o processo de plasma os elétrons de um átomo ou molécula podem ganhar energia suficiente para passar para um nível mais energético, onde ficam em órbita durante certo intervalo de tempo, e em seguida decaem para um nível de menor energia. Durante o processo de decaimento ocorre perda de energia por parte dos elétrons, sendo que essa energia pode ser emitida em forma de fótons (LEROUGE *et al.*, 2000).

Em materiais orgânicos submetidos a processo de plasma devem ser monitoradas alterações que ocorrem no oxigênio e compostos como dióxido de carbono, de maneira a permitir a avaliação qualitativa quanto ao ataque químico (CHAU *et al.*, 1966).

Vale ressaltar a inexistência atualmente, de um método efetivo com esterilização com plasma, e também que não foi desenvolvido qualquer equipamento comercial que permita utilizar este método de esterilização (MOISAN *et al.*, 2001).

Uma alternativa de explicação quanto ao mecanismo de ação do plasma relacionado à morte microbiana é o fenômeno da Descarga de Barreira Dielétrica (RDB). No estudo de Laurossi, Mendis e Rosemberg (2003), a metodologia adotada correlaciona a aplicação do plasma na bactéria Gram negativa, como a *E coli*, e bactéria Gram positiva como o *Bacillus subtilis* submetido a um campo elétrico contínuo (DC). O efeito germicida é decorrente do processo eletrofísico gerado por

tensão eletrostática da descarga elétrica sobre o microrganismo. A eficácia deste processo eletrofísico depende não apenas do potencial eletrostático e da força de tensão da parede celular do microrganismo, mas também da sua forma e textura da sua parede celular.

Os autores concluíram que o plasma gerado por RDB forma partículas carregadas, radicais livres e radiação (IR, visível e UV) que em sinergismo propiciam a letalidade do microrganismo. Foi observado pelos autores Laurossi, Mendis e Rosemberg (2003), que bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*) são estruturalmente mais robustas que as bactérias Gram-negativas (*E coli*), pois não sofrem a lise celular.

O ICP (Inductively Couple Plasma) é um sistema de plasma com acoplamento indutivo. Esse sistema de plasma é composto de um tubo de quartzo circundado por uma bobina de rádio-freqüência. Esse arranjo promove a geração de plasma ao se aplicar um potencial RF aos terminais desta bobina. As principais vantagens deste sistema são a completa ausência de eletrodos metálicos no interior da câmara de processos. Apresenta a possibilidade de posicionar as amostras fora da região de plasma, conseguindo assim distinguir os efeitos do campo eletromagnético do plasma, o ataque iônico e o efeito dos radicais gerados no plasma nos processos de esterilização.

2.4 Conceitos Gerais acerca do Processo Plasma

O Plasma é formado quando um gás é submetido a uma força eletromagnética. Assim um sistema gasoso de moléculas estáveis e átomos neutros originam partículas ionizadas e elétrons, que constituem o plasma ou quarto estado da matéria.

Alguns fatores a serem considerados neste processo são as densidades de partículas neutras, densidades de elétrons e íons definidos como a densidade do plasma, temperatura do plasma, temperatura do elétron, freqüência de colisão dos elétrons, pressão, potência e radiofreqüência.

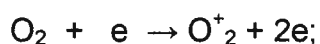
A temperatura do plasma decorre de duas origens: uma representada pelas partículas neutras, radicais e íons, e outra pelos elétrons. O movimento dos elétrons no campo eletromagnético gera a distribuição de energia, pois a maior parte da ionização é produzida por colisões elétrons/moléculas (átomos). A densidade de

partículas carregadas no plasma está relacionada com o grau de ionização, e sua intensidade dependerá da pressão do sistema.

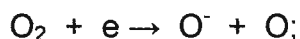
Aplicando-se, por exemplo, radiofrequência (RF) de 13,56 MHz pode-se controlar a geração de radicais no plasma com ataque iônico em um sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo RIE. No caso de campo eletromagnético aplicado ao oxigênio, a baixa pressão (100 mTorr), será promovido ataque iônico, irradiação UV, e geração de plasma.

As partículas ionizadas geradas no plasma de gás oxigênio são O_2^+ , O^+ , O^- , o elétron e a molécula neutra de O_2 , e átomo oxigênio neutro. (SHIBATA; MAKABE; NAKANO, 1998).

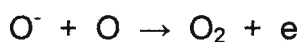
Os mecanismos cinéticos envolvidos são: ionização de O_2 por impacto de elétron, conforme segue:



Também a eletro associação ao O_2 (*electron attachment reaction*):



a resultante $O^- + O$, é alcançada através da reação de separação dos elétrons na geração do volume do plasma como fonte de novos elétrons (*electron detachment reaction*):



As três principais combinações com O_2 exemplificadas acima compõem o complexo sistema de quase neutralidade do plasma, pois a seqüência de reações de recombinação/dissociação é controlada pela RF em plasma de oxigênio. A reação de eletrodissociação entre O e O^- fornecem novos elétrons ao sistema plasma. (SHIBATA; MAKABE; NAKANO, 1998).

O número de colisões elásticas de elétrons em moléculas de oxigênio metaestável O_2 e oxigênio atômico no estado fundamental aumentam sob baixa pressão de 10^{-3} Torr (0,13 Pa) (ELLIASSON; KOGELSCHATZ, 1986).

O parâmetro potência muda a energia dos elétrons e por conseqüência a sua distribuição eletrônica.

2. 5 Mecanismo de ação descontaminante do Plasma

Os mecanismos de descontaminação por plasma incluem três processos básicos (MOISAN; BARBEAU, 2002):

1) Destruição direta por radiação UV do material genético

A destruição do DNA do microrganismo por fótons U.V é relativamente pequena decorrente da baixa penetração dos fótons sobre os microrganismos e está relacionada ao número de microrganismos, espessura e composição química da parede de revestimento do esporo e por fim aspecto da superfície exposta à radiação U.V.

Emissões em comprimento abaixo de 190 nm no processo plasma não são consideradas relevantes por ocorrerem em baixa quantidade neste processo.

2) Erosão dos átomos por fotodessorção extrínseca por irradiação UV proveniente da quebra de ligações químicas em átomos, em contato intrínseco dos microrganismos, produzindo pequenas moléculas voláteis (CO, CH₃).

3) Erosão dos microrganismos, átomo a átomo, também denominado processo *etching* é produzida a partir de espécies reativas, promovendo o processo de oxidação e degradação do biomaterial, transformando-o em produtos voláteis (CO₂, CO, H₂O e N₂). O processo *etching* aumenta a quantidade de fótons UV agindo em sinergismo com as espécies reativas, potencializando a eliminação do microrganismo. A reação química induzida por fótons UV resulta na dessorção de radicais e moléculas na fase intermediária e final da oxidação (MOISAN *et al*, 2002).

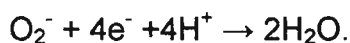
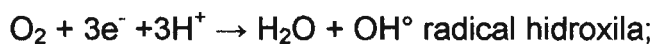
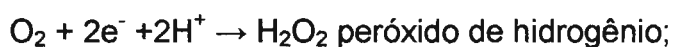
A destruição de micróbios é alcançada devido à elevada energia dos fótons ou íons intensamente acelerados, ou por espécies quimicamente ativas como átomos de oxigênio e moléculas de O₂ metaestável. O plasma de gás oxigênio produz estes fatores combinados, sendo mais efetivo devido ao sinergismo (BOL'SHAKOV *et al*, 2004).

O plasma é formado através do campo eletromagnético, induzido por ondas de radio frequência da ordem de 13,56 MHz em moléculas do gás inserido em uma câmara sob baixa pressão. Como resultado se obtém nuvens de partículas carregadas de íons e radicais livres (CROW; SMITH, 1995).

Com o impacto da energia da radio frequência que decompõe as moléculas de peróxido de hidrogênio em radicais livres reativos, parte desta energia é transferida para os íons, elétrons, átomos excitados e moléculas excitadas, os quais

interagem com os componentes vitais das células como membranas celulares, enzimas e ácido nucléico (BLOCK, 1991). As espécies reativas do gás peróxido de hidrogênio são: H° , radical livre hidroxilas OH° , radical livre hidroperóxidos HO_2° .

Os mecanismos de reação do gás peróxido de hidrogênio são:



O íon superóxido e o radical hidroxila são produtos intermediários na reação de redução do oxigênio formando água.

O outro mecanismo proposto do peróxido de hidrogênio na destruição da bactéria está relacionado ao íon superóxido com peróxido de hidrogênio produzindo o radical hidroxila OH° .



O radical livre hidroxila é um forte oxidante e é altamente reativo, interage com a membrana lipídica, DNA e outros componentes essenciais da célula. No final do processo plasma empregado peróxido de hidrogênio tem-se como produtos finais água e oxigênio.

2.6 Drogas vegetais estudadas

O critério de seleção das drogas vegetais alvo deste presente trabalho representam os fitoterápicos mais consumidos no Brasil e também a possibilidade do monitoramento dos respectivos princípios ativos que posteriormente serão comparados aos processos de descontaminação óxido de etileno e irradiação gama.

2.6.1 Alcachofra

A alcachofra (*Cynara scolymus* L.) pertence à família Asteraceae, é de origem Mediterrânea e o seu cultivo se estende por toda Europa central (SPERONI, 2003).

Os componentes químicos principais da alcachofra são: ácidos fenólicos (até 2%) como ácido cafeico, ácido clorogênico e cinarina; flavonóides (01 a 1%) e óleos voláteis (SIMÕES, 2004).

Sua propriedade farmacológica mais conhecida é a atividade hepato protetora colerética, promovendo aumento substancial na quantidade de bile excretada no intestino, e ainda o aumento da concentração de ácidos biliares na bile atribuído aos derivados cafeoilquínicos (GADGOLI; MISHARA, 1997; GORZALCANY *et al*, 2001). Estudos evidenciam a redução do colesterol sangüíneo através do potencial antioxidante de seus constituintes principais como flavonas, flavononas, flavonoides e ácidos fenólicos. Esta atividade terapêutica está relacionada à estrutura fenólica destas substâncias, agindo como mediadores de inibição de radicais livres (FRAGA *et al*, 1987; HERTOOG; HOLLMANN, 1998).

2.6.2 Camomila

Chamomilla recutita (L.) Rauschert, conhecida como camomila alemã, camomila húngara, camomila doce falsa, camomila selvagem, da família Asteraceae é amplamente usada na prática medicinal (BARENE *et. al*, 2003).

Esta planta é nativa e cultivada no sul, e no oeste Europeu. A droga vegetal é constituída pelas inflorescências. As formulações farmacêuticas da camomila promovem efeitos anti-inflamatórios, antiespasmódico e carminativo. Em estudos *in vitro* tem demonstrado efeitos bacteriostáticos e fungistáticos que contribuem para aplicação em uso dermatológico (SCHULTS; HANSEL; TYLER, 2001). Os principais constituintes da camomila são o óleo volátil, flavonóides e mucilagem.

A solução aquosa (chás) contém teor máximo de 15% de óleo volátil. O óleo volátil destilado da camomila contém terpenoide camazuleno ($\leq 15\%$), α -bisabolol ($\leq 25\%$), óxidos A, B, C do α -bisabolol e cis (trans)-em-indicicloester ($\leq 30\%$). O camazuleno e o bisabolol pertencem ao grupo do sesquiterpenos (WEISS; FINTELMANN, 2000).

Os flavonóides presente no extrato alcoólico em nas infusões de chá apresentam ação farmacológica espasmolítica. As substâncias flavonóides incluem apigenina, luteolina e a quercetina (WEISS; FINTELMANN, 2000).

O camazuleno, α -bisabolol e flavonas como a apigenina promovem forte efeito antiinflamatório, agem sobre os mediadores do processo inflamatório. Estas substâncias promovem efeito inibitório sobre as enzimas 5-lipoxygenase e ciclooxigenase (SCHULTS; HÄNSEL; TYLER, 2001).

A camomila contém aproximadamente 10% de substâncias mucilaginosas que incluem o ácido urônico contendo ácidos heteroxilanos. Estas substâncias não estão presentes no extrato puro alcoólico de camomila, entretanto em preparações tópicas agem como antiinflamatório produzindo filme protetor de revestimento sobre a pele. As substâncias mucilaginosas são responsáveis pelo efeito protetor agindo sobre a área de lesão da mucosa gastroduodenal (WEISS; FINTELMANN, 2000).

O chá das folhas de camomila germânica tem sido usado como bebida precedendo o sono durante séculos. O efeito sedativo suave da camomila tem sido atribuído ao flavonóide apigenina, que se liga aos receptores benzodiazepínicos (MEDINA *et al*, 1998). Dez entre 12 pacientes que ingeriram altas doses do chá de camomila entraram em sono profundo cerca de 90 minutos. Esses resultados foram observados tanto em pacientes com insônia ou sem insônia (MASAGO *et al*, 2000).

2.6.3 Ginkgo

Ginkgo biloba L. da família Ginkgoaceae é originária da China e utilizada na terapêutica desde a antigüidade.

O extrato de *Ginkgo biloba* L. EGb 761, obtido por extração das folhas desta droga, contém porcentagens específicas de glicosídeos de gincoflavonas (24%) e terpenóides (6%), entre estes últimos os gincolídeos e bilobalídeos (VARGA *et al*, 1999). A ação combinada dos diferentes princípios ativos presentes no extrato promove o incremento do suprimento sanguíneo cerebral pela vasodilatação e redução da viscosidade do sangue. (BIRKS *et al*, 2002). O gincolídeo B é antagonista do receptor do fator ativador de plaquetas (PAF), atribuído as propriedades de antiagregação plaquetária (LUO, 2001).

2.6.4 Guaraná

O guaraná é originário das Amazônias brasileira, venezuelana e colombiana. No Brasil a espécie encontrada é a *Paullinia cupana* Kunth, da família Sapindaceae cuja semente contém alto teor de cafeína e é tradicionalmente consumida pelos nativos da região central da Amazônia brasileira, preparada como bebida estimulante.

As sementes do guaraná contêm cafeína, traços de teofilina e teobromina, saponinas, ácido caprotânico, matérias resinosas, aromáticas ou pépticas, óleo fixo fibra, goma e amido (TESKE; TRENTINI, 1997).

Esta droga é utilizada como estimulante do sistema nervoso central, combatendo o estresse físico e mental (HENMAN, 1982). A cafeína age sobre o sistema cardiovascular induzindo a vasoconstrição central e vasodilatação periférica, também estimula a contração da musculatura estriada reduzindo a fadiga muscular.

As propriedades psicoativas desta droga vegetal são decorrentes de altos teores da cafeína, que promovem efeitos de revitalização. (SIMEARAY *et al*, 1982; YOSHIZAWA *et al*, 1987).

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo estudar a qualidade microbiológica das amostras de quatro drogas vegetais (alcachofra, camomila, ginko e guaraná) adquiridas de três fornecedores. Também avaliar a eficácia e a viabilidade de uso do processo plasma na descontaminação de drogas vegetais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O material de estudo constituiu-se de drogas vegetais sem tratamento, adquiridas de três distribuidores: Thauan Ervas (fornecedor A), Quimmer Ervas e Especiarias (fornecedor B) e Santos Flora Comércio de Ervas LTDA (fornecedor C). Não foram disponibilizadas informações quanto ao período de colheita e números de lotes.

4.2 Métodos

4.2.1 Descrição das amostras

Foram avaliadas as seguintes drogas vegetais: folhas de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedores B e C), inflorescência de camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) (fornecedores A, B e C), folhas de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedores A e C) e sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) (fornecedores A, B e C).

4.2.2 Pesquisa de matérias estranhas

As drogas vegetais apresentam freqüentemente impurezas que podem estar relacionadas a outra estrutura da planta diferente da órgão estudado, bem como fragmentos de outras plantas ou mesmo impurezas de natureza mineral como pedras, areia ou terra. As análises botânicas macroscópicas indicam as condições do processo de cultivo e coleta e armazenamento sendo essa pesquisa um importante indicativo de qualidade e boas práticas de agrícola diminuindo as contaminações microbiológicas da droga coletada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Não foi possível obter amostras de 3 lotes de alcachofra por não estarem disponíveis no mercado. O mesmo ocorrendo para o ginkgo, visto que ocorreram limitações à sua importação.

4.2.3 Preparação das amostras

As drogas vegetais foram pulverizadas, com auxílio de moinho de facas sanitizado com álcool 70%, com fragmentação para medida máxima de 3 mm (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Parte das drogas foi utilizada para a avaliação preliminar da qualidade microbiana, para os testes de desafio com plasma foram acondicionadas, sob condições assépticas, em papel Kraft em porções de 10g e 45g, sendo cada embalagem costurada com linha de algodão n° 10.

4.2.4 Métodos de coloração para estudos histológicos de drogas vegetais

Método de coloração foi desenvolvido empregando corante composto por uma mistura de Safranina a 1% para coloração de células lignificadas e Azul de Astra a 1% para coloração de paredes celulósicas sem impregnação de lignina (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Outro método de coloração empregado foi floroglucinol em ácido clorídrico 20% que cora caracteristicamente as paredes lignificadas em vermelho-cereja evidenciando a presença de vasos xilema e fibras com paredes espessas lignificadas (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

4.2.5 Avaliação da Qualidade Microbiológica

4.2.5.1 Validação do método de contagem microbiana por semeadura em profundidade

A validação do método de contagem visa verificar a ocorrência de substâncias que possam interferir na recuperação de eventuais microrganismos presentes na amostra. Para este estudo, porções das amostras (alcachofra, camomila, ginko e guaraná) foram esterilizadas por calor úmido a 121°C, por 30 minutos para eliminar suposta carga microbiana inicial. As amostras foram submetidas a diluições decimais seriadas em água peptonada estéril (0,1% p/v), iniciando-se em 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Alíquotas de 1ml de cada diluição foram semeadas em triplicata, em placa de Petri, sobre a amostra foi adicionada 1ml de suspensão de esporos padronizada contendo de microrganismos inoculados contendo aproximadamente 10^2 de células do microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. A

contagem da suspensão de esporos empregada nesta validação foi realizada por partindo-se de concentração de esporos padronizada contendo $8,49 \times 10^9$ esporos por mL, seguindo-se diluições decimais em água destilada estéril, sendo as diluições de 10^{-8} a 10^{-2} submetidas à contagem, em triplicata, pela técnica de semeadura em profundidade "Pour Plate".

Após adição de Agar caseína-soja para a contagem de bactérias incubou-se a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 48 horas (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2000).

4.2.5.2 Contagem de bactérias aeróbias totais e fungos

Porções de 10g de cada amostra foram adicionadas a 90 mL de água peptonada (Difco) (0,1% p/v). As amostras foram submetidas à homogeneização por 5 minutos, seguindo-se diluições seriadas decimais em água peptonada estéril, sendo diluições de 10^{-1} até 10^{-8} . Alíquotas de 1 mL de cada diluição da amostra foram transferidas, para o centro de três placas de Petri estéreis, adicionando-se 20 mL de meio de cultura ágar caseína-soja (Oxoid) e 20 mL de ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid), em outras três placas. A incubação das placas foi na posição invertida em estufa $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$, por 48 horas, e de ágar Sabouraud Dextrose para fungos a $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 7 dias (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005).

4.2.5.3 Contagem de enterobactérias

A partir de 10 g de amostra preparou-se uma suspensão em 90 mL de água peptonada (0,1% m/v), tendo sido efetuadas diluições seriadas decimais em água peptonada estéril, sendo diluições de 10^{-1} até 10^{-8} . Alíquotas de 1 mL de cada diluição da amostra foram transferidas par três placas de Petri estéreis, vertendo cerca de 15 mL de meio de cultura ágar vermelho violeta bile glicose (Difco) por placa. Após solidificação, adicionou-se uma camada extra de 10 mL do mesmo meio de cultura na superfície. Realizou-se incubação das placas a $35-37^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2000).

4.2.5.4 Pesquisa de microrganismos patogênicos específicos

Foram realizadas as pesquisas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6568, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8739, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* ATCC 10231 e bolores do gênero *Aspergillus*. Foram empregadas cepas representativas, como controles positivos simultaneamente à investigação de contaminantes. (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.5.4.1 Enriquecimento não seletivo

Utilizando-se procedimento asséptico, foram transferidos 10 g de amostra para 90 mL de Caldo lactosado (Difco) para pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp, e para 90mL de Caldo caseína-soja (Difco) para pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* seguidos de incubação a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005).

4.2.5.4.2 Pesquisa de *S. aureus*

O crescimento obtido no Caldo caseína-soja foi transferido para 20 mL de meio ágar Vogel-Johnson (Oxoid) , utilizando-se técnica de semeadura por estrias seguindo-se a incubação durante 24 - 48 horas a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005).

Provas complementares

A caracterização micromorfológica dos microrganismos isolados foi efetuada empregando-se coloração pela técnica de Gram. Paralelamente, foram efetuados testes complementares para identificação presuntiva, recomendados pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Para *S. aureus* foram empregados testes para detecção de coagulase e desoxirribonuclease.

4.2.5.4.3 Pesquisa de *P. aeruginosa*

Para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, foi transferida alçada do Caldo Caseína-soja para placa de Petri contendo 20 mL de ágar cetrimida (Difco)

utilizando-se a técnica de semeadura na superfície. A incubação foi a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 horas. As colônias desenvolvidas foram repicadas para ágar piocianina e para ágar fluoresceína, segundo incubação a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas.

Provas complementares

Para *P. aeruginosa* foi empregado o teste de reação de enzima citocromo-oxidase, complementado com prova de crescimento a 41°C em ágar inclinado Infuso Cérebro-coração (Difco).

4.2.5.4.4 Pesquisa de *E. coli*

Foram transferidas alíquotas do caldo lactose para ágar MacConkey (Difco) para o isolamento de *E. coli*, incubando-se a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, por 24 - 48 horas.

Comprovando-se o crescimento no meio ágar MacConkey as colônias foram transferidas para 20 mL de ágar Eosina Azul de Metileno (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005).

Provas complementares

No caso de *E. coli* foram utilizados os testes de ágar tríplice açúcar-ferro (Difco), indol, vermelho de metila e Voges Proskauer, além do teste de citrato como única fonte de carbono.

4.2.5.4.5 Pesquisa de *Salmonella* spp

Enriquecimento em meio seletivo para a pesquisa de *Salmonella* spp

Alíquotas de 1 mL da suspensão resultante do meio de enriquecimento não seletivo (Caldo lactosado) foram transferidas para 10 mL do Caldo tetrionato (Difco) e do Caldo selenito cistina (Difco), seguindo-se de incubação por 12 - 24 horas a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005).

Para o isolamento de *Salmonella* spp, foram transferidas alíquotas do caldo tetrionato e caldo selenito cistina, para os meios ágar verde brilhante (Difco), ágar sulfito de bismuto, ágar XLD (Oxoid) incubando-se durante 24 - 48 hs a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005).

Provas complementares

Para *Salmonella* spp procedeu-se, inicialmente ao teste de ágar tríplice açúcar-ferro, complementado com os testes: ágar lisina-ferro, teste de citrato como única fonte de carbono, urease e fermentação da lactose.

4.2.5.4.6 Identificação de fungos contaminantes

Colônias obtidas no meio de ágar Sabouraud Dextrose foram isoladas e submetidas à identificação do gênero pela Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

4.2.5.4.7 Identificação de microrganismo por Sistema Vitek

Os microrganismos patogênicos que apresentaram resultados característicos na identificação presuntiva e que foram confirmados na identificação empregando Sistema Vitek®.

4.2.5.5 Análise da eficácia do processo por plasma sobre a contaminação natural

Para a avaliação da eficácia descontaminante do processo, as drogas vegetais foram submetidas à contagem do número de UFC/g de aeróbios totais, fungos e enterobactérias e pesquisa de patogênicos e posteriormente submetidas aos desafios do processo de descontaminação por plasma, conforme descrito no item 4.2.6.

4.2.6 Descontaminação por plasma

Os testes de desafio com plasma foram realizados no Laboratório de Sistemas Integráveis com sede na Escola de Engenharia Elétrica Politécnica-Universidade São Paulo.

Foram posicionadas a cada ciclo, triplicatas de cada espécie vegetal de três fornecedores diferentes, inicialmente em amostras de 45g e posteriormente durante todo os experimentos amostras de 10g acondicionadas em pacotes de papel Kraft estéreis. As embalagens de drogas vegetais foram colocadas em placa de Petri estéreis e inseridas sobre o eletrodo do reator e permaneceram abertas durante o processo plasma e foram fechadas após o final do processo.

O estudo empregou um sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo RIE (*Reactive Ion Etching*), conforme Figura 1.

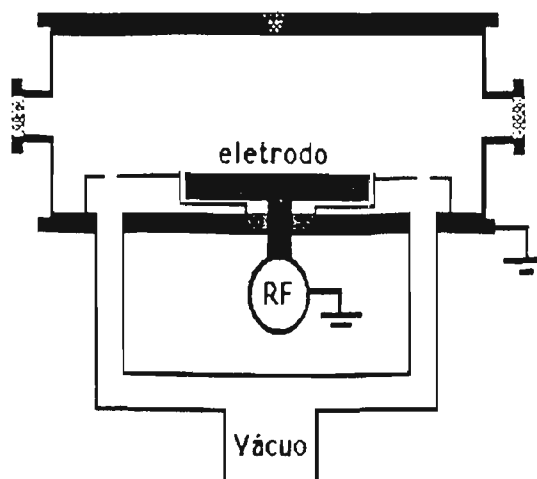


Figura 1. Sistema de plasma modo RIE.

A pressão no sistema foi reduzida por um sistema de vácuo até atingir 100 m Torr. Após a redução da pressão, foi injetado o gás de processo no interior do reator sob vazão de 200sccm, a qual foi mantida constante. Seguiu-se a geração de plasma por meio de um gerador de rádio-freqüência que opera em 13,56 MHz, o qual

permitiu controlar potência aplicada ao processo. Possibilitou o monitoramento da geração de radicais no plasma, como o ataque iônico nas amostras. Após o posicionamento das amostras no reator, a pressão foi diminuída e a umidade relativa foi de $30 \pm 5\%$ permanecendo constante durante todo processo plasma.

4.2.6.1 Testes preliminares para definição da potência de trabalho

Testes preliminares foram os desafios partindo-se de amostras com maior nível de contaminação natural para cada espécie vegetal estudada sob parâmetros físicos de 50W, para os processos plasma O₂ (100%) e para o processo plasma Oxigênio (80%) + H₂O₂ (20%), nos tempos de exposição 10, 20 e 30 minutos. Também para potencia de 100 W os processos plasma O₂ (100%) e para o processo plasma Oxigênio (80%) + H₂O₂ na concentração de 20% sob parâmetros fixos de pressão 100 mTorr, vazão do gás 200 sccm, nos tempos de exposição 10, 20 e 30 minutos. Ambos os processos, potencia 50 W e 100 W evidenciaram ausência de redução logarítmica para as quatro espécies vegetais estudadas.

4.2.6.2 Testes de desafio

As condições de processo foram conforme a seguir apresentado.

O trabalho envolvendo desafio por plasma foi subdividido em duas fases, sendo na primeira (Fase I) empregado o gás oxigênio puro, e na segunda (Fase II) Oxigênio + H₂O₂ na concentração de 20%.

4.2.6.2.1 Fase I

Processo plasma por acoplamento capacitivo modo local RIE, com amostras inseridas individualmente sobre reator sob parâmetros de processo: potência de 150W, pressão de oxigênio 100 mTorr, vazão de gás na câmara 200 sccm, gás O₂(100%), umidade relativa (UR) 60-70% e tempos de exposição 10, 20 e 30 minutos.

4.2.6.2.2 Fase II

Processo plasma por acoplamento capacitivo modo local RIE, com amostras inseridas individualmente sobre reator sob parâmetros de processo: potência de 150W, pressão de oxigênio 100 mTorr, vazão de gás na câmara 200 sccm, gás H₂O₂(20%) e O₂(80%), umidade relativa (UR) 60-70% e tempos de exposição 10, 20 e 30 minutos.

Foram avaliadas três amostras de cada espécie vegetal por ciclo.

4.2.7 Validação da eficácia descontaminante do plasma.

Para a validação da eficiência do processo de descontaminação por plasma, foram utilizadas amostras alcachofra e ginkgo do fornecedor C, submetidas à esterilização por vapor úmido a 121°C por 30 minutos e posteriormente secas em estufa à temperatura de 50°C por 1 hora. A preparação da suspensão padronizada de esporos de *Bacillus subtilis var niger* ATCC 6633 contendo 8,49 x10⁹ UFC/mL, Após o descongelamento à temperatura ambiente da suspensão padronizada de esporos foi efetuado diluições decimais seriadas em água destilada estéril de 10⁻⁶ a 10⁻⁸ seguiu-se à promoção do choque térmico (70°C por 15 minutos). As contagens das diluições 10⁻⁶ a 10⁻⁸ em triplicata foram realizadas por técnica semeadura em profundidade "Pour Plate", usando cerca de 15 mL de ágar caseína-soja estéril por placa. Após solidificação, adicionou-se superficialmente camada extra de 5mL do mesmo meio de cultura estéril por placa. Após o resultado da contagem controle de suspensão de esporos, procedeu-se à inoculação de alíquota de 1mL da suspensão de esporos com 10⁶ UFC/mL não submetida ao choque térmico para 15 amostras com massa de 10g amostras sob condições assépticas. Retiraram-se três embalagens de cada droga vegetal para contagem de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 antes do processo plasma O₂ (100%), e de plasma com peróxido de hidrogênio na proporção (20%) e O₂ (80%), tendo sido processadas 12 embalagens com 10g nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos por espécie vegetal e por processo plasma.

Após processamento, as amostras foram armazenadas a temperatura ambiente em caixas de papelão e encaminhadas para ao Laboratório de controle microbiológico. Estas amostras foram transferidas para 90 mL água destilada estéril,

homogeneizadas e submetidas ao choque térmico (70°C por 15 minutos). Foram efetuadas diluições decimais em água destilada estéril até obter suspensão com 10^{-8} UFC/mL. Posteriormente foram submetidas à contagem por semeadura em profundidade em triplicata, adicionando-se 15 mL de meio de cultura ágar caseína-soja (Oxoid) posteriormente selada com camada de meio. A incubação das placas foi na posição invertida à temperatura de $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, por 48 horas (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2002, 2005).

4.2.8 Análise da eficácia descontaminante do processo

Para a avaliação da eficácia descontaminante do processo, as drogas vegetais foram submetidas à contagem do número de UFC/g de aeróbicos totais, fungos e enterobactérias e pesquisa de patogênicos e posteriormente submetidas aos desafios do processo de descontaminação por plasma, conforme descrito no item 4.2.6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição das amostras

Estudou-se os aspectos microbiológico das espécies reativas geradas no plasma, entretanto não se constituiu como objetivo do presente trabalho o estudo das interações das espécies reativas geradas no plasma sobre os princípios ativos das drogas vegetais.

Matérias-primas de origem vegetal requerem cuidados especiais, quanto à embalagem primária utilizada no acondicionamento das drogas vegetais. Óleo essencial e óleo fixo existente atacam embalagens plásticas em decorrência da reatividade do material de acondicionamento ou sua capacidade de adsorver substâncias ou componentes, comprometendo a qualidade do produto (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

Na Tabela 1, estão apresentadas as condições de acondicionamento das drogas vegetais adquiridas de três distribuidores: Thauan Ervas Aromáticas (fornecedor A), Quimmer Ervas e Especiarias (fornecedor B) e Santos Flora Comércio de Ervas (fornecedor C).

Tabela 1 - Descrição do material de acondicionamento das drogas vegetais em estudo conforme recebidas de três fornecedores: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth).

Fornecedor	Alcachofra	Camomila	Ginco	Guaraná
A	Não fornecida amostra	Saco de polipropileno com embalagem de rafia	Saco de polipropileno com embalagem de rafia	Saco de polipropileno com embalagem de rafia
B	Saco duplo Polietileno	Saco duplo de Polietileno	Não fornecida amostra	Saco duplo de Polietileno
C	Saco de rafia	Saco de polietileno com embalagem de papel e rafia	Saco de rafia	Saco de polietileno com embalagem de papel e rafia

A embalagem primária de alcachofra, camomila, guaraná (fornecedor B) constituída de polietileno atóxico possibilita uma maior proteção, no tocante aos contaminantes ambientais, tais como, poeira, partículas de materiais estranhos, além de contaminantes biológicos, entretanto não há circulação de ar propiciando condições ambientais de alta umidade favorecendo a proliferação de bactérias e fungos presentes na contaminação natural das drogas.

5.2 Pesquisa de matérias estranhas

As drogas vegetais apresentam freqüentemente certas impurezas, que vão desde órgãos da própria planta diferentes da parte usada, como restos de caules em inflorescência de camomila ou fragmentos de outras plantas, como gramíneas e ervas daninhas, bem como materiais de origem mineral como areia ou terra, mesmo quando cultivadas e tratadas adequadamente.

Desde que não se caracterize falsificação ou adulteração, estes materiais são considerados como impurezas (HARTKE, 1986).

Tabela 2 – Matérias estranhas detectadas nas drogas vegetais provenientes dos fornecedores A, B e C: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth).

Fornecedor	Alcachofra	Camomila	Ginko	Guaraná
A	#	gramíneas	material de origem orgânica (caule)	Ausência
B	caule, brácteas, material mineral (pedra)	material mineral (pedra)	#	Ausência
C	Material mineral (pedra)	Ausência	Ausência	Ausência

#Não analisado no trabalho

Os resultados das análises macroscópicas revelaram que nas amostras das drogas obtidas do fornecedor C (alcachofra, camomila, ginko) não foram detectados a presença de materiais estranhos minerais ou vegetais em contrapartida a alcachofra e camomila do fornecedor B apresentaram contaminação de origem mineral (pequenas pedras). Em contraste, a única droga que apresentou como resultado ausência de elemento estranho foi o guaraná para os três fornecedores, fato certamente decorrente do processo de coleta do guaraná, citado a seguir. A coleta deve ser manual, colhendo somente os frutos maduros (abertos) de dois em

dois dias ou o cacho todo, com o auxílio de uma tesoura de poda. Após a coleta os frutos são amontoados num galpão bem ventilado por dois a três dias para uma leve fermentação. Em seguida é retirada a polpa dos frutos manualmente ou por meio de despoldadores, sendo estes lavados e secos. Existem dois processos de secagem: os frutos são torrados em fornos de barro ou metálico com fogo brando durante quatro a cinco horas ou secos diretamente ao sol, em lonas de plásticos, terreiros de café ou secadores de cacau, de modo que as sementes fiquem com 10 a 12% de umidade, até “ponto de estalar” (EMBRAPA RONDÔNIA, dez. 2005).

Exemplares de camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), apresentam altura de 15 cm até cerca de 60 cm. Na sua colheita manual é comum a incorporação de terra, pedrisco por sua proximidade do solo. Este resultado foi confirmado na análise macroscópica da droga vegetal do fornecedor B. A presença de gramíneas misturadas às inflorescências de camomila foi identificada nas amostras do fornecedor A.

A ausência de materiais estranhos para as amostras três drogas vegetais do fornecedor C (camomila, ginko e guaraná) pode ser atribuída à implementação de boas práticas agrícolas no cultivo, coleta, secagem e armazenamento.

A árvore de ginko (*Ginkgo biloba* L.) tem altura aproximadamente de quarenta metros. Seu sistema de colheita é manual através da poda dos galhos com tesouras (GREENFIELD; DAVIS, 2004). Esse processo de colheita favorece a presença de fragmentos de caule sobre as folhas, o que explica ter sido este material estranho encontrado no ginko do lote fornecido pelo fornecedor A.

5.3 Avaliação microbiológica

A enumeração dos contaminantes presentes nas drogas vegetais foi precedida de validação da técnica.

A validação da metodologia da contagem de microrganismos seguiu os padrões farmacopeicos com o objetivo de detectar possíveis substâncias de origem vegetal interferentes no desenvolvimento e detecção da biocarga nas drogas vegetais. Foi realizada a validação empregando-se o 1mL de suspensão padronizada de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com $1,3 \times 10^2$ UFC/mL juntamente com 1mL de cada diluição das drogas vegetais. Entretanto face à elevada contagem microbiana detectada em todas as drogas vegetais, adotou-se a esterilização prévia, por processo de calor úmido a 121°C por 30 minutos. O critério de escolha deste microrganismo para a validação de contagem em decorrência por ser empregado como indicador biológico de processo plasma.

Os resultados obtidos desta metodologia estão apresentados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3 - Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, referente à alcachofra (*Cynara scolymus* L.) proveniente do fornecedor B, esterilizada por calor úmido a 121°C.

Microrganismo	Suspensão Padronizada*	Recuperação %		
		10 ⁻¹	Diluição da amostra 10 ⁻²	10 ⁻³
<i>Bacillus subtilis</i>	1,3 x10 ²	97	93	92

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

Tabela 4 – Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, referente à alcachofra (*Cynara scolymus* L.) proveniente do fornecedor C, esterilizada por calor úmido a 121°C.

Microrganismo	Suspensão Padronizada*	Recuperação %		
		10 ⁻¹	Diluição da amostra 10 ⁻²	10 ⁻³
<i>Bacillus subtilis</i>	1,3 x10 ²	92	88	91

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

Tabela 5 – Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, referente ao ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) proveniente do fornecedor A, esterilizada por calor úmido a 121°C.

Microrganismo	Suspensão Padronizada*	Recuperação %		
		10 ⁻¹	Diluição da amostra 10 ⁻²	10 ⁻³
<i>Bacillus subtilis</i>	1,3 x10 ²	95	91	94

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

Tabela 6 – Validação da metodologia de contagem microbiana com suspensão padronizada de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, referente ao ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) proveniente do fornecedor C, esterilizada por calor úmido a 121°C.

Microrganismo	Suspensão Padronizada*	Recuperação %		
		Diluição da amostra		
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
<i>Bacillus subtilis</i>	1,3 x10 ²	96	98	99

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

As espécies vegetais alcachofra e ginkgo apresentaram porcentagens de recuperação microbiana entre 92 e 97%, na diluição 10⁻¹, sendo entre valores superiores ao limite mínimo de 70% especificado pela Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2002). Com estes resultados verifica-se a ausência de substâncias de origem vegetal interferentes no desenvolvimento e detecção da biocarga tanto para amostras de alcachofra (fornecedores B e C) e para as amostras de ginkgo (fornecedores A e C).

Os resultados obtidos na determinação de microrganismos aeróbicos totais, fungos e enterobactérias estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9 respectivamente.

Tabela 7 – Valores médios obtidos na contagem de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade, nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) antes da submissão ao processo plasma.

Droga vegetal	Fornecedor		
	A	B	C
Alcachofra	#	1,1x10 ⁵	1,3x10 ⁶
Camomila	1,8x10 ⁶	4,5x10 ⁶	6,6x10 ⁶
Ginco	1,2x10 ⁵	#	1,4x10 ⁴
Guaraná	3,5x10 ⁵	2,7x10 ⁶	7,6x10 ⁵

(#) Não Realizado

Conforme evidenciado, na Tabela 7, os níveis de contaminação por microrganismos aeróbios totais encontrados variaram entre 1,4x10⁴ UFC/g (ginco fornecedor C) e 6,6x10⁶ UFC/g (camomila fornecedor C). Para o guaraná dos três fornecedores, os resultados apresentaram maior uniformidade com carga microbiana média da ordem de 10⁵ UFC/g. Os resultados encontrados no presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Katusin-Razem *et al*, 2001 que estudaram contaminação microbiana em plantas ou suas partes utilizadas como matéria-prima para fitoterápicos, cujos valores foram 10⁴-10⁸ UFC/g para flores e folhas e níveis de contaminação 10²-10⁶ UFC/g para frutos e sementes.

Conforme evidencia-se na Tabela 8, as contagens de fungos revelaram níveis entre 10⁴ a 10⁷ UFC/g. Os dados obtidos não apresentaram uniformidade entre as diferentes drogas provenientes de distintos fornecedores, assim como para as drogas dos fornecedores B e C. A camomila apresenta um incremento logarítmico crescente partindo-se de 4,8x10⁵ a 4,0x10⁷ UFC/g.

Os resultados diferenciados entre o dois fornecedores de alcachofra pode ser atribuídos às diferentes formas de colheitas, e de manuseio, além do processo de secagem e acondicionamento. A presença de material mineral (pedra) nas amostras de alcachofra (fornecedor C) indica método colheita inadequado.

Tabela 8 – Valores médios obtidos na contagem de fungos (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade nas drogas vegetais dos três fornecedores, alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) antes da submissão ao processo plasma.

Droga vegetal	Fornecedor		
	A	B	C
Alcachofra	#	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^6$
Camomila	$4,8 \times 10^5$	$7,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^7$
Ginco	$2,2 \times 10^5$	#	$1,6 \times 10^4$
Guaraná	$2,9 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$

(#) Não disponível para aquisição.

Lutmoski e Kedzia (1980) analisaram 246 amostras de drogas vegetais e verificaram contagens de fungos e leveduras superiores a 10^2 UFC/g, em 90% das amostras. Desta forma, ao se confrontar os resultados relativos à contagem de fungos no presente trabalho verificou-se níveis entre 10^4 e 10^7 , os quais indicaram resultados próximos com os estudos de Lutmoski e Kedzia.

As drogas vegetais apresentam grande número de fungos em decorrência da microflora natural, das contaminações ambientais ou mesmo condições em que ocorrem o cultivo e a colheita de plantas medicinais assim como das condições de processos durante a secagem, armazenamento e transporte.

Os resultados obtidos na determinação de enterobactérias estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores médios de contagem de enterobactérias (UFC/g) pelo método de semeadura em profundidade nas drogas vegetais obtidas dos fornecedores A, B e C, alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) antes da submissão ao processo plasma (nas condições de venda).

Droga vegetal	Fornecedor		
	A	B	C
Alcachofra	#	2,9x10 ²	9,8x10 ⁵
Camomila	1,7x10 ⁴	2,0x10 ⁵	4,9x10 ⁶
Ginco	1,0x10 ⁴	#	4,9x10 ²
Guaraná	1,2x10 ⁴	2,3x10 ⁴	90

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

(#) A amostra não estava disponível

Conforme evidenciado na Tabela 9, os níveis de contaminação por enterobactérias encontrados variaram entre 90 UFC/g para as amostras de guaraná (fornecedor C) e 4,9x10⁶ UFC/g para as amostras de camomila (fornecedor C). Os resultados das contagens de enterobactéria obtidos foram confrontados e apontam coerência com os resultados do estudo de Katusin-Razem e colaboradores (2001), os quais após a avaliação microbiana de drogas vegetais e de produtos fitoterápicos observaram que o nível de contaminação diminui conforme a parte utilizada do vegetal e o tipo de extrato considerado. Os autores Katusin-Razem e colaboradores (2001), encontraram níveis de contaminação de 10⁴ a 10⁸ UFC/g para flores e folhas devido à superfície com maior área de contato, 10² a 10⁶ UFC/g para frutos e sementes, 10⁴ a 10⁶ UFC/g para extratos líquidos e 10² a 10⁵ UFC/g para extratos secos. O nível de bactérias da família *Enterobacteriaceae* foi superior em 23 das 26 drogas analisadas, demonstrando a má qualidade das drogas. Constatação semelhante foi verificada por Negretti (1983) que investigou a qualidade microbiana de drogas vegetais “in natura” e detectou microrganismos patogênicos mais freqüentemente em raízes, rizomas, cascas e folhas, comparando com frutos e com a planta considerada no todo.

No ginko foram obtidos os valores com dois ciclos de diferença 10^4 e 10^2 UFC/g, podendo ser resultantes das condições diferenciadas de cultivo, colheita, secagem e armazenamento. Nas sementes de guaraná os níveis dos resultados dos fornecedores A e B resultaram em valores de contagem de enterobactérias similares e para o fornecedor C a baixa contagem em relação aos dois primeiros fornecedores. Tais resultados podem ter origem no atendimento às normas de Diretrizes da OMS, de 2003, que refere-se ao controle de qualidade microbiológica da água através de uma temperatura adequada, assim como, instalações apropriadas para seu armazenamento, distribuição adequadamente protegida contra a contaminação. Outra possível fonte de contaminação evitada pelo Fornecedor C do guaraná pode ser atribuída à forma de secagem das sementes, já que segundo as diretrizes sobre boas práticas agrícolas de plantas medicinais da OMS, (2003) deve-se evitar a secagem das plantas medicinais diretamente sobre o solo. Devem ser secas em uma superfície cimentada ou concretada, forrada com uma lona para a disposição da planta medicinal, e coberta com uma tela, a fim de protegê-las contra insetos, roedores, pássaros e outras pragas de animais de granja e domésticos.

A contaminação por enterobactérias dá-se pelo solo, água, frutos, sementes, flores, árvores, animais. Existe uma substancial heterogeneidade ecológica, uma ampla extensão de hospedeiros, e elevado potencial patogênico para seres humanos, animais e plantas. Determinadas espécies de enterobactérias causam doenças diarreicas incluindo a febre tifóide e a disenteria por bacilos (KONEMANN *et al*, 2001).

Muitas espécies patogênicas oportunistas causam doenças que podem variar, abrangendo infecções bacterianas extraintestinais, infecção urinária, respiratória e infecções dérmicas (KRIEG; HOLT, 1994).

A Tabela 10 apresenta as médias das contagens de microrganismos aeróbicos totais e fungos por drogas vegetais

Tabela 10 - Comparação da carga microbiana viável média das quatro drogas vegetais analisadas: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth).

Droga Vegetal	Microrganismo Aeróbios Totais UFC/g	Fungos UFC/g
Alcachofra	$7,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$
Camomila	$4,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$
Ginco	$6,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
Guaraná	$1,3 \times 10^6$	$2,6 \times 10^5$

(*) Médias dos resultados obtidos dos dois fornecedores de Alcachofra, dos três fornecedores de Camomila, dos dois fornecedores de Ginco e três fornecedores de Guaraná.

No presente trabalho avaliaram-se diferentes órgãos vegetais, como as folhas de alcachofra e ginco, inflorescências de camomila e sementes de guaraná. Na Tabela 10 observou-se que a camomila apresentou a maior valor médio carga de contaminantes para aeróbios totais quanto para fungos em decorrência à superfície com maior área de contato e valores médios menores para carga de aeróbios totais e fungos para o ginco, respectivamente. Estes resultados foram comparados com os resultados de aeróbios totais (Tabela 7).

As amostras de camomila dos três fornecedores apresentaram contagens de aeróbios totais (Tabela 7) da ordem de 10^6 UFC/g comparando estes resultados com as especificações da OMS, nenhuma das destas drogas excedeu o valor de 10^7 UFC/g, limite especificado para materiais destinado ao preparo de infusos ou ao uso tópico. No caso de uso interno distinto, para qual o limite é 10^5 UFC/g, as amostras de alcachofra (fornecedor B e C), guaraná (fornecedores A, B e C) e ginco (fornecedor A) estariam em desacordo. Estariam aprovadas somente as amostras de ginco (fornecedor C) com limite de aeróbios totais de $1,4 \times 10^4$ UFC/g.

Em relação à contaminação fúngicas, os limites preconizados pela OMS, são de 10^4 UFC/g para drogas destinadas para ao preparo de infusos e uso tópico. e 10^3 UFC/g para uso interno. Analisando os resultados apresentados na (Tabela 8) para amostras de camomila dos três fornecedores indicam que não atenderam os parâmetros de qualidade microbiológica estabelecidos pela OMS e foram consideradas impróprias para consumo. Para outras formas de uso interno, as

amostras de alcachofra (fornecedor B e C), camomila e guaraná (fornecedores A, B e C) ginko (Fornecedor A e C) estariam reprovadas e em desacordo do limite especificado.

Segundo as Diretrizes da Farmacopeia Americana 28 edição (2005), realizou-se a pesquisa de microrganismos patogênicos, abrangendo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e bolores do tipo *Aspergillus* segundo método de pesquisa preconizados na Farmacopéia Brasileira (1988). No que se refere à pesquisa de microrganismos patogênicos específicos os resultados estão tabulados nas tabelas de 11 a 14, com as provas bioquímicas pertinentes.

Tabela 11 - Resultado das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) provenientes dos fornecedores B e C, antes da submissão ao processo plasma.

Microorganismo	Provas Bioquímicas	Resultados		
		Fornecedores B / C	Resultado % isolamento	Controle (+)
<i>Escherichia coli</i>	Meio de Ágar McConkey	(+)/(+)		(+)
	Ágar eosina azul de Metileno	(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA		(+)
	Ágar Tríplice açúcar-ferro	NA/NA	Ausência	(+)
	Teste de Indol	NA/NA	100%	(+)
	Teste de Vermelho de Metila	NA/NA		(+)
	Teste de Voges Proskauer	NA/NA		(+)
	Citrato	NA/NA		(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meio de Ágar cetrimida	(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA		(+)
	Produção de Fluoresceína	NA/NA		(+)
	Produção de Piocianina	NA/NA	Ausência	(+)
	Citocromo-oxidase	NA/NA	100%	(+)
	Crescimento a 41°C	NA/NA		(+)
<i>Salmonella sp</i>	Meio de Ágar Verde Brilhante	(-)/(-)		(+)
	Meio de Ágar Sulfito de Bismuto	(-)/(-)		(+)
	Meio de Ágar XLD	(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA	Ausência	(+)
	Ágar Tríplice açúcar-ferro	NA/NA	100%	(+)
	Lisina Descarboxilase	NA/NA		(+)
	Citrato	NA/NA		(+)
	Urease	NA/NA		(+)
	Fermentação da lactose	NA/NA		(+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meio de Ágar Vogel Johnson	(+)/(+)		(+)
	Coloração de Gram	CGP/CGP	Ausência	(+)
	Coagulase	(-)/(-)	100%	(+)
	Desoxiribonuclease	(-)/(-)		(+)

(+)Crescimento típico
 (-)Crescimento atípico

CGP - Cocos Gram positivos NA - Não aplicável

Tabela 12 - Resultado das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) provenientes de três fornecedores antes da submissão ao processo plasma.

Microorganismo	Provas Bioquímicas	Resultados		
		Fornecedores A / B / C	Resultado % isolamento	Controle (+)
<i>Escherichia coli</i>	Meio de Ágar McConkey	(+)/(+)/(+)		(+)
	Ágar eosina azul de Metileno	(-)/(+)/(+)		(+)
	Coloração de Gram	NA/BGN/NA		(+)
	Ágar Tríplice açúcar-ferro	NA/(+)/NA	Presença	(+)
	Teste de Indol	NA/(+)/NA	33,3%	(+)
	Teste de Vermelho de Metila	NA/(+)/NA		(+)
	Teste de Voges Proskauer	NA/(+)/NA		(+)
	Citrato	NA/(+)/NA		(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meio de Ágar cetrimida	(-)/(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA/NA	Ausência	(+)
	Produção de Fluoresceína	NA/NA/NA	100%	(+)
	Produção de Piocianina	NA/NA/NA		(+)
	Citocromo-oxidase	NA/NA/NA		(+)
	Crescimento a 41°C	NA/NA/NA		(+)
<i>Salmonella sp</i>	Meio Ágar Verde Brilhante	(-)/(-)/(-)		(+)
	Meio Ágar Sulfito Bismuto	(-)/(-)/(-)		(+)
	Meio de Ágar XLD	(-)/(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA/NA	Ausência	(+)
	Ágar Tríplice açúcar-ferro	NA/NA/NA	100%	(+)
	Lisina Descarboxilase	NA/NA/NA		(+)
	Citrato	NA/NA/NA		(+)
	Urease	NA/NA/NA		(+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fermentação da lactose	NA/NA/NA		(+)
	Meio de Ágar Vogel Johnson	(+)/(+)/(+)		(+)
	Coloração de Gram	CGP/CGP/CGP	Ausência	(+)
	Coagulase	(-)/(-)/(-)	100%	(+)
	Desoxiribonuclease	(-)/(-)/(-)		(+)

(+)Crescimento típico
 (-)Crescimento atípico

BGN - Bacilo Gram negativo NA - Não aplicável
 CGP - Coco Gram positivo

Tabela 13 - Resultado das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) provenientes dos fornecedores A e C, antes da submissão ao processo plasma.

Microrganismo	Provas Bioquímicas	Resultados		
		Fornecedores A / C	Resultado % isolamento	Controle (+)
<i>Escherichia coli</i>	Meio de Ágar McConkey	(+)/(+)		(+)
	Ágar eosina azul de Metileno	(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA		(+)
	Ágar Tríplice açúcar-ferro	NA/NA	Ausência	(+)
	Teste de Indol	NA/NA	100 %	(+)
	Teste de Vermelho de Metila	NA/NA		(+)
	Teste de Voges Proskauer	NA/NA		(+)
	Citrato	NA/NA		(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meio de Ágar cetrimida	(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA		(+)
	Produção de Fluoresceína	NA/NA	Ausência	(+)
	Produção de Piocianina	NA/NA	100%	(+)
	Citocromo-oxidase	NA/NA		(+)
	Crescimento a 41°C	NA/NA		(+)
<i>Salmonella sp</i>	Meio de Ágar Verde Brilhante	(-)/(-)		(+)
	Meio de Ágar Sulfito de Bismuto	(-)/(-)		(+)
	Meio de Ágar XLD	(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA	Ausência	(+)
	Ágar Tríplice açúcar-ferro	NA/NA	100%	(+)
	Lisina Descarboxilase	NA/NA		(+)
	Citrato	NA/NA		(+)
	Urease	NA/NA		(+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fermentação da lactose	NA/NA		(+)
	Meio de Ágar Vogel Johnson	(+)/(+)		(+)
	Coloração de Gram	CGP/CGP	Ausência	(+)
	Coagulase	(-)/(-)	100%	(+)
	Desoxiribonuclease	(-)/(-)		(+)

(+)Crescimento típico
 (-)Crescimento atípico

BGN - Bacilo Gram negativo NA - Não aplicável
 CGP - Coco Gram positivo

Tabela 14 - Resultado das provas bioquímicas para identificação de contaminantes microbianos isolados das amostras de guaraná (*Paullinia. cupana* Kunth) provenientes dos fornecedores A, B e C, antes da submissão ao processo plasma.

Microrganismo	Provas Bioquímicas	Resultados		
		Fornecedores A / B / C	Resultado % isolamento	Controle (+)
<i>Escherichia coli</i>	Meio de Ágar McConkey	(+)/(+)/(-)		(+)
	Ágar eosina azul de Metileno	(-)/(+)/NA		(+)
	Coloração de Gram	NA/(+)/NA		(+)
	Ágar Triplice açúcar-ferro	NA/(+)/NA	Presença	(+)
	Teste de Indol	NA/(+)/NA	33,3%	(+)
	Teste de Vermelho de Metila	NA/(+)/NA		(+)
	Teste de Voges Proskauer	NA/(+)/NA		(+)
	Citrato	NA/(+)/NA		(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meio de Ágar cetrimida	(-)/(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA/NA		(+)
	Produção de Fluoresceína	NA/NA/NA	Ausência	(+)
	Produção de Piocianina	NA/NA/NA	100%	(+)
	Citocromo-oxidase	NA/NA/NA		(+)
	Crescimento a 41°C	NA/NA/NA		(+)
<i>Salmonella sp</i>	Meio de Ágar Verde Brilhante	(-)/(-)/(-)		(+)
	Meio de Ágar Sulfito de Bismuto	(-)/(-)/(-)		(+)
	Meio de Ágar XLD	(-)/(-)/(-)		(+)
	Coloração de Gram	NA/NA/NA	Ausência	(+)
	Ágar Triplice açúcar-ferro	NA/NA/NA	100%	(+)
	Lisina Descarboxilase	NA/NA/NA		(+)
	Citrato	NA/NA/NA		(+)
	Urease	NA/NA/NA		(+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fermentação da lactose	NA/NA/NA		(+)
	Meio de Ágar Vogel Johnson	(+)/(+)/(+)		(+)
	Coloração de Gram	CGP/CGP/CGP	Ausência	(+)
	Coagulase	(-)/(-)/(-)	100%	(+)
	Desoxiribonuclease	(-)/(-)/(-)		(+)

(+)Crescimento típico
 (-)Crescimento atípico

BGN - Bacilos Gram negativo
 CGP - Cocos Gram positivo

NA - Não aplicável

Os microrganismos patogênicos que apresentaram resultados característicos na identificação presuntiva e que foram confirmados na identificação empregando Sistema Vitek® estão relacionados na Tabela 15.

Tabela 15 - Identificação dos microrganismos isolados da alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) provenientes dos três fornecedores.

Droga Vegetal	Fornecedor	Identificação Presuntiva	Identificação empregando Sistema Vitek®	
Alcachofra	B	—	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Alcachofra	C	—	<i>Enterobacter cloacae</i>	—
Camomila	A	—	<i>Klebsiella</i> spp	—
Camomila	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Camomila	C	—	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterococcus</i> spp
Ginco	A	—	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Ginco	C	—	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Guaraná	A	—	<i>Klebsiella</i> spp	—
Guaraná	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Guaraná	C	—	—	—

Os microrganismos *E. aerogenes* e *E. cloacae* são as espécies mais comumente isoladas de amostras biológicas. Encontram-se amplamente distribuídas na água, esgoto, solo e vegetais e também fazem parte da microbiota entérica comensal, e acredita-se que não causem diarreia, embora tenha sido isolada uma cepa de *E. cloacae* produtora de toxina similar à de *Shigella* a partir de fezes de um lactente com síndrome urêmica hemolítica (PATON; PATON, 1996). Também estão associados às infecções oportunistas que afetam as vias urinárias, o trato respiratório, as feridas cutâneas, e podem causar septicemia e meningite (KONEMANN *et al.*, 2001).

A alcachofra do fornecedor B além da presença da *Enterobacter cloacae* também apresentou cepas das espécies *Enterobacter asburiae*.

As infecções por *Enterobacter* spp podem ser adquiridas por fontes endógenas e exógenas. Várias espécies podem ser encontradas nas fezes de humanos e animais, na água, plantas e insetos. A maioria das infecções nosocomiais por *Enterobacter* spp, parece surgir de sítios endógenos previamente colonizados do paciente. Colonização do trato gastrointestinal e de outros sítios do organismo com *Enterobacter* spp, ocorre freqüentemente nos pacientes seriamente acometidos, especialmente aqueles com terapia antimicrobiana prévia. Portanto, debilidade severa associada aos efeitos supressivos dos antibióticos na microbiota, proporciona uma excelente oportunidade para a colonização por *Enterobacter* spp. Esta colonização geralmente precede a infecção no organismo. Outro fator que contribui para ocorrerem infecções nosocomiais por *Enterobacter* spp, encontra-se nos mecanismos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos. A produção de β -lactamases é o mecanismo mais prevalente e importante, sendo esta resistência natural aos agentes encontrada nos isolados de *E. taylorae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. asburiae* e algumas cepas de *E sakazakii* (NORMARK, 1995; PARK, 1995).

Desta forma torna-se de vital importância à eliminação dos microrganismos contaminantes clinicamente significativos, e dentre eles encontram-se *Enterobacter cloacae* presentes na alcachofra do fornecedor B e C e ginko do fornecedor A, encontram-se presente à bactéria *Enterobacter sakazakii* nas amostras de ginko do fornecedor C.

A bactéria *Enterobacter cancerogenus*, previamente denominada *Erwinia cancerogena*, *Enterobacter taylorae* e CDC grupo Entérico 19 (FARMER *et al.*, 1985)

e (SCHONHEYDER; JENSEN; FREDERIKSEN, 1994) foi relatada como a causa de diversas infecções clínicas, dentre elas infecção de feridas (REINA; ALOMAR, 1989), infecção urinária (REINA *et al.*, 1989) e (RUBINSTEIN *et al.*, 1993), bacteremia e pneumonia (RUBINSTEIN *et al.*, 1993).

Outra bactéria encontrada na amostra de camomila do fornecedor C foi o *Enterococcus* spp. As espécies de *Enterococcus* estão amplamente distribuídos na natureza, encontradas no solo, água, alimentos, plantas e animais incluindo os mamíferos, pássaros e insetos (BLAIMONT; WAUTERS, 1995) e (DEVRIESE, COLLINS, 1992). Nos humanos e em outros animais habitam no trato gastrointestinal, e em menor proporção no trato genitourinário, e na cavidade oral (MURRAY *et al.*, 2003).

Os enterococos são habitantes da microbiota do trato digestivo humano e de outros animais, apresentando baixa patogenicidade. No entanto, são causa de infecções urinárias e intra-abdominais, endocardite e sepse, comportando-se, muitas vezes, como um agente oportunista em infecções hospitalares. Os enterococos podem ser causa de pelo menos 10% das infecções hospitalares. As principais espécies causadoras de infecção no homem são o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium*, que apresentam resistência natural a diversos antimicrobianos, incluindo aztreonam, co-trimoxazol, clindamicina, cefalosporinas (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998). Os enterococos adquiriram resistência elevada a outros antimicrobianos por mutação ou transferência de plasmídeos (FRENCH, 1998). Especial preocupação reside no uso de drogas vegetais contaminadas com este microrganismo, podendo causar comprometimento da saúde de usuários principalmente em pacientes imunossuprimidos.

O *Enterobacter sakazakii* é um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* encontrada no intestino humano e de animais e no meio ambiente. Em fontes ambientais é largamente encontrada em alimentos, incluído os queijos, carne, vegetais, grãos, ervas e especiarias e ainda encontram-se em leite de soja processado industrialmente para alimentação de lactentes (IVERSEN, FORSYTHE, 2003; LECLERCQ, WANEGUE, BAYLAC, 2002; SKLADAL *et al.*, 1993). Este microrganismo adere em equipamentos utilizados no processamento industrial do leite de soja em decorrência da formação de biofilme que associado a sua alta resistência celular ao stress osmótico propicia maior resistência ambiental e colonização nestes equipamentos (LEHNER, STEPHAN, 2004).

Este microrganismo é considerado patogênico oportunista e tem sido associado a vários casos infecções graves como meningite e enterites necrosante (necrotizing enteritis) particularmente em bebês prematuros (LEHNER, STEPHAN, 2004).

Torna-se preocupante a presença do *Enterobacter sakazakii* no ginko do fornecedor C, sendo necessário a descontaminação desta droga evitando assim a ocorrência de infecções graves aos seus usuários e assim assegurando a qualidade do fitoterápico derivado desta droga vegetal.

As principais fontes de contaminação por *Klebsiella pneumoniae* incluem fontes ambientais provenientes de resíduos líquidos industriais, águas fluviais, sementes de plantio, vegetais, madeiras, cana de açúcar, no processamento e refinamento de açúcar e por fim nas águas industriais utilizadas para o processamento da polpa de celulose em indústria de papel (CAPLENAS; KANAREK, DUFOUR, 1981; NAEMURA, SEIDLER, 1978; SEIDLER; KNITIEL; BROWN, 1975). Esta bactéria promove infecções nosocomiais do trato genito-urinário, respiratória e septicemia em pacientes submetidos a processo cirúrgico (SEIDLER; KNITIEL e BROWN, 1975). Verifica-se a necessidade de metodologia descontaminante ser aplicadas para as drogas em estudo evitando-se contaminação deste microrganismo em matérias-primas destinadas a fitoterápicos de uso interno.

A droga vegetal mais contaminada foi à camomila do fornecedor C encontrando-se maior população de aeróbios totais $6,6 \times 10^6$ UfC/g, maiores teores de fungos $4,0 \times 10^7$ UFC/g e maiores teores de enterobactérias $4,9 \times 10^6$ UfC/g, atribuídos apenas a cepas ambientais presentes no campo de cultivo, entretanto não detectou-se a presença de *E. coli.*, mas a presença de *Enterobacter* spp. Resultados semelhantes foram encontrados para a camomila do fornecedor B, em que evidenciou-se teores de aeróbios totais de $4,5 \times 10^6$ UFC/g, teores de fungos $7,9 \times 10^6$ UFC/g e teores de enterobactérias $2,0 \times 10^5$ UFC/g próximo ao valor encontrado de enterobactérias da camomila C, assim como foi detectada a presença de *E.coli.* e *Enterobacter* spp. Pode-se inferir que a camomila do fornecedor B apresenta pior qualidade microbiológica dentre as demais drogas estudadas. Embora o ginko do fornecedor C apresentou menor teor de contagens microbianas e fungicas do que as demais drogas vegetais, foi detectada a presença do gênero *Enterobacter* spp. Resultados semelhantes para o ginko do fornecedor A, os valores obtidos encontram-se de acordo com os limites microbianos da Organização Mundial

de Saúde, mas em contrapartida apresentam indicadores de maior risco para via de administração oral devido à presença de *Enterobacter* spp. Também a Farmacopéia Brasileira (1988) estabelece a ausência de contaminantes microbiológicos *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As amostras de alcachofra obtidas dos fornecedores A e C, assim como os três lotes de guaraná e da camomila não atendem, portanto aos parâmetros recomendados pela OMS e às especificações da Farmacopéia Brasileira (1988) para planta medicinal destinada para uso interno. O guaraná do fornecedor C apresentou melhor qualidade microbiológica nos quesitos de indicadores de patogênicos e limites quantitativos de microrganismos.

As análises destas drogas quanto à pesquisa de bolores, assim como a identificações de espécies estão relacionadas na tabela 16.

Tabela 16 – Identificação de isolados fúngicos detectados nas drogas vegetais alcachofra (*Cynara scolymus* L.), camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) previamente ao processo plasma.

Droga Vegetal	Fornecedor	Resultados	
		Gênero <i>Aspergillus</i>	Outros fungos isolados
Alcachofra	B	—	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	C	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.
Camomila	A	<i>Aspergillus niger</i>	—
	B	<i>Aspergillus niger</i>	—
	C	<i>Aspergillus flavus</i>	—
Ginco	A	<i>Aspergillus niger</i>	—
	C	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i>	—
Guaraná	A	<i>Aspergillus niger</i>	—
	B	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	C	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Phoma</i>

Os bolores, do gênero *Aspergillus* foram detectados em 90% das amostras, e a maior frequência foi da espécie *Aspergillus niger* (77,0%) seguida de (22,0%) de *Aspergillus flavus*.

As especificações farmacopeicas estabelecem a pesquisa das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, devido a possível presença de

aflatoxinas. Verificou-se nas amostras a presença de outros gêneros e espécies fungicas conhecidas por sua capacidade em produzir micotoxinas, como *Aspergillus niger* e outros *Aspergillus spp* detectados em 77,0% e 90%, das espécies vegetais, além de *Penicillium chrysogenum*, *Phoma*, *Alternaria spp.*, em 20,0%, 10,0%, 10,0% das espécies vegetais.

Verificou-se que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram maior frequência, semelhança de resultados obtidos por Abou-Arab *et al.* (1999), Aziz *et al.* (1998), El-Kady *et al.* (1992), que avaliaram amostras de drogas e fitoterápicos disponíveis no Egito, Chourasia (1995), na Índia, Efuntoye (1996), na Nigéria, Elshafie *et al.* (1999, 2002), no Sultanato de Oman, Garrido *et al.* (1992), na Espanha, Halt (1998), na Croácia, Lutmoski e Kedzia (1980), na Polônia, Mandeel (2005), em Bahrain, Martins *et al.* (2001) em Portugal, Rizzo *et al.* (2004) na Argentina e Santos *et al.* (1995), no Brasil.

Outras espécies fúngicas produtoras de toxinas pertencem aos gêneros *Phoma* e *Alternaria* (TRABULSI *et al.*, 2002).

No presente trabalho, não foi investigada a presença de aflotoxinas mesmo nas amostras mais contaminadas por bolores, entretanto os elevados teores de fungos indicam condições inadequadas de conservação e estocagem das drogas vegetais analisadas.

5.4 Validação da eficácia descontaminante do plasma

Anteriormente, ao estudo propriamente dito procedeu-se à validação do processo para conhecer sua eficácia.

O processo de descontaminação por plasma deve ser monitorado quanto aos parâmetros físicos, visando à otimização do processo, a fim de preservar a integridade química dos princípios ativos das drogas vegetais estudadas.

No presente trabalho, adotou-se a validação do processo com o microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para a alcachofra e ginko do fornecedor C, conforme evidenciado nas Tabelas 17, 18, 19 e 20, assim como Figuras 2, 3, 4 e 5.

Tabela 17 – Valores médios obtidos na contagem de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma O₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm), para amostra de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor C).

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	1,1x10 ⁵	5
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	3,4x10 ⁴	10
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	2,6x10 ⁴	20
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	7,5x10 ³	30

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

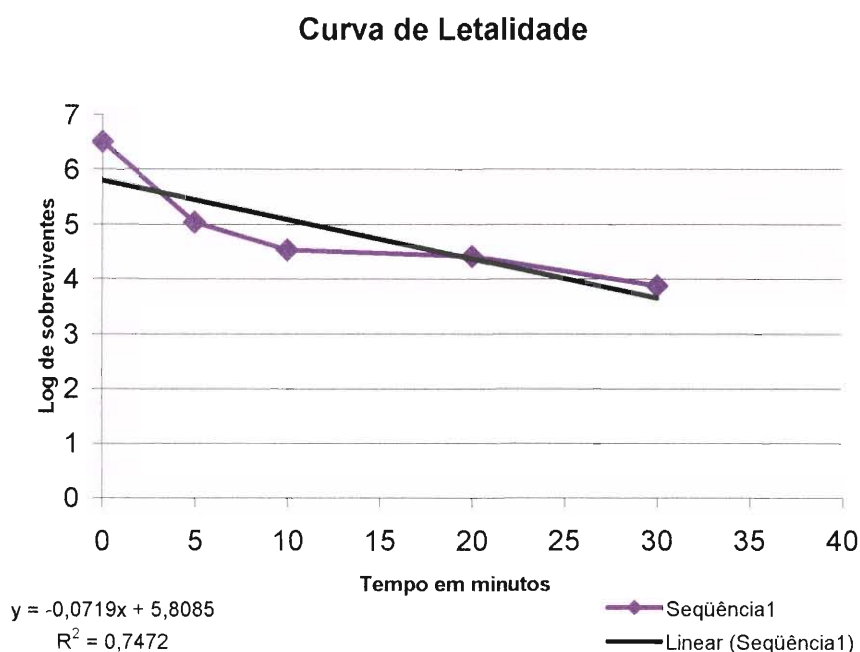


Figura 2 - Curva de letalidade de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma O₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm) em amostras de 10g de alcachofra (fornecedor C).

Tabela 18 - Valores médios obtidos na contagem de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma O₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm) para amostras de 10g de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor C).

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Ginco	C	2,9x10 ⁶	1,1x10 ⁵	5
Ginco	C	2,9x10 ⁶	6,6x10 ⁴	10
Ginco	C	2,9x10 ⁶	4,8x10 ⁴	20
Ginco	C	2,9x10 ⁶	1,4x10 ⁴	30

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

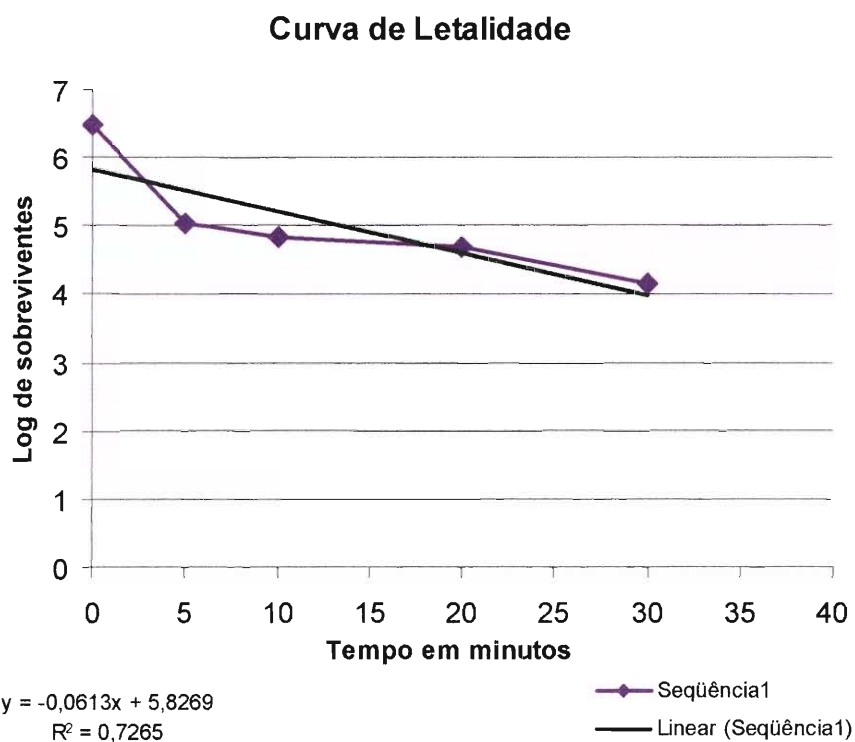


Figura 3 - Curva de letalidade de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma O₂ (100%), (potência de 150 W, pressão 100

mTorr e vazão 200 sccm), em amostras de 10g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor C).

A validação do processo O₂ (100%) da alcachofra do fornecedor C, e do ginko do fornecedor C, conforme as Tabelas 18 e 19 evidenciaram uma diferença na redução das cargas microbianas. Analisando o tempo de 30 minutos, observou-se que a alcachofra C apresentou redução de 3 ciclos logaritmos em contrapartida observou-se a redução de 2 ciclos logaritmos para o ginko C no mesmo tempo de exposição. Subentende-se que a propriedade reológicas do pó da alcachofra (fornecedor C) permite maior difusão gasosa durante o processo plasma em contrapartida menor difusão gasosa para o pó do ginko. Os resultados das duas validações apresentaram conformidade com os resultados obtidos por Gadri e colaboradores (2000), os quais constataram que o meio suporte propiciou curvas de letalidade diferenciadas tendo sido possível observar esta diferenciação de letalidade entre as alcachofra (fornecedor C) e o ginko (fornecedor C).

Em técnicas mais usuais de esterilização a plasma a eficácia germicida está diretamente relacionada à espécie de microrganismo. Esporos são mais resistentes do que bactérias vegetativas. O meio suporte influenciou a curva de letalidade ocorrendo menor inativação de microrganismo em agar do que em suporte de polipropileno (GADRI *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos na contagem de *Bacillus subtilis var niger* ATCC 6633 na validação do processo plasma peróxido de hidrogênio (20%) e oxigênio (80%) estão apresentados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19 - Valores médios obtidos na contagem de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma H₂O₂ (20%) e O₂ (80%), (potência de 150 W, pressão 100mTorr e vazão 200 sccm), para amostras de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor C).

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/g)		
		Antes do processo plasma H ₂ O ₂	Após o processo plasma H ₂ O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	1,5x10 ⁵	5
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	4,2x10 ⁴	10
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	3,3x10 ⁴	20
Alcachofra	C	3,2x10 ⁶	1,3x10 ³	30

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

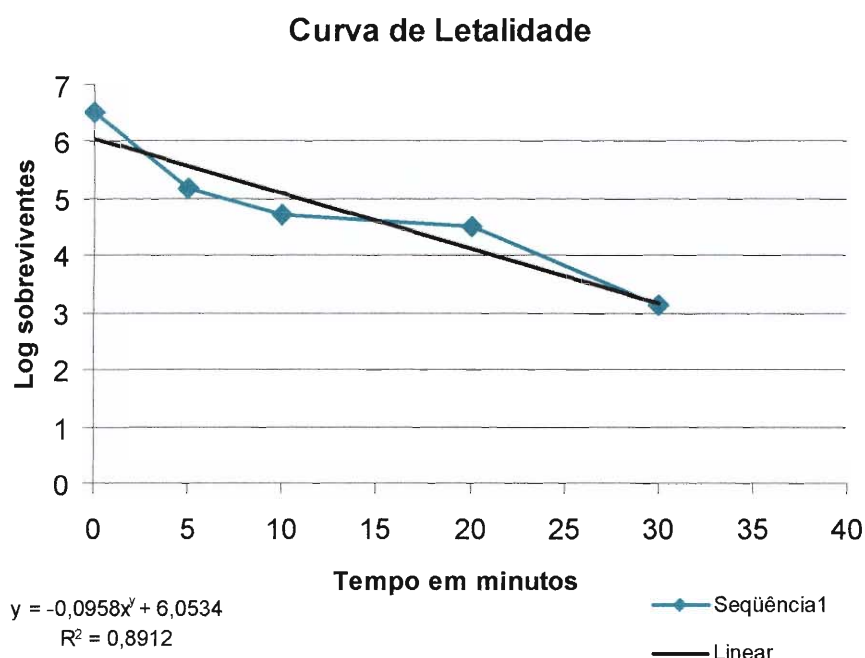


Figura 4 - Curva de letalidade de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma H₂O₂ (20%) e O₂ (80%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm), em amostras de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor C).

A biocarga inicial de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi de $3,2 \times 10^6$ UFC/g para a alcachofra, que apresentou redução 3 ciclos logarítmicos durante o processo plasma em 30 minutos e atingiu a contagem de $1,3 \times 10^3$ UFC/g. Valor da mesma ordem de grandeza da contagem de $3,1 \times 10^3$ UFC/g do ginko submetido ao mesmo processo, indicando difusão gasosa homogênea desta mistura gasosa sobre as duas drogas estudadas assim como resultados semelhantes de descontaminação foram atribuídos à mesma espécie de microrganismo em concentração de inóculo padronizada de mesma ordem e por fim as mesmas espécies reativas e radicais livres gerados nos dois processos.

Tabela 20 - Valores médios obtidos na contagem bacteriana de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (UFC/g) durante validação do processo plasma H₂O₂ (20%) e O₂ (80%), (potência de 150 W, pressão 100mTorr e vazão 200 sccm), para amostras de 10g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor C).

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/g)		
		Antes do processo plasma H ₂ O ₂	Após o processo plasma H ₂ O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Ginco	C	$2,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	5
Ginco	C	$2,9 \times 10^6$	$8,5 \times 10^4$	10
Ginco	C	$2,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$	20
Ginco	C	$2,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^3$	30

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

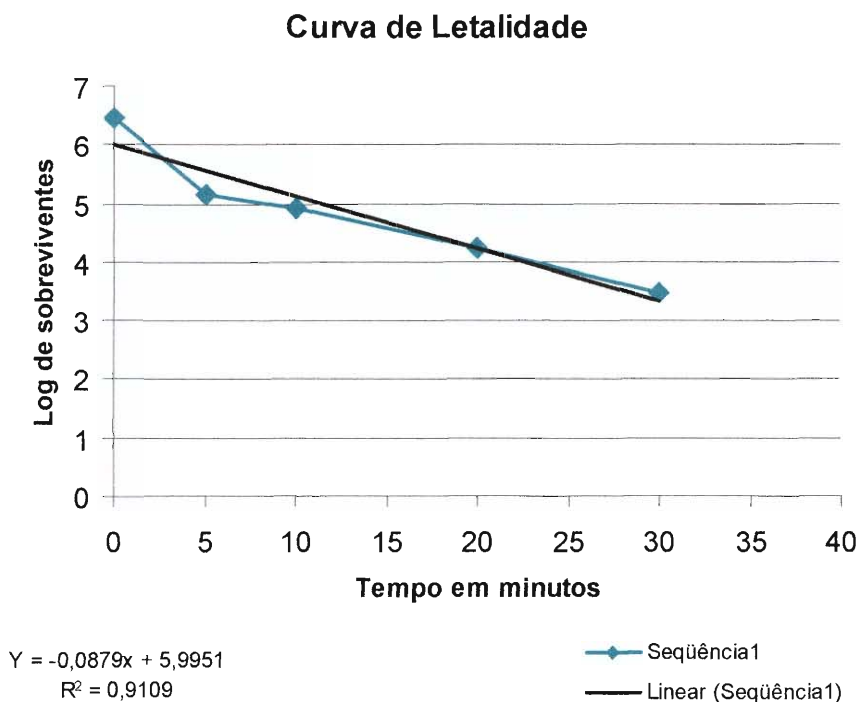


Figura 5 - Curva de letalidade de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em função do tempo de exposição ao processo plasma H₂O₂ (20%) e O₂ (80%), (potência de 150 W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm) em amostras de 10g de ginkgo (fornecedor C).

Os resultados da curva de letalidade na Figura 5 indicaram a redução de 3 ciclos no período de 30 minutos, possivelmente em decorrência da maior densidade de elétrons e radicais hidroxilas. Estas espécies muito reativas são geradas no plasma de peróxido de hidrogênio 20%.

Os autores Deng *et al* (2005) trabalharam com esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inoculados sobre membranas Whatman® de policarbonato processadas em plasma de descarga elétrica localizada sob pressão atmosférica (APGD). Concluíram que altas concentrações de microrganismos, acima de 10⁶ UFC/ml, propiciam barreira física diminuindo a inativação do microrganismo no mesmo intervalo de tempo de exposição do plasma. Os resultados deste estudo permitem visualizar semelhanças na inativação do *Bacillus subtilis* partindo-se de uma biocarga inicial de 3,2 x 10⁶ UFC/g para a alcachofra, e de 2,9 x 10⁶ UFC/g para o ginkgo submetidos aos processos de validação por plasma O₂ (100%) e plasma H₂O₂ (20%) e O₂ (80%) nas condições experimentais empregadas (validação do método). Pode-se inferir que as condições experimentais do plasma de peróxido de hidrogênio para as duas drogas adotam suportes semelhantes sendo que alcachofra e ginkgo apresentam estruturas de suporte de natureza celulósica ambas

drogas contendo o microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. A menor inativação microbiana para ambas drogas no início do processo para o tempo de exposição de 10 minutos muito provavelmente relacionada à concentração inicial dos esporos da ordem de 10^6 UFC/g e o suporte onde os microrganismos foram inoculados neste estudo foram empregados folhas de alcachofra (fornecedor C) e folhas de ginkgo (fornecedor C)

5.5 Análise da eficácia do processo por plasma sobre a contaminação natural

MUDGETT (1982) estudou o processo e aquecimento gerado por energia eletromagnética *microwave* na frequência de microondas na ordem de 100 Mhz – 10 Ghz. A penetração do campo e do subcampo energético no processo plasma de microondas está relacionada com as propriedades térmicas, sua estrutura química, e a porosidade do produto alimentício. Alguns alimentos sólidos não são homogêneos, como os alimentos gordurosos diminuindo a difusibilidade térmica deste processo propiciando menor aquecimento do alimento e conseqüentemente diminuindo a eficácia de descontaminação microbiana. Os resultados obtidos no processo plasma corroboram com os do estudo de MUDGETT.

Baseado nos resultados de resultados de MUDGETT, um fator relevante que pode ter ocasionado a baixa difusão gasosa de ambos processos plasma foi a presença de substâncias químicas complexas da camomila que contém óleo volátil, flavonóides, aminoácidos, ácidos graxos, sais minerais, cumarinas, mucilagens e ácidos orgânicos (TESKE; TRENTINI, 1997).

A mucilagem retém água, levando a uma ação emoliente e protetora de peles secas e delicadas, pela formação de uma película sobre a pele. Estes complexos, em condições ideais de pH e forças iônica, fixam-se as fibras queratínicas, revestindo-as sem penetrar no núcleo das células. A citação relatada acima muito provavelmente interfere na ação do processo plasma na descontaminação desta droga não eficaz da camomila em testes preliminares efetuados para determinação dos parâmetros de potência e tempo de exposição.

O capítulo floral da camomila possui estruturas formadas pelo receptáculo floral, brácteas involucrais e o pedúnculo. As brácteas involucrais contêm um feixe vascular, acompanhado em ambos os lados por duas lâminas esclerosas

lignificadas. O pedúnculo foral apresenta natureza caulinar e que promove a função mecânica de sustentação compostos por elementos lignificados (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). Possivelmente a presença de estruturas intensamente lignificadas destes três elementos do capítulo floral interferiram sobre a ação do plasma como agente descontaminante.

Também para o guaraná não foi possível observar redução significativa da biocarga presente. Assim, tanto camomila quanto guaraná, com biocargas iniciais respectivamente de $6,6 \times 10^6$ UFC/g e $2,7 \times 10^6$ UFC/g, mantiveram níveis de contaminação da mesma ordem de grandeza, após os desafios com plasma.

O tegumento do guaraná apresenta debaixo da epiderme numerosas células pétreas de paredes espessas intensamente lignificadas que podem ter contribuído para este resultado (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

Os grãos de amido do guaraná podem apresentar isolados ou reunidos em grupos de até três elementos. São arredondados, cupuliformes ou em forma de capacete providos de hilo central (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). A semente de guaraná apresenta cerca de 60% de amido (SIMÕES, 2004) e para ambos processos plasma não foram efetivos na redução da sua biocarga contaminante.

Estudos quanto aos efeitos de diferentes tipos de plasma sobre o amido de batata (*Solanum tuberosum* L.), levam ao entendimento geral de que entidades ionizadas do plasma não são reativas com relação aos amidos. Apenas alterações químicas tênues causadas pela reação com as entidades do plasma foram observadas nos amidos expostos. Estas alterações manifestam-se como reduções no pH de amidos expostos ao plasma de oxigênio, mas não são confirmadas sob avaliação de IR, que não evidenciam alterações espectrais. O caráter químico do plasma exerce pequeno efeito nas alterações dos polissacarídeos do amido. Os resultados das exposições dos amidos a vários plasmas podem contribuir para o conhecimento da estrutura do interior dos grânulos de amido. É perceptível o aumento da cristalinidade que pode ocorrer em certos casos em decorrência da ação do plasma, que ocorre em certa extensão no interior do grânulo de amido, e que sinaliza o aumento do conteúdo de polissacarídeos menos ramificados, resultante da quebra de cadeias da amilase. Estes polissacarídeos bem como os fragmentos das quebras podem se organizar em domínios mais cristalinos. Plasmas particulares decompõem diferentemente as três frações das macromoléculas do amido, o que pode ser útil na caracterização de sua estrutura no interior do grânulo

de amido. Devido ao revestimento do grânulo, que consiste da amilopectina altamente polimerizada, o efeito toma relevância. Não se pode, entretanto concluir pela ação do amido como bloqueio à ação do plasma, permanecendo este particular como assunto a ser melhor estudado (LII *et al.*, 2002).

Trabalhos experimentais publicados quanto ao efeito germicida sob ação de pressão atmosférica do plasma têm mostrado, que a curva de sobreviventes em função do tempo apresenta diferentes comportamentos, podendo interferir neste resultado o microrganismo e tempo de exposição do processo plasma (LAROUSSE; LEIPOD, 2004).

Nos testes preliminares de exposição ao plasma O₂, obteve-se resultados diferenciados na descontaminação da droga vegetal alcachofra dos fornecedores B e C.

Conforme evidenciado na Tabela 21, a população bacteriana da alcachofra (fornecedor B), submetida ao processo de descontaminação por do plasma O₂ (100%) (potência de 150 W , pressão de 100 mTorr são de vazão de 200 sccm), sofreu redução de dez vezes, independente do tempo do processo. Possivelmente este resultado, que aparenta inconsistente, decorre de ação apenas superficial do plasma frente a determinadas barreiras.

Tabela 21 – Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 45g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor B) antes e após processo plasma O₂.

Droga Vegetal Massa de 45 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	B	1,1x10 ⁵	2,6x10 ⁴	10
Alcachofra	B	1,1x10 ⁵	2,9x10 ⁴	20
Alcachofra	B	1,1x10 ⁵	4,1x10 ⁴	30

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

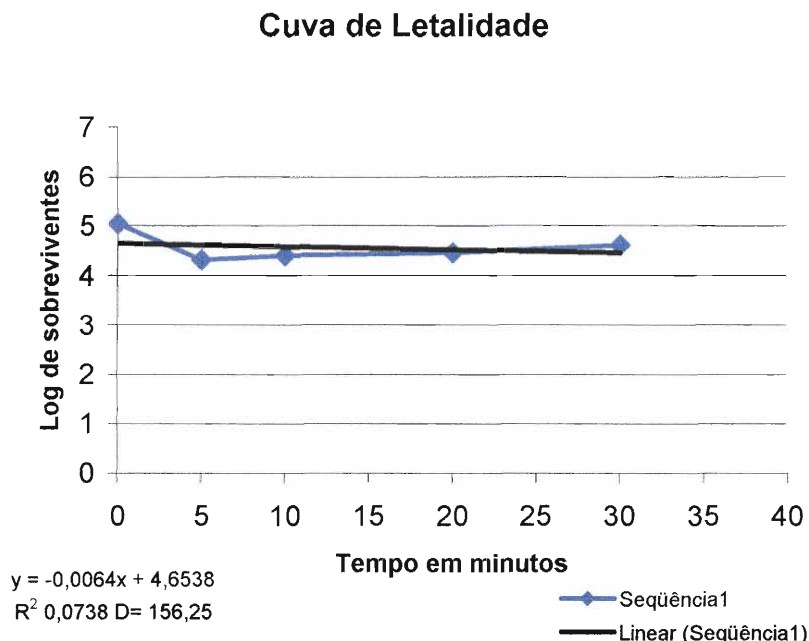


Figura 6 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O₂ (100%) em amostras de 45g de alcachofra (*C. scolymus L.*) (fornecedor B).

A curva de letalidade em amostras de 45 g de alcachofra (fornecedor B) apresentado no gráfico acima demonstrou uma redução de um ciclo logarítmico. Este resultado indicou que o processo plasma apresenta menor eficácia, podendo-se inferir que tenha menor penetrabilidade que ao processo de descontaminação por óxido de etileno e radiação gama.

Estes resultados podem ser atribuídos a maiores quantidades de vasos de xilemas com deposição de lignina em espiral e de grupos de fibras (cerca de 40%) apresentando parede celular secundária espessada em maior grau de lignificação. Desenvolveu-se trabalho complementar, objetivando evidenciar tal hipótese. Desta forma preparou-se a partir da amostra de alcachofra, 20 lâminas. A sua análise permitiu constatar porcentagem de lâminas foliares fragmentadas (cerca de 8%). As lâminas foram submetidas à coloração com azul de astra e safranina para identificação de estruturas celulósicas e elementos lignificados, respectivamente. Obteve-se o percentual de 52% para os tricomas tectores que apresentam estruturas celulósicas, podendo-se concluir estes não influenciaram no processo de difusão gasosa do plasma, visto que no testes das amostras de alcachofra C obtiveram-se resultados de 46% de tricomas tectores próximos ao percentual da alcachofra B.

Para uma massa de 10 g a alcachofra foi submetida ao processo de descontaminação através do plasma O₂ (100%) com os parâmetros de 150 W de potência, 100 mTorr de pressão, 200 sccm de vazão nos tempos indicados na tabela 22.

Tabela 22 - Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor B) antes e após processo plasma O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	B	1,1x10 ⁵	3,4x10 ⁴	10
Alcachofra	B	1,1x10 ⁵	2,5x10 ⁴	20
Alcachofra	B	1,1x10 ⁵	1,4x10 ⁴	30

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

Curva de Letalidade

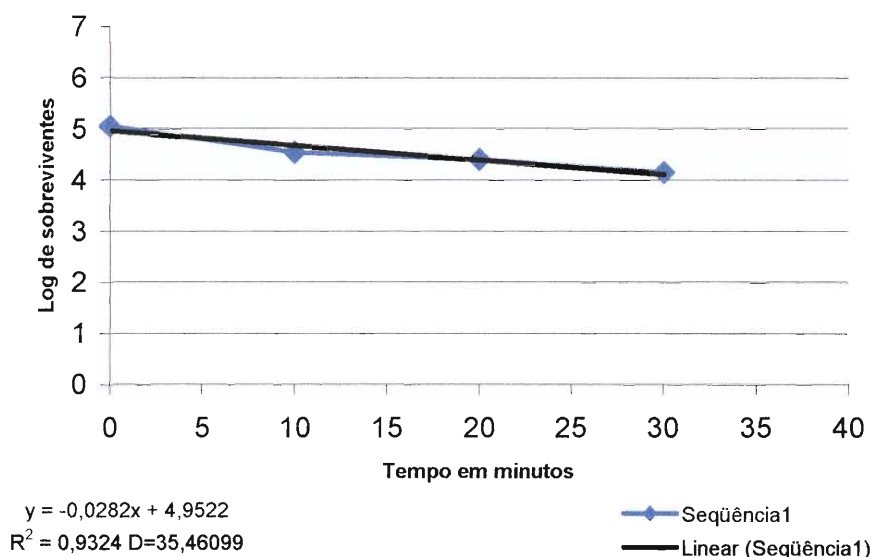


Figura 7 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O₂ (100%) em amostras de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor B).

A contagem microbiana de amostras de 10 g de alcachofra nos tempos de 10, 20 e 30 minutos apontou uma redução de carga microbiana de 1 ciclo logarítmico. Este resultado foi atribuído a menor difusão do plasma O₂ no pó de alcachofra

(fornecedor B). As folhas de alcachofra do fornecedor B continham nervuras espessas e pecíolos diminuindo a descontaminação microbiana. Pode-se inferir que a eficácia do processo depende das estruturas anatômicas das folhas adultas, assim como de outras estruturas da alcachofra como pecíolo, brácteas e caules que se encontravam misturados às folhas. Os pecíolos e nervuras medianas apresentam elementos do xilema bem desenvolvidos e fibras com maior grau de lignificação comparativamente aos elementos encontrados na lâmina foliar. A lignina, pouco permeável a água e pouco elástica deposita-se em células especializadas na sustentação e naquelas envolvidas no transporte de água (OLIVEIRA, AKISUE, 2000). Pode-se inferir que a predominância de elementos lignificados intimamente unidos pela lamela média, poderiam ter diminuído a difusão gasosa no processo plasma, ocasionando que este agisse superficialmente, tanto para amostras com massa de 45g e 10g.

Esta observação dos elementos celulares da alcachofra (fornecedor B) encontra-se em conformidade com os estudos dos autores Femenia *et al.* (1997) e Ruipérez *et al.* (1992) que verificaram que as amostras de folhas de alcachofras apresentaram menores teores de fibra 21,76% frente à planta inteira fragmentada com teor de fibra de 28,47%. Estes autores avaliaram o teor de componentes celulares com 15,19% de lignina para planta inteira fragmentada. Em contrapartida o teor encontrado de lignina para as amostras de folhas de alcachofra dessecada ao sol foi de 7,51%. Em inspeção visual das amostras de alcachofra do fornecedor B observou-se elevado grau de desenvolvimento foliar e a presença de pecíolo e fragmentos de caules comprovados em estudo complementar, empregando exame microscópico de lâminas submetidas coloração de floroglucinol em ácido clorídrico 20%.

Conforme na Tabela 23 amostras de alcachofra foram submetidas ao processo de descontaminação por plasma O₂ (item 4.2.6.3 descontaminação por plasma).

Tabela 23 - Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 45g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma O₂.

Droga Vegetal Massa de 45 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	2,3x10 ³	10
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	1,2x10 ⁴	20
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	2,1x10 ³	30

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

Curva de Letalidade

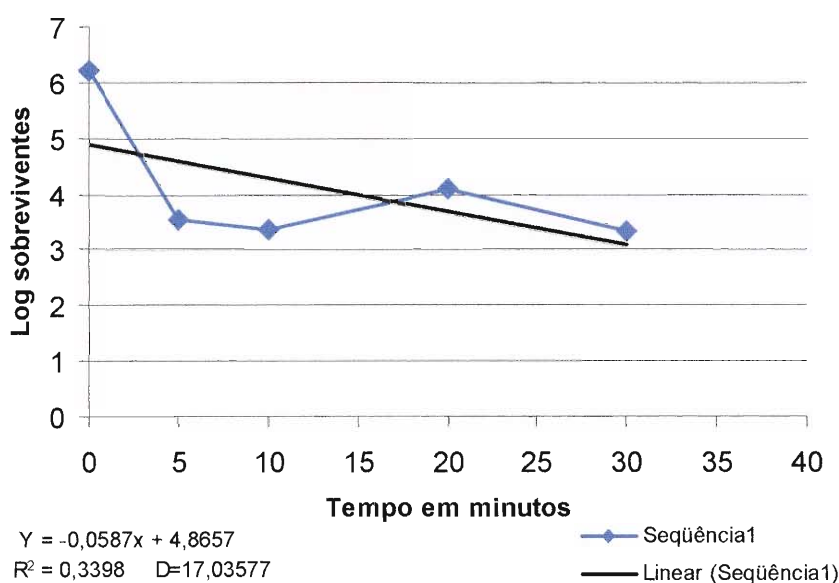


Figura 8 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O₂ (100%) em amostras de 45g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor C).

Segundo o gráfico representado na figura 8 houve redução de 3 ciclos logarítmicos em 10 minutos, o se manteve nos períodos de 20 e 30 minutos.

Conforme a Tabela 24 amostras de alcachofra foram submetidas a idênticas condições do processo de descontaminação por plasma O₂ (item 4.2.6.3

descontaminação por plasma) e verificou-se que à medida que aumenta o tempo de exposição aumenta-se a inativação microbiana, o que se justifica, pois a baixa pressão provoca a erosão do microrganismo (MOISAN *et al.*, 2001).

Tabela 24 - Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	3,8x10 ⁴	10
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	2,5x10 ³	20
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	3,7x10 ²	30

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

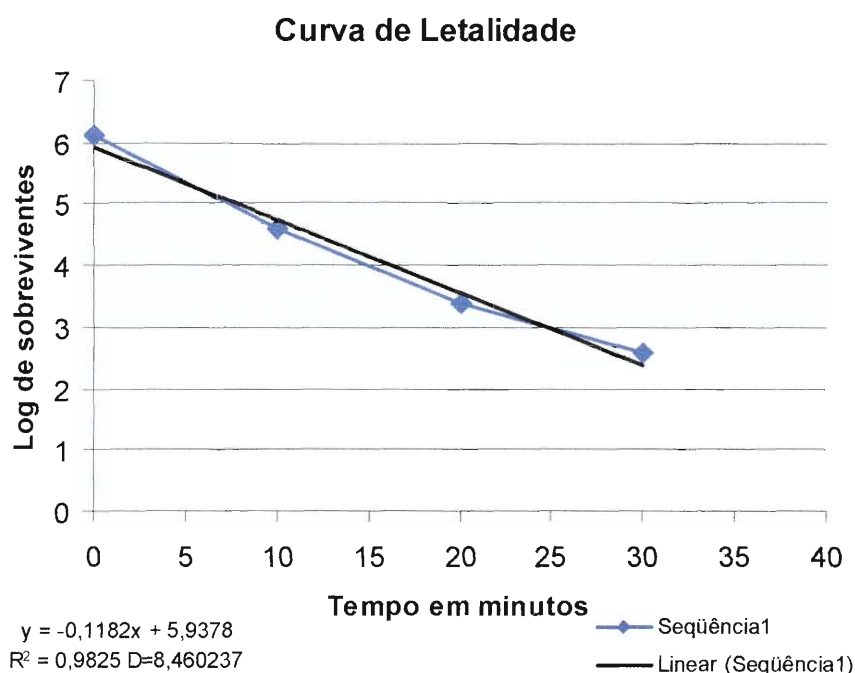


Figura 9 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O₂ (100%) em amostras de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor C).

Na inativação microbiana os aspectos preponderantes estão relacionados ao tempo de exposição e ao agente esterilizante. A penetração do fóton na superfície e membrana externa dos microrganismos depende da energia dos elétrons das espécies reativas (oxygen atoms) e também da espessura da parede celular da

bactéria (PHILIP *et al.*, 2002). É portanto fundamental que se conheçam tanto os parâmetros físicos do processo, como a identidade dos microrganismos contaminantes do material exposto.

A carga microbiana inicial em aeróbicos totais da alcachofra (fornecedor C) antes do processo plasma foi de $1,1 \times 10^6$ UFC/g. Após o processo de descontaminação por plasma a maior redução encontrada foi de 4 ciclos da alcachofra (fornecedor C). Sugere-se que tal resultado seja em decorrência da remoção da nervura central da folha de alcachofra (fornecedor C), diminuindo a presença de número de células com paredes espessadas por lignina, adaptadas à função mecânica de sustentação em tecidos vasculares (OLIVEIRA; AKISUE, 2000). A lignina quando presente em menor quantidade comparativamente à outra amostra possibilitou maior difusão gasosa do plasma. Sugere-se que a menor eficiência do plasma para as amostras de 10g (Tabela 22) e 45g (Tabela 21) de alcachofra (fornecedor B) tendo sido em decorrência primeiro detectados em maiores quantidades no tecido vascular e de sustentação de natureza caulinar presentes nas amostras da alcachofra (fornecedor B).

As folhas de alcachofra do fornecedor C não apresentaram fragmentos de pecíolo, caule e outras estruturas anatômicas por apresentarem resultados apresentaram 1% de fibras e vasos de xilema frente a 53% de fragmentos lâminas foliares em 20 lâminas de amostras coradas. Atribui-se a baixa percentagem de vasos de xilema lignificados e fibras com paredes espessas lignificadas, a maior eficácia do processo plasma, que possibilitou grande difusão gasosa sobre as amostras de folhas de alcachofra (fornecedor C).

Os resultados relativos descontaminação por plasma sobre a contaminação natural para o gínco dos fornecedores A e C podem ser observados na Tabela 25 e 26.

Tabela 25 - Contagem comparativa de microrganismo aeróbios totais (UFC/g) para amostras 10 g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor A) antes e após processo plasma O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Ginco	A	1,2x10 ⁵	2,1x10 ⁴	10
Ginco	A	1,2x10 ⁵	7,0x10 ³	20
Ginco	A	1,2x10 ⁵	2,3x10 ³	30

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

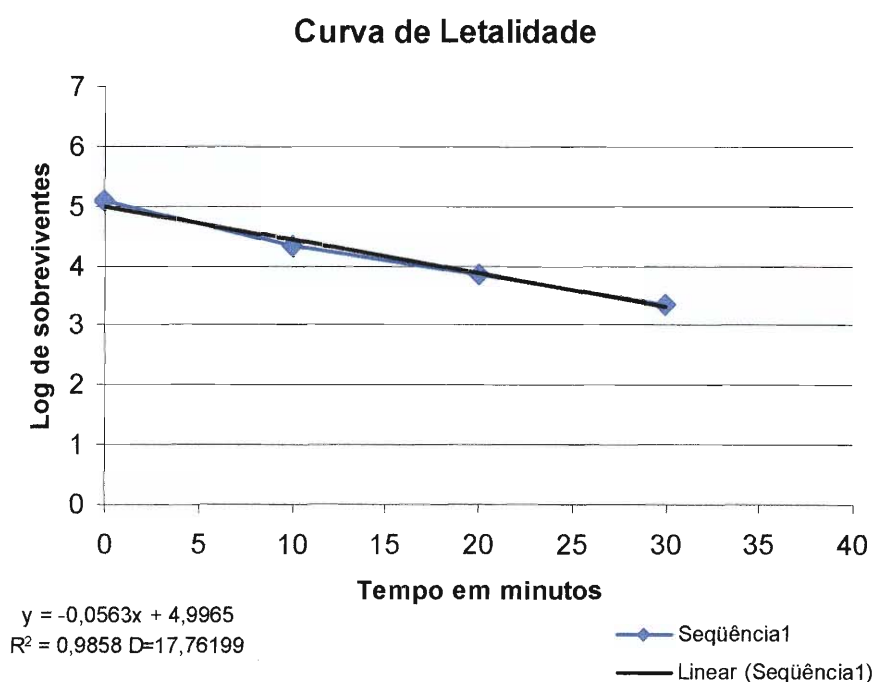


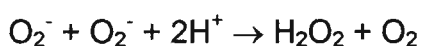
Figura 10 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O₂ (100%) em amostras de 10g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor A).

A contagem de aeróbicos totais do ginko (fornecedor A) apresentou uma redução inicial de 1 ciclo logarítimo para o tempo de 10 minutos no processo plasma

O₂⁻, Mantiveram níveis de e redução logarítmica da mesma ordem de grandeza, embora tenha havido redução da metade de carga microbiana nos tempos de exposição de 20 e 30 minutos. O processo plasma O₂ (100%) empregado nas amostras da alcachofra (fornecedor C) apresentou redução de 4 ciclos logarítmicos em 30 minutos evidenciando maior eficiência descontaminante ao compararmos com o processo plasma O₂ (100%) para o ginkgo (fornecedor A) apresentou redução de 2 ciclos no tempo de exposição de 30 minutos.

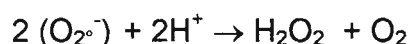
Sugere-se que a menor redução verificada do ginkgo (fornecedor A) esteja possivelmente relacionada à presença da enzima superóxido desmutase presente nesta droga, e sua interferência na reação gerada durante o processo (PINCEMAIL *et al.*, 1989).

A ação da enzima antioxidante superóxido desmutase relaciona-se à seguinte reação:



Conforme estudos de BECKER *et al.* (2004) o plasma de descarga elétrica de gás sob pressão atmosférica (*Non-Equilibrium Air Plasma at Atmospheric Pressure*) gera moléculas, tais como o ozônio (O₃), átomos de oxigênio (O), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e íons tais como o íon radical de oxigênio (O[•]), e íons superóxido (O₂⁻) e radical hidroxila (OH[•]). Este processo plasma produz em maior proporção, o íon superóxido (O₂⁻) durante a ionização do ar.

Complementando este trabalho os pesquisadores Gaunt; Beggs e Georghiou (2006) expuseram microrganismos ao plasma à pressão atmosférica e comprovaram que bactérias aeróbias e aeróbias facultativas empregam sistema de defesa enzimático contra o estresse oxidativo. Os radicais superóxido são formados em pequenas quantidades durante a respiração bacteriana. Bactérias aeróbias e aeróbias facultativas produzem a enzima superóxido desmutase transformando o íon superóxido (O₂⁻) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).



O microrganismo contaminante presente do ginkgo A foi a *Klebsiella pneumoniae*, que possui em sua estrutura celular uma espessa cápsula externa. Esta cápsula é composta de uma estrutura complexa de polissacarídeos dividida em subunidades de quatro a seis açúcares ligadas ao ácido urônico, podendo ser classificada em 77 tipos sorológicos (ORSKOV;ORSKOV, 1984).

O nível de contaminação microbiana total foi de $1,2 \times 10^5$ UFC/g e ao compararmos com a contagem de enterobactérias cerca de $1,0 \times 10^4$ UFC/g, observou-se que esta droga vegetal apresentou alta carga de enterobactérias, entretanto esta biocarga de enterobactérias não influenciou negativamente na descontaminação desta droga. Os resultados obtidos evidenciam que os princípios ativos, reações químicas, sistemas biológicos enzimáticos assim como a estrutura morfológica do microrganismo contaminante pode diminuir a ação germicida do plasma.

Tabela 26 - Contagem comparativa de microrganismo aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10 g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma O ₂	Após o processo plasma O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Ginco	C	1,4x10 ⁴	1,2x10 ⁴	10
Ginco	C	1,4x10 ⁴	2,5x10 ³	20
Ginco	C	1,4x10 ⁴	1,3x10 ³	30

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

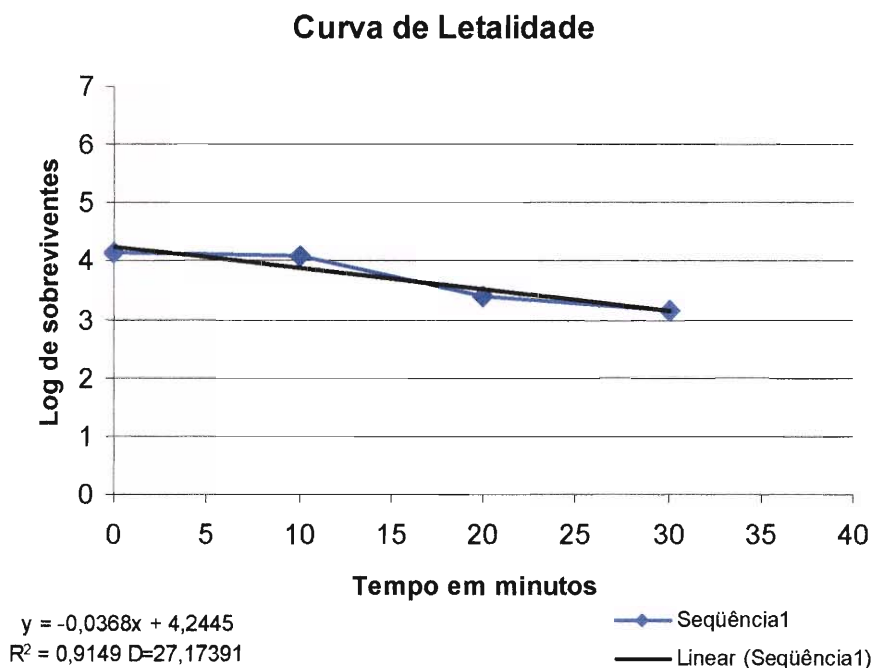


Figura 11 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma O₂ (100%) em amostras de 10g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor C).

A contagem de microrganismos aeróbios totais, partindo-se de carga microbiana inicial de 1,4x10⁴ UFC/g do ginko do fornecedor C, apresentou redução de apenas 1 ciclo log nos tempos de exposição 20 e 30 minutos. Comparando-se com a carga microbiana de enterobactérias de 4,9x10² UFC/g verificou-se menor

nível de contaminação por enterobactéria, entretanto a baixa redução logarítmica não está associada a biocarga inicial de enterobactérias, mas sim ao microrganismo contaminante que produz biofilme.

Fatores que podem ter contribuído para este resultado é a presença da bactéria *Enterobacter sakasaki*. Considera-se que a resistência desta bactéria é atribuída à produção de um biofilme que protege as células contra os raios UV, dessecação, aquecimento, ausência de nutrientes, acidez, detergentes e antibióticos (COSTERTON *et. al*, 1995). Este biofilme, adicionalmente possui grande versatilidade, aderindo a diversas superfícies como o silicone, látex, policarbonato e aço inoxidável (IVERSEN; LANE; FORSYTHE, 2004).

O biofilme da *Enterobacter sakasaki* é composto por comunidades de microrganismos estruturalmente organizados formados por matrizes poliméricas hidratadas associadas às estruturas flagelares, fímbrias ou substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (PRATT; KOLTER, 1998).

A celulose é classificada como uma das substâncias poliméricas extracelulares do biofilme proporcionando proteção mecânica, química e biológica em habitats naturais, assim como a adesão celular em processos infecciosos a essa enterobactéria (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Amostras de 10 g de alcachofra (fornecedor B) foram submetidas ao processo de descontaminação por plasma H₂O₂ (20%) e O₂ (80%) (item descontaminação por plasma) nos tempos de 10 a 30 minutos, (Tabela 27), com redução inicial de 1 ciclo logaritmo de carga microbiana, na taxa de letalidade com tratamentos por tempos maiores que 10 minutos.

Tabela 27 - Contagem comparativa de microrganismo aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10 g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor B) antes e após processo plasma H₂O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma H ₂ O ₂	Após o processo plasma H ₂ O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	B	1,1 x10 ⁵	3,6x10 ⁴	10
Alcachofra	B	1,1 x10 ⁵	2,4x10 ⁴	20
Alcachofra	B	1,1 x10 ⁵	1,4x10 ⁴	30

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

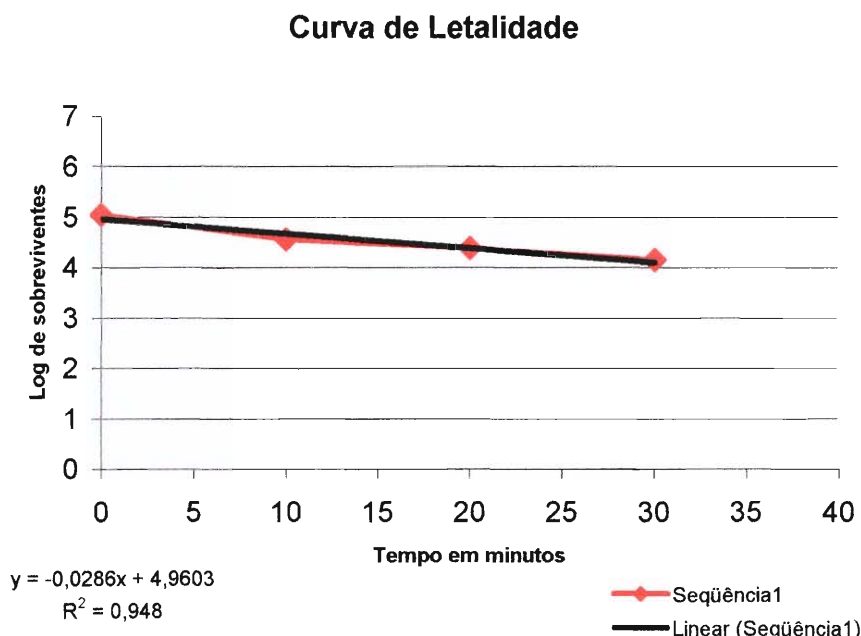


Figura 12 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H₂O₂(20%) e O₂ (80%) em amostras de 10g de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) (fornecedor B).

Comparando-se os processo plasma O₂ 100% (Tabela 22) e o processo plasma H₂O₂ (20%) e O₂ (80%) a alcachofra do fornecedor B (Tabela 27) apresentou

a redução de apenas 1 ciclo para os tempos 10, 20 e 30 minutos nos dois processos. Sugere-se que a menor descontaminação do plasma para as amostras de 10g e 45g de alcachofra (fornecedor B) seja em decorrência ao grau de lignificação detectados em maiores quantidades no tecido colenquimático do caule e pecíolo que se encontravam misturadas às folhas de alcachofra B.

Os resultados obtidos evidenciam a baixa penetrabilidade gasosa tendo em vista as folhas de alcachofra do fornecedor B apresentarem fragmentos de pecíolo, caule e por isso encontrou-se elementos de xilema de grosso calibre e em maior grau de lignificação quantificados em 38% em contrapartida de 8,3% de fragmentos de lâminas foliares em 20 lâminas de amostras coradas com solução saturada de floroglucinol em ácido clorídrico 20%.

Conforme observado na Tabela 28 a alcachofra do fornecedor C foi submetida ao processo de descontaminação através do plasma H_2O_2 (20%) e O_2 (80%) com os parâmetros de 150 W de potência, 100 mTorr de pressão, 200 sccm de vazão.

Tabela 28 - Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10 g de alcachofra (*Cynara. scolymus* L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma H₂O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma H ₂ O ₂	Após o processo plasma H ₂ O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	2,0x10 ³	10
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	5,2x10 ²	20
Alcachofra	C	1,3x10 ⁶	2,3x10 ²	30

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

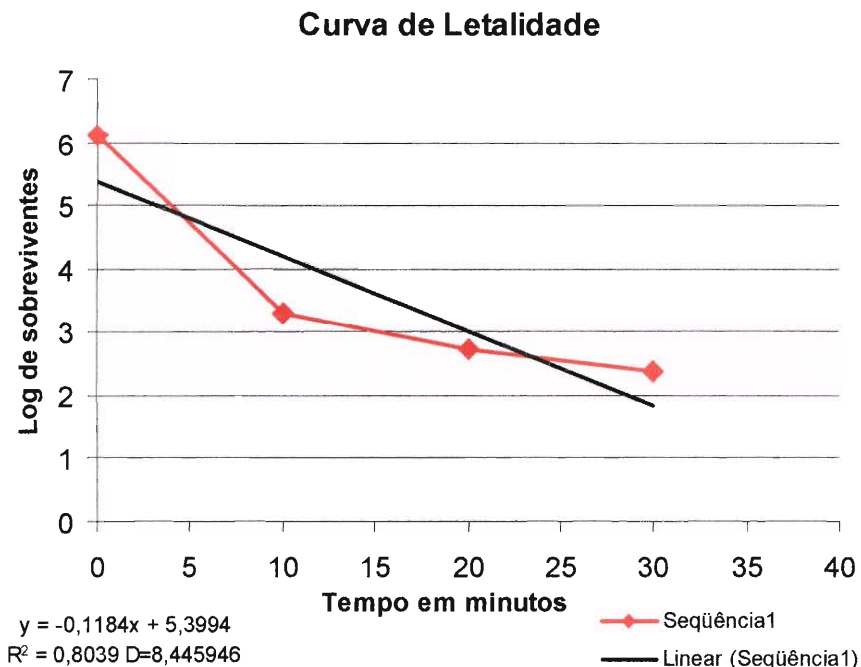
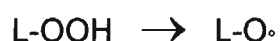
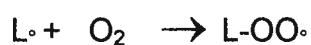
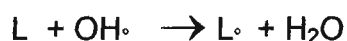


Figura 13 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H₂O₂(20%) e O₂ (80%) em amostras de 10g de alcachofra (*Cynara. scolymus* L.) (fornecedor C).

A contagem microbiana da alcachofra C no tempo de 10 minutos apontou redução de 3 ciclos e de 4 ciclos para os tempos de 20 e 30 minutos. Pode-se mais uma vez deduzir que a eficácia do processo depende da penetrabilidade do plasma.

As partículas ionizadas geradas no plasma promovem danos em macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos. Os radicais atacam os ácidos graxos polinsaturados da membrana lipídica, iniciando peroxidação dos lipídeos (*lipid peroxidation chain*) induzindo reação em cadeia destrutiva. Os radicais hidroxiperóxidos ($\text{HOO}\cdot$) (*hydroperoxyl radicals*), radicais superóxidos, oxigênio atômico e ozônio desencadeiam esta peroxidação. A reação em cadeia de peroxidação inicia-se quando átomo de hidrogênio é retirado do ácido graxo insaturado formando o radical lipídeo (*lipid radical*) ($\text{L-OO}\cdot$). Estes radicais atacam outros ácidos graxos insaturados, que retiram os átomos de hidrogênio formando hidroperóxidos de ácidos graxos (*fatty acid hydroperoxides*) (L-OOH), propagando a reação em cadeia. As substâncias geradas por peroxidação lipídica possuem menores dimensões do que os ácidos graxos insaturados iniciais (FARR; KOGOMA, 1991). Estas substâncias menores geradas na peroxidação lipídica promovem alterações destrutivas na membrana celular (MEAD, 1976). A perda desta integridade celular induz ao desequilíbrio osmótico resultando em lise celular (HUMPHRIES; SZWEDA, 1998).



Devido a sua reatividade os radicais hidroxilas atacam os açúcares da estrutura molecular do DNA produzindo rupturas. Os radicais $\text{OH}\cdot$ não se difundem diretamente nas células devido à extrema reatividade que torna necessária o processo de difusão latente, através do peróxido de hidrogênio reagindo com íons metálicos próximos à molécula de DNA, que libera a alta reatividade dos radicais de hidroxila $\text{OH}\cdot$ (HENLE; LINN, 1997).

As amostras de 10g de ginkgo (fornecedor A e C) tiveram comportamentos diferentes frente ao mesmo processo de descontaminação (item 4.2.6.4 descontaminação por plasma).

Tabela 29 - Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10 g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor A) antes e após processo plasma H₂O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma H ₂ O ₂	Após o processo plasma H ₂ O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Ginco	A	1,2x10 ⁵	1,7x10 ³	10
Ginco	A	1,2x10 ⁵	4,5x10 ²	20
Ginco	A	1,2x10 ⁵	1,6x10 ²	30

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

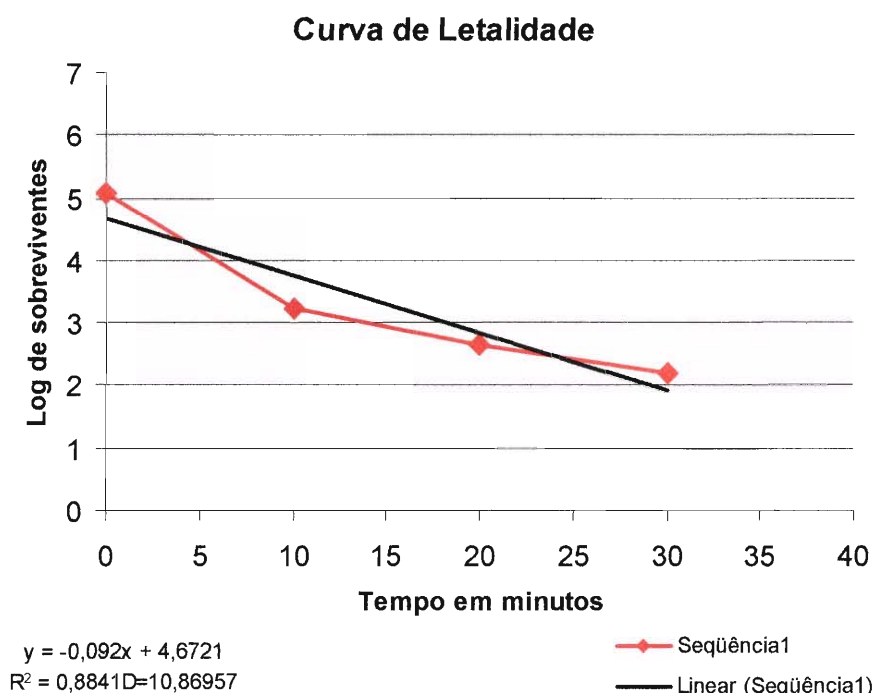


Figura 14 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H₂O₂(20%) e O₂ (80%) em amostras de 10g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor A).

Houve a redução de 3 ciclos logarítmicos (cerca de 1,6x10² UFC/g) para amostras de ginko (fornecedor A) submetidas ao processo plasma peróxido de

hidrogênio comparativamente menor que a redução de 4 ciclos logaritmo (cerca de $3,7 \times 10^2$ UFC/g) das amostras de alcachofra do fornecedor C sob mesmos parâmetros de processo plasma. Sugere-se que tal resultado seja atribuído à presença *Klebsiella pneumoniae*, a qual por ser uma bactéria anaeróbia facultativa produz superóxido desmutase que converte o íon superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (GAUNT *et al.*, 2006).

Complementando esta abordagem enzimática da *Klebsiella pneumoniae*, reações bioquímicas evidenciam a presença da enzima catalase que propiciou menor inativação microbiana (KREIG; HOLT, 1994).

O ginko contém a enzima antioxidante superóxido desmutase e catalase, diminuindo a peroxidação lipídica em lesões neurológicas induzida por doença de Parkinson e Alzheimer (JENNER, 1992; O'BRIEN *et al.*, 1996) possui ação antioxidante interagindo com várias espécies quimicamente ativas incluindo radicais superóxido, radicais hidroxiperóxidos (HOO^\bullet), radical hidroxila (AHLEMEYER; KRIGLSTEIN, 2003).

Conforme observado na Tabela 30 o ginko C foi submetido ao processo de descontaminação por plasma H_2O_2 (20%) e O_2 (80%) (item 4.2.6.4 descontaminação por plasma).

Tabela 30 - Contagem comparativa de microrganismos aeróbios totais (UFC/g) para amostras de 10 g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor C) antes e após processo plasma H₂O₂.

Droga Vegetal Massa de 10 g	Fornecedor	Contagem de Aeróbios Totais (UFC/g)		
		Antes do processo plasma H ₂ O ₂	Após o processo plasma H ₂ O ₂	Tempo de exposição (minutos)
Ginco	C	1,4x10 ⁴	2,9x10 ³	10
Ginco	C	1,4x10 ⁴	1,7x10 ³	20
Ginco	C	1,4x10 ⁴	6,2x10 ²	30

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

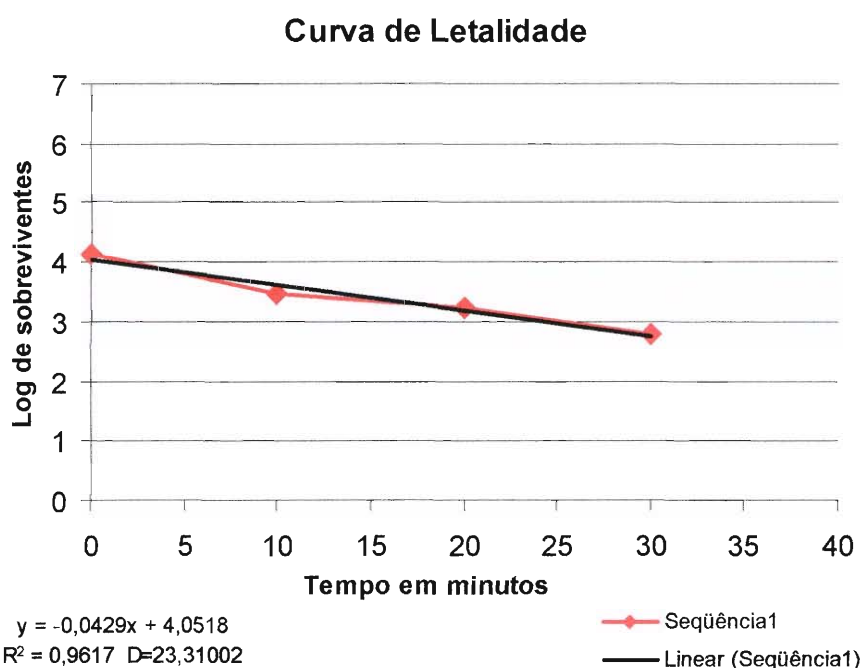


Figura 15 - Curva de letalidade de microrganismos aeróbios totais em função do tempo de exposição ao plasma H₂O₂(20%) e O₂ (80%) em amostras de 10g de ginko (*Ginkgo biloba* L.) (fornecedor C).

Os resultados de descontaminação do ginko do fornecedor C, partindo-se de uma biocarga inicial de aeróbios totais de 1,4x10⁴ UFC/g atingiu uma redução de 2 ciclos, sendo inferior a redução de 3 ciclos do fornecedor A de ginko com uma

biocarga inicial de $1,2 \times 10^5$ UFC/g. Ambas as amostras foram submetidas ao processo plasma H_2O_2 (20%) e O_2 (80%) com uma potência de 150 W, pressão de 100 mTorr e vazão de 200 sccm.

Esta diferença entre os valores indica a resistência do microrganismo *Enterobacter sakazakii* presente no ginko (fornecedor C).

Os autores Lehner *et al.* (2005), analisaram por métodos microbiológicos e comprovaram a contaminação de *Enterobacter sakazakii* em vários alimentos principalmente em unidades processadas industrialmente como leite de soja (*formula*) para lactentes. As estruturas celulares do *Enterobacter sakazakii* são notavelmente resistentes aos processos de dessecação comparadas a outros membros da *Enterobacteriaceae*. A *Enterobacter sakazakii* produz altas concentrações de trealose propiciando maior capacidade adaptativa em condições ambientais adversas.

Ampliando trabalhos científicos sobre a resistência do *Enterobacter sakazakii* os autores González *et al.* (2006), estudaram quatro espécies de *Enterobacter sakazakii* (A, B, C e D) inoculadas em meio Caldo Caseína-soja em recipientes estéreis contendo leite de soja (*formula*) reconstituídos e submetidos ao processamento à alta pressão. Adotou-se pressões de 200, 400 e 600 MPa aplicadas em cada amostra por um minuto. Os resultados apontaram que a espécie B apresentou maior resistência ($P < 0,05$) do que as outras espécies (A, C e D) de enterobactéria, reduzindo 3 logs na pressão de 600 MPa. Os autores concluíram que a *Enterobacter sakazakii* presente em amostras de leite de soja quando submetida ao processamento à alta pressão de 600 MPa por 1 minuto atingem reduções logarítmicas no intervalo de 3 a 6,84 dependendo da espécie. Esta informação pode apresentar-se de interesse na correlação com os níveis de pressão empregados nos processos empregando-se plasma.

Os resultados obtidos evidenciam a complexidade de fatores, inerentes ao processo e ao material biológico, seja o contaminante microbiano ou a estrutura do vegetal, influenciando o resultado quanto à eficácia descontaminante. Assim, fazem-se necessários estudos preliminares para estudar a aplicabilidade do sistema a cada situação. De forma objetiva, o processo nas condições estudadas no presente trabalho mostrou-se ineficaz para o guaraná (fornecedor A,B,C), camomila (fornecedor A,B,C) e alcachofra (fornecedor B), enquanto evidenciou ser um método adequado de descontaminação para o ginko e alcachofra (fornecedor C).

Sugere-se para maior aplicabilidade e racionalização do processo descontaminante plasma agrupar drogas vegetais que possuam mesma estrutura morfoanatômica assim como mesmo grupo de princípios ativos.

Quanto a outras drogas vegetais sua aplicabilidade dependerá de estudos morfoanatômicos do órgão da droga vegetal devendo-se seguir os critérios dos agrupamentos.

No presente trabalho estudou-se o desenvolvimento de processo de descontaminação por plasma assim como os parâmetros físicos envolvidos.

Em trabalhos futuros sugere-se o mapeamento dos princípios ativos para posterior avaliação comparativa a outros processos de descontaminação como óxido de etileno e radiação gama, tendo em vista esses estudos serem realizados com as mesmas espécies de drogas vegetais.

Adicionalmente, aspectos inerentes aos microrganismos, que se caracterizam pela formação de biofilmes e o seu risco sanitário, além das barreiras dos substratos vegetais, sejam as de natureza morfoanatômicas, enzimáticas ou químicas, tornam o estudo do desafio instigante, induzindo ao prosseguimento amplo das pesquisas correlacionadas.

6. CONCLUSÃO

1. O acondicionamento das drogas vegetais disponíveis não apresentou padronização quanto à embalagem primária, sendo polietileno adotado para alcachofra, camomila, guaraná do fornecedor B e C de polipropileno para camomila, ginko e guaraná do fornecedor A.
2. No quesito inspeção visual houve uniformidade entre as amostras de alcachofra (fornecedores B e C), camomila (fornecedor A e B), ginko (fornecedor A) tendo sido detectada contaminação por material mineral (pedra) e material vegetal.
3. Todas as amostras das drogas vegetais analisadas apresentaram contagens superiores aos limites da OMS para contagens de aeróbios totais de 10^5 UFC, fungos de 10^3 UFC/g e enterobactérias de 10 UFC/g para drogas vegetais destinadas a uso interno e para as amostras de camomila (fornecedor A, B e C) excederam aos limites de 10^4 UFC/g de fungos e de 10^2 UFC/g de enterobactérias para limite especificado para materiais destinados ao preparo de infusos ou ao uso tópico. Segundo a Farmacopeia Brasileira (1988) microrganismos indicadores de riscos para a via de administração oral como *Enterobacter* sp foram encontrados nas amostras de alcachofra (fornecedores B e C), camomila (fornecedores B e C), ginko (fornecedores A e C). Outro indicador de risco detectado foi a bactéria *Escherichia coli* encontrada nas amostras de camomila e guaraná do fornecedor B. O gênero de fungos detectado com maior ocorrência foi o *Aspergillus* que é um indicativo de más condições de colheita e armazenagem em todas amostras de drogas vegetais com exceção da alcachofra (fornecedor B).
4. A redução de 3 ciclos log dos dois processos plasma testados O_2 (100%), e H_2O_2 (20%) e O_2 (80%) é considerada adequada. Possivelmente, a maior difusão do plasma no pó da alcachofra, do fornecedor C, deve ter conduzido a este resultado, portanto a eficácia do processo mostra-se relacionado à estrutura morfoanatômica da planta.
5. Contagem microbiana de *Bacillus subtilis* com carga microbiana inicial de $3,2 \times 10^6$ UFC/mL para amostras de alcachofra do produtor C evidenciaram redução logarítmica de 3 ciclos log para processo plasma O_2 (100%) e H_2O_2 (20%) e O_2 (80%) (potência de 150W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm).

Os resultados indicam a reprodutibilidade descontaminante em ambos processos plasma.

6. Contagem microbiana de *Bacillus subtilis* com carga microbiana inicial de $2,9 \times 10^6$ UFC/mL para amostras de ginkgo do produtor C indicaram redução de 2 ciclos log para processo plasma O_2 (100%) e redução de 3 ciclos para processo plasma H_2O_2 (20%) e O_2 (80%) nos mesmos parâmetros processuais (potência de 150W, pressão 100 mTorr e vazão 200 sccm). Os resultados indicam a reprodutibilidade descontaminante em ambos processos os tipos de plasma.
7. Resultados da descontaminação do ginkgo do fornecedor C indicaram menores reduções da carga bacteriana inicial de $1,4 \times 10^4$ UFC/g em níveis de 1 a 2 ciclos para os processos plasma O_2 (100%), e H_2O_2 (20%) e O_2 (80%) a uma potência 150W, pressão 100 mTorr e vazão de 200 sccm respectivamente. A presença de microrganismo termoresistente (*Enterobacter sakazakii*) pode ter reduzido a eficiência de ambos os processos pela formação de biofilme.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, A.A.K.; KAWTHHER, M.S.; EL TANTAWY, M.E.; BADEAA, R. I.; KHAYRIA, N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v. 67, p. 357-363, 1999.

ALEXANDER, R.G.; WILSON, D.A.; DAVIDSON, A.G.; Medicines Control Agency investigation of the microbial quality of herbal products. **The Pharmaceutical Journal**, v.259, p. 259-261, 1997.]

AHLENMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p.1779-1792, 2003.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDO E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. **Esterilização de artigos em unidades de saúde**. São Paulo, 1998. 89p. [Apostila]

AZIZ, N.H.; EL-FOULY, M.Z.; ABUSHADY, M.R.; MOUSSA, L.A.A. Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal floras contaminating medicinal plants. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 48, n.1, pp. 71-76, 1997.

AZIZ, N.H.; YOSSEF, Y.A.; EL-FOULY, M.Z.; MOUSSA, L.A. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.39, n.4, p.279-285, 1998.

BARENE, I.; DABERTE, I.; ZVIRGZDINA, L.; IRISTE V. The complex technology on products of German chamomile. **Medicina**, v.39, n. 2, p. 127-131, 2003.

BECKER, K.; SCHMIDT, M.; VIGGIANO, A.A.; DRESSLER, R.; WILLIAMS, S. Air plasma chemistry. **Non-Equilibrium Air Plasma at Atmospheric Pressure**, p.124-182, BECKER, K.H; KOGELCHATZ, U.; SCHOENBACH, K.H.; BARKER, R.J., eds Bristol, IOP, 2004. cap. 4.

BIRKS, J.; GRIMLEY, E.V.; VANDONGEN, M. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia (Cochrane Review). In: Cochrane Library (ISSN 1464-780X). Cochrane data base Syst Rev): CD003120, 2002. *apud* CASTELLOTE, F.J.; MORALES, M.P.A. *Ginkgo biloba* y hemorragia cerebral. **Anales de Medicina Interna**, v.22, n.4, p.199, 2005.

BLAIMONT, B.; CHARLIER, J.; WAUTERS, G. Comparative distribution of *Enterococcus* species in faeces and clinical samples. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 8, p. 87-92, 1995.

BLOCK, S.S.; Peroxygen Compounds; In:____. **Desinfection, Sterilization and Preservation**. 4th ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 1991. Cap.9, p. 168.

BOL'SHAKOV, A.A.; CRUDEN, B.A.; MOGUL, R.; RAO, M.V.V.S.; SHARMA, S.P.; KHARE, B.N.; MEYYAPPAN, M. Radio-Frequency Oxygen Plasma as a Sterilization Source. **American Institute of Aeronautics and Astronautics Student Journal** , v.42, n. 4, p. 823-831, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.6, de 31 de janeiro de 1995**. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=5311&word=>. Acesso em: 10 mar.2005

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.17, de 24 de fevereiro de 2000**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1380&word=>. Acesso em: 10mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.123, de 19 de outubro de 1994**. Estabelece as normas para o registro de produtos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=775&word=>. Acesso em: 10 mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.48, de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>. Acesso em: 10 mar. 2005.

BRENNER, D.J.; MCWHORTER, A.C.; KAI, A.; STEIGERWALT, A.G.; FARMER III, J.J. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, n.6, p.1114-1120, 1986.

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

CAPLENAS, N.R.; KANAREK, M.S.; DUFOUR, A.P. Source and Extent of *Klebsiella pneumoniae* in Paper Industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 5, p.779-785,1981.

CASSOLA, M.A.; MARTINHO, E. Plasma de peróxido de hidrogênio. **Revista SOBECC**, v. 2, n. 3, p.8-11; 1997.

CHAPMAN, B.N. **Glow discharge processes**: sputtering and plasma etching. New York: John Wiley, 1980.

CHAU, T.T.; KAO, K.C.; BLANK, G.; MADRID, F. Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. **Biomaterials**, v.17, n.13, p.1273-1277, 1996.

CHMIELEWSKI, A.G.; MIGDAL, W. Radiation decontamination of herbs and spices. **Nukleonika**, v.50, n.4, p.179-184, 2005.

CHOURASIA, H.K. Mycobiota and mycotoxins in herbal drugs of Indian pharmaceutical industries. **Mycological research** , v. 99, n. 6, p. 697-703,1995.

CINELLI, M. J. **Cinetiques réactionelles des radicaux carbonés em décharge et post-décharge micro-ondes; applications a la cémentation d'aciers et au dépôt de couches carbone dur**. França, 10 de dezembro de 1996. Tese de Doutorado - Faculté des Sciences - Université de Limoges.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745,1995.

CROW, R.N.; SMITH, J.H. Gas Plasma Sterilization – Application of space-Age Technology. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.16, n.8, p.483-87, 1995.

DENG, X.T.; SHI,J.J.; SHAMA,G.; KONG, M.G. Effects of microbial loading and sporulation temperature inactivation of *Bacillus subtilis* spore. **Applied Physics Letters**, v. 87, n.15, p.153901/1-1153901/3, 2005.

DEVRIESE, L.A.; COLLINS, M.D.; WHIRT R. The genus *Enterococcus*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H.G; DWORKING, M.; HARDER, M.; SCHLEIFERK, H.A., eds. **The prokaryotes**: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992, p.1465-1481.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996, 230 p.

EFUNTOYE, M.O. Fungi associated with herbal drugplants during storage. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 136, p. 115-118, 1996.

ELIASSON B., KOGELSCHATZ U. **Basic Data for Modeling of Electrical Discharges in Gases: Oxygen** in Brown Boveri Technical Report KLR 86-11C, 1986. *apud* STANFFORD, D.S. Modeling of singlet-delta oxygen yields in flowing electric discharges. Urbana, 2004. p.92, Master Thesis- University of Illinois at Urbana-Champaign.

EL-KADY, I.A.; EL-MARAGHY, S.S.M.; MOSTAFA, E. Contribution of the mesophilic fungi of different spices in Egypt. **Mycopathologia**, Den Haag, v.120, p. 93-101, 1992.

ELSHAFIE, A.E.; AL-LAWATIA, T.; AL-BAHRYS, S. Fungi associated with black tea and tea quality in Sultanate of Oman. **Mycopathologia**, Den Haag, v.145, p. 89-93, 1999.

ELSHAFIE, A.E.; AL-RASHDI, T.; AL-BAHRY, S.N.; BAKHEIT, C.S. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. **Mycopathologia**, Den Haag, v.155, p. 155-160, 2002.

EMBRAPA RONDÔNIA, Sistema de Produção, 1 – ISSN 1807-1805 Dez. – 2005 **Cultivo de Guaranzeiro em Rondônia. Disponível em:** <http://sistemadeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/guarana/CultivadoGuaranzeiroRO/Anexos>. Acesso em: 7 janeiro 2006.

ENDTZ H.P., van den BRAAK N., van BELKUM A., KLUYTMANS J.A.J.W., KOELEMAN J.G., SPANJAARD L., VOSS A., WEERSINK A.J., VAN DENBROUCKE-GRAULS C.M., BUITING A.G., van DUIN A., VERBRUGH H.A. Fecal carriage of vancomycin – resistant *enterococci* in hospitalized patients and those living in the community in Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.12, p. 3026-3031, 1997.

EUROPEAN Pharmacopeia. 3 ed. Microbiological quality of pharmaceutical preparations, 1996, p. 287-288.

EVANS, W.C. **Trease and Evans pharmacognosy**. 15.ed. Edinburg, New York: Saunders, 2001. p.282-283.

FANG X., WU J. Feasibility of sterilizing traditional medicines by gamma-irradiation. **International journal of radiation biology**, v. 52, n.1-6, pp.53-58, 1998.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Ateneu, 1988, Parte 1, p., V.4.1-V.4.1.-2, V.5.1.6.-1 -V.5.1.7.-6.

FARMER, J.J.III; FANNING, G.R., DAVIS, B.R.; O'HARA, C.M.; RIDDLE, C.; HICKMAN-BRENNER, F.W., ASBURY, M.A.; LOWERY, V.A.; BRENNER, D.J. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n.1, p.77-81, 1985.

FARR, S.B.; KOGOMA, T. "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*". **Microbiological Reviews**, v.55, n.4, p.561-585, 1991.

FEMENIA, A. ; ROBERTSON J. A. ; WALDRON, K.W. ; SELVENDRAN R.R. Cauliflower (*Brassica oleracea L*), Globe Artichoke (*Cynara scolymus*) and Chicory Witloof (*Cichorium intybus*) Processing By-products as Sources of Dietary Fibre. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, p.511-518, 1998.

FRAGA, C.G.; MACTINO, V.S.; FERRARO G.E., COUSSIO J.D.; BOVERIS A. Flavonoids as antioxidant evaluated by *in vitro* and *in situ* liver chemiluminescence. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v.36, p. 717-20, 1987.

FRENCH, G.L. *Enterococci* and vancomycin resistance. **Clinical Infectious Diseases** .,v.27,n.1, p.S75-S83, 1998.

FRENEY, J.; GAVINI, F.; PLOTON, C.; LECLERC, H.; FLEURETTE, J. Isolation of *Escherichia fergusonii* from a patient with septicemia in France. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.6, p.78, 1987.[Letter].

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

FUNKE, G.; HANY, A.; ALTWEGG, M. Isolation of *Escherichia fergusonii* from four different sites in a patient with pancreatic carcinoma and cholangiosepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p., 2201-2203, 1993.

GADRI, B.R.; ROTH, J.R.; MONTIE, T.C.; KELLY-WINTENBERG, K.; TSAI, P.P.Y.; HELFRITCH, D.J. ; FELDMAN, P.; SHERMAN, D.M.; KARAKAYA, F.; CHEN, Z.Y. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a

one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). **Surface and Coatings Technology**, v.131,n.1-3,p.528-542, 2000.

GADGOLI, C.; MISHRA, S.H.; Antihepatotoxic activity of Cichorium intybus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58,n.2, p. 131-134, 1997.

GARRIDO, D.; JODRAL, m.; POZO, R. Mold flora and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in spices and herbs. **Journal of Food Protection**, v. 55, n.6, p.451-452, 1992.

GAUNT, L.F.; BEGGS, C.B.; GEORGHIOU, G.E. Bactericidal Action of Reactive Species Produced by Gas-Discharge Nonthermal Plasma at Atmospheric Pressure: A Review., **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.34, n.4, p.1257-1269, 2006.

GRENFIELD, J.; DAVIS, J.M.; Ginkgo (*Ginkgo biloba L.*) from Medicinal Herb Production Guide from Analysis of the economic viability of cultivation selected botanicals in North Carolina. Strategic Report, North Carolina, Disponível em <http://naturalmedicinesofnc.org>, 2004. Acesso em 9 janeiro 2006

GONZALES, S.; FLICK, G.J.; ARRIT, F.M.; HOLLIMAN,D.; MEADOWS, B. Effects of High-Pressure Processing on Strains of *Enterobacter sakazakii.*, **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 4, p.935-937, 2006.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M.R.; MINO, J.; FERRARO, G.E.; ACEVEDO, C.; Choleric effect and intestinal propulsion of "Mate" (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2, p 291-294, 2001.

HALT, M. Moulds and Mycotoxins in herb tea and medicinal plants. **European Journal of Epidemiology**, v.14, p.269-274, 1998.

HARTKE, K.; MUTSCHIER, E. (Hrsg.) **DAB 9 Kommentar Wissenschaftliche**, Frankfurt: Govi. 1986. *apud* SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p.275-276.

HENLE, E.S.; LINN, S. Formation prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide, **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.31, p.19095-19098,1997.

HENMAN, A.R. Guaraná (*Paullinea cupuna var. sorbilis*) ecological and social perspectives on an economic plant of central Amazon basin, **Journal of Ethnopharmacology**, v.6, n.3, p.311-338, 1982.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMANN, P.C.H. Potencial health effects of the dietary flavonol queretin. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, p.63-71, 1998.

HIEDA, K.; SUZUKI, K.; HIRONO, T.; SUZUKI, M.; FURUSAWA Y. "single-stand and Double Stand Breaks in pBR322 DNA by Vacuum – UV from 8,3 to 20,7 eV, **Journal of Radiation Research**, v.35, n.2, p.104-111, 1994.

HUMPHRIES, K.M.; SZWEDA, L.I. "Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase : Reaction of lipoic acid with 4-hydroxyl-2-nonenal," **Biochemistry**, v. 37, n. 45, p.15835-15841,1998.

HUYCKE, M.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant *enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.239-249,1998.

IEVEN, M.; VERCAUTEREN, E.; DESCHEEMAER, P.; van LAER, F.; and GOOSSENS, H. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant *enterococci* among hospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1436-1440, 1999.

ISECHE, K.; PAIVA, L.C.; MALUF, W.R. Como plantar alcachofra, Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. MG – Brasil. **Boletim Técnico de Hortaliças**, n.11 1ª edição, outubro 1998. Disponível em: <http://www2.ufla.br/~wrmaluf/bth011.html>. Acesso em: 7 jan. 2006.

ITO T. The Effects of vacuum UV radiation (50 – 190 nm) on microorganisms and DNA, **Advances in Space Research**, v.12, n.4, p.249-253, 1992.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S.J. Risk profile of *Enterobacter sakazakii* an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p.443-454, 2003.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S.J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.378-372, 2004.

JACKSON, B.P.; SNOWDON, D.W. **Atlas of Microscopy of Medicinal Plants, Culinary Herbs and Spices**, Boston: CRC Press, 2000, p. 329-330.

JENNER, P. What processes cause nigral cell death in Parkinson's disease? **Neurologic Clinics**, v.10, p.387-410, 1992.

KALLINGS, O.; RINGERTZ, O.; SILVERSTOPE, L.; ERNERFELDT, F. Microbiological contamination of medical preparations. **Acta pharmaceutica Suecica**, v.3, n.3, p.219-228, 1966.

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

KIM, M.; YOON, H.; BYUN, M. Effects of gamma irradiation on microbial contamination and extraction yields of Korean medicinal herbs. **Radiation Physics Chemistry**, v.57, p.55-58, 2000.

KNEIFEL, W.; CZECH, E.; KNOPP, B. Microbial Contamination of medicinal plants – a review. **Planta Medica**, v.68, n.1, p. 5-15, 2002.

KOMARMY, L.; OXLEY, M.E.; BRECHER, G. Hospital-acquired salmonellosis traced to carmine dye capsules. **The New England journal of medicine**, v.276, n.15, p.850-852, 1967.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.204, 217-218.

KREIG, N.R.; HOLT, J.G. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: BERGEY, D.H.; HOLT, J.G., eds. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.175.

LAROUSI, M.; LEIPOLD, F. Evaluation of Roles of Reactive Species, radiation in Inactivation of bacterial Cells By Air Plasmas at Atmospheric. **Journal of Mass Spectrometry**, v.233, p.81-86, 2004.

LAROUSI, M.; MENDIS, D.A.; ROSENBERG, M. Plasma interaction with microbes. **New Journal of Physics**, v 5, n.41, p.1-10, 2003.

LECLERC, H. Biochemical study of pigmented Enterobacteriaceae. **Annales l'Institut Pasteur**, v.102, p.726-741, 1962.

LECLERCQ, A.; WANEGUE, C.; BAYLAC, P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1631-1638, 2002.

LEHNER, A.; STEPHAN, R. Microbiological, Epidemiological, and Food Safety Aspects of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Food Protection**, v. 67, n.12, p.2850-2857, 2004.

LEHNER, A ; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm Formation, Extracellular Polysaccharide Production, and Cell-to-Cell Signaling in Various *Enterobacter sakazakii* Strains: Aspects Promoting Environmental Persistence., **Journal of Food Protection**, v.68, n.11, p.2287-2294, 2005.

LENOBLE, M. ; FOURNIAT, J.; BOURLIOX, P.; PARIS, M.; MAGHAMI, P.; GERMAN, A. Contrôle de la qualité microbiologique d'échantillons de *Mentha piperita* de diverses origines géographiques. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 38, n.4, p. 333-342, 1980.

LEROUGE ,S.; FOZZA, A. C.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; YAHIA, L.H. Sterilization by low-pressure plasma; the role of vacuum-ultraviolet radiation. **Plasmas and Polymers**, v.5, p.31-46, 2000.

LII, C. Y.; LIAO, C.D.; STOBINSKI, L.; TOMASIK, P. Effects of hydrogen, oxygen, and ammonia low-pressure glow plasma on granular starches. **Carbohydrate polymers**, v. 49, p. 449-456, 2002.

LUO, Y. *Ginkgo biloba* neuroprotection: therapeutic implications in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.3, n.4, p.401-407, 2001.

LUTOMSKY, J.; KEDZIA, B.P. Mycoflora of crude drugs. Estimation of mould contaminations and their toxicity. **Planta Medica**, v.40, n.2, p. 212-217, 1980.

MANDEEL, Q.A. Fungal contamination of some imported spices. **Mycopathologia**, Den Haag, v.159, p.291-298, 2005.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. p.60-61.

MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L.; DIAS, M.I.; BERNADO F. Evaluation of microbiological quality of medical plants used in natural infusions, **International Journal and Food Microbiology**, v.68, p.149-153, 2001.

MASAGO, R.; MATSUDA, T.; KIKUCHI, Y.; MIYAZAKI, Y.; IWANAGA, K.; HARADA, H., and KATSUURA, T. Effects of inhalation of essential oils on EEG activity and sensory evaluation **Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science**, v.19, n.1, p.35-42, 2000.

MEAD, J. Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. In: PRYOR, W.A., ed. **Free radicals in biology**. New York: Academic Press, 1976. p.51-68.

MELO, E.C.; RANDÜZ, L.L.; MELO, R.C.A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais, engenharia na agricultura, Viçosa, MG. **Nova Técnica**, v.12, n.4, p.307-315, 2004. Disponível em: www.esalq.usp.br/siesalq/pm/v12n4p307-315.pdf. Acesso em: 9 jan. 2006.

MEDINA, J.M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; CALVO, D.; PALADINI, A. Neuroactive flavonoids: new ligands for the benzodiazepine receptors, **Phytomedicine**, v.5, n.3, p.235-243, 1998. Disponível em: www.qb.ffyb.uba.ar/publicaciones-md.htm. Acesso em: 9 jan. 2006.

MIGDAL, W.; OWCZARCZYK, B.; KEDZIA, B.; HOLDERNA- KEDZIA, E.; SEGIET-KUJAWA, E. The effect of ionizing radiation on microbiological descontamination of medical herbs and biologically active compounds. **Radiation Physics and Chemistry**, v.52, n.1, p.91-94, 1998.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; MORTEAU, S.; PELLETIER, J.; ABRIZIANI, M.; YAHIA, L. H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.226, p.1-21, 2001.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; CREVIER, M.C.; PELLETIER, J.; PHILIP, N.; SAOUDI, B. Plasma sterilization methods and mechanisms, **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.3, p.349-358, 2002.

Monographs of **Widely used Medicinal Plants**. Munich: World Health Organization WHO/ TRM/ 96.3. 1996.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 8.ed. Washington: ASM Press, 2003. v.1, p.423.

NAEMURA, L.; SEIDLER, R.J. Significance of low-temperature growth associated with the fecal coliform response, indole production, and pectin liquefaction in *Klebsiella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.35, n.2, p.392-396, 1978.

NEGRETTI, F. Ricerche sulla contaminazione microbica dei prodotti fitoterapici. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.122, p.440-451, 1983.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D.; **Herbal medicines: a guide for health-care professionals**. London: Pharmaceutical Press, 1996. p.69-70.

NORMARK, S. β -Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. **Microbial Drug Resistance**, v.1, n.2, p.111-114, 1995.

O'BRIEN J.; DESMOND, P.; AMES, D.; SCHWEITZER, L.; HARRIGAN, S.; TRESS, B. A magnetic resonance imaging study of white matter lesions in depression and Alzheimer's disease. **British Journal of Psychiatry**, v.168, p.477-485, 1996.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.6-22, 127-128, 217-218.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.22, 43, 141-146.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Directrices de la OMS, sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2003. p.25-27.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. Scotyping of *Klebsiella*. **Methods in Microbiology**, v.14, p.143-164, 1984.

OWCZARCZYK, H. B.; MIGDAL, W.; KADZIA, B. The pharmacological activity of medical herbs after microbiological decontamination by irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.57, p.331-335, 2000.

PARISI, A.N.; YOUNG, W.E. Sterilization with ethylene oxide and other gases. In: BLOCK, S.S., ed. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p.580-595.

PARK, J.T. Why does *Escherichia coli* recycle its cell wall peptides? **Molecular Microbiology**, v.17, n.3, p.424-426, 1995.

PATON, A.W.; PATON, J.C. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.463-465, 1996.

PHILIP, N.; SAOUDI, B.; CREVIER, M.C.; MOISAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J. The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: the case of N₂-O₂ mixtures. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.30, n.4, p.1429-1435, 2002.

PINCEMAIL, J.; DUPUIS, M.; NASR, C.; HANS, P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R.; DELBY, C. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. **Experientia**, v. 45, n.8, p.708-712, 1989.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.83-84.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.11, p. 349-352, 1992.

PRATT, L.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type pili. **Molecular Microbiology**, v.30, n.2, p.285-294, 1998.

REINA, J.; ALOMAR, P. *Enterobacter taylorae* wound infection. **Clinical Microbiology Newsletter** v.11, p.134-135, 1989.

REINA, J.; SALVA, F.; GIL, J.; ALOMAR, P. Urinary tract infection caused by *Enterobacter taylorae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.12, p.2877, 1989.

RIZZO, I.; VEDOYA, G.; MAURUTTO, S.; HAIDUKOWSKI, M.; VARSAVSKY, E. Assesment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. **Microbiological Research**, v.159, n.2, p.113-120, 2004.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, v.55, n.1, p.35-58, 1991.

ROY, A.K.; CHOURASIA, H.K. Mycoflora, mycotoxin producibility and mycotoxins in traditional herbal drugs from India. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.36, p. 295-302, 1990.

RUBINSTEIN, E.M.; KLEVJER-ARDERSON, P.; SMITH C.A.; DROUIN M.T., PATTERSON J.E. *Enterobacter taylorae*, a new opportunistic pathogen: report of four cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.249-254, 1993.

RUIPERÉZ, F.H.; GUTIÉRREZ, M.A.P.; DIAZ, J.M.C.; RIOS, R.M.; TRUEBA, E.O. Valoración nutritiva de residuos de cosecha de alcachofra (*Cynara scolymus* L.): hojas desecadas al sol y planta completa ensilada. **Archivos de Zootecnia**, v.41, p.257-264, 1992.

RUTALA, W.A. Desinfection and sterilization of patient-care items. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.6, p.377-384, 1996.

SANTOS, P.R.V.; OLIVEIRA, A.C.X.; TOMASSINI, T.C.B.; Controle Microbiológico de produtos fitoterápico. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.31, n.1, p.35-38, 1995.

SATOMI, L.C. **Estudo da aplicabilidade do processo de descontaminação de drogas vegetais empregando óxido de etileno**. São Paulo, 2003. 113p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SCHONHEYDER, H.C.; JENSEN, K.T.; FREDERIKSEN, W. Taxonomic notes: synonymy of *Enterobacter cancerogenus* (Urosevic 1996) Dickey and Zumoff 1988 and *Enterobacter taylorae* farmer *et al.* 1985 and resolution of na ambiguity in the biochemical profile. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.3, p.586-587, 1994.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Rational phytotherapy: a physicians'guide to herbal medicine**. 4.ed. Berlim, New York: Springer, 2001, p. 304.

SEIDLER, R.J.; KNITEL, M.D.; BROWN, C. Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. **Applied Microbiology**, v. 29, n.6, p.818-825,1975.

SHIBATA, M.; MAKABE, T.; NAKANO, N. A novel sustaining mechanisms in capacitively coupled radio-frequency plasma in oxygen. **Japanese Journal of Applied Physics**, v.37, p.4182-4185, 1998.

SHINTANI, H. The relative safety of gamma ray, autoclave, and ethylene oxid gas sterilization of the thermosetting polyurethane. **Biomedical Instrumentation & Technology**, v.29, n.6, p.513-519, 1995.

SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P.; BEVALOT, F.; VAGUETTE J. Les propriétés antifongiques des cistacéas et plus particulièrement de *Cutis laurifolius* L: role des tanins non hydrofysables. **Fitoteapia**, v.53, p.45-48, 1982.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004, p.167, 318, 833.

SKLADAL, P.; MASCINI, M.; SALVADORI, C.; ZANNONI, G. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using a L-lactate biosensor. **Enzyme and microbial technology**, v.15, p.508-512, 1993.

SORIANI, R.R.; SATOMI, L.C.; PINTO, T.J.A. Effects of ionizing radiation in ginkgo and guarana. **Radiation Physics Chemistry**, v.73, n.4, p.239-242, 2005.

SPERONI, E.; CERVELLATI, R.; GOVONI, P.; GUIZZARDI, S.; RENZULLI, C.; GUERRA M.C., Efficacy different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p.203-211, 2003.

STRAUSBAUGH, L.J.; GILMORE, M.S. *Enterococcal* infections. In: STEVENS, D.L.; KAPLAN, E.L., eds. **Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis**. New York, Oxford: Oxford University Press, 2000. p.280-301.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997, p.167

TRABULSI, L.R.; ALTYHERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2002, p.423-424.

UNITED States Pharmacopeia, 25ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.200-206, 1846-1849, 1976-1981.

UNITED States Pharmacopeia, 28ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.2062-2063, p.2094-2095, p.2244 – 2251 e p.2681-2682.

VARGA, E.; BODI, A.; FERDINANDY, P.; DROY-LEFAIX, M.T.; BLASIG, I.E.; TOSAKI, A. The protective effect of Egb761 in isolated ischemic/reperfused rat hearts: a link between cardiac function and nitric oxide production. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, p.711-717, 1999.

WEISS, R.F.; FINTELMANN, V. **Herbal medicine**. 2.ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; New York: Thieme New York, 2000, p.41-42.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO, 1999. 289p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality Control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO. 1998. 115p

YOSHIZAWA, S.; HORIUCHI, T.; FUJIKI, H.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T.; SUGIMURA T. Antitumor promoting active osf (-) Epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. **Phytotherapy Research**, v.1, n.1, p.44-47, 1987.

YOUNG, J.H. New specialization technologies. In: REICHERT, M.; YOUNG, J.H., eds. **Sterilization technology for the health care facility**. 2.ed. Gaithersburg: Aspen, 1997. p.228-235.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B., eds. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. . Chapecó: Argos, 2001. p.13, 298. (Série Didática).