

## Avaliação dos Efeitos da Radiação Gama ( $Co^{60}$ ) Sobre Princípios Ativos e Carga Microbiana de Plantas Medicinais

Dall'Agnol, L.

Herbarium Laboratório Botânico Ltda, Depto. de Garantia da Qualidade, 83403-500 Colombo – PR

**RESUMO:** Amostras de Funcho (*Foeniculum vulgare* Miller, fructus), Guaraná (*Paullinia cupana*, Kunth, semen), Ginkgo (*Ginkgo biloba*, L., folium) e Kawa-Kawa (*Piper methysticum* G. Forst, rhizoma), foram submetidas a doses escalonadas (0 a 25 KGy) de radiação gama ( $Co^{60}$ ), utilizando-se a metodologia do teste em cego. Em seguida, as amostras foram analisadas, qualitativamente e quantitativamente, em relação aos seus princípios ativos e carga microbiana. Os resultados quantitativos não apresentaram diferenças significativas entre a amostra testemunha (0 KGy) e as demais. Qualitativamente os cromatogramas obtidos mostraram-se idênticos, independente do fato de tratar-se de uma droga irradiada ou não. Com relação à carga microbiana observou-se uma redução significativa na ordem de 10000 UFC/g a partir da dose de 5 KGy. Conclui-se que o processo de descontaminação com radiação gama ( $Co^{60}$ ) pode ser utilizado como uma alternativa para descontaminação de plantas medicinais e que este trabalho deve ser estendido a todas as plantas submetidas a este processo. Além disso, métodos de maior especificidade e precisão deverão ser utilizados para verificação de possíveis alterações estruturais nas moléculas dos ativos vegetais.

**Palavras-chave:** Efeitos de radiação, raios gama, plantas medicinais, Ginkgo biloba, Piper Methysticum(Homeopatia), Guaraná.

**ABSTRACT: Gamma Radiation ( $Co^{60}$ ) effects on active substances and microbe burden of medicinal plants.** In order to evaluate the effects of radioactivity on active vegetal substances, samples of Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller., fructus), Guarana (*Paullinia cupana*, Kunth, semen), Ginkgo (*Ginkgo biloba*, L., folium), and Kawa-Kawa (*Piper methysticum* G. Forst, rhizoma), were treated with scaling doses (0 to 25 KGy) of gamma radiation ( $Co^{60}$ ). The "blind test" methodology was used. The active substances from each sample were analyzed by qualitative and quantitative methods after radiation. There were no significant differences seen between the control sample (0 KGy) and the irradiated samples. Microbe contamination was significantly reduced, about 10000 CFU/g, with the initial 5 KGy dose. It was concluded that gamma radiation can be used as an alternative procedure to reduce microbiologic contamination in medicinal plants. Before this procedure can be extended to other medicinal plants, more specific analytical methods are recommended to verify possible structural alterations in active vegetal molecules.

**Keywords:** Radiation effects, gamma rays, Medicinal plants, Ginkgo biloba, Piper methysticum(Homeopathy), Guarana.

### INTRODUÇÃO

A utilização de medicamentos a base de plantas medicinais é uma área em plena expansão e, juntamente com este fato, observa-se uma busca constante em garantir, ao consumidor, a qualidade dos mesmos através do desenvolvimento de diversos ensaios sobre suas respectivas matérias-primas.

Sabe-se que plantas medicinais possuem, naturalmente, uma carga microbiana elevada, proveniente, especialmente do solo, podendo variar entre  $10^2$  e  $10^8$  UFC/g (Loggia, 1993). De acordo com os limites microbianos estabelecidos pela WHO, 1992 para drogas vegetais (Tabela 1), freqüentemente faz-se necessária a utilização de processos de redução da carga microbiana. Dentre os vários métodos descritos na literatura

destaca-se a descontaminação com vapor d'água. Entretanto este método não é suficientemente universal e possui custo muito elevado para ser utilizado na rotina. Porém, um método que vem apresentando um crescente volume de aplicação é a irradiação através de fontes de  $Co^{60}$ . Como vantagens, apresenta as seguintes características: diminuição significativa da carga microbiana, especialmente de fungos; é um método simples, moderno, validável, limpo e de baixo custo, quando comparado com os demais processos; é autorizado em vários países europeus como Bélgica, Dinamarca, Grã-Bretanha, Itália e Holanda; doses de radiação de 6 a 10 KGy são suficientes para descontaminação sem acarretar radioatividade às drogas; (Saint-Lebe *et al*, 1985); o processo não deixa resíduos e não provoca elevação da temperatura e umidade; o produto pode ser processado já embalado.

Recebido para publicação em 12.02.01 e aceito para publicação em 30.03.01.

**TABELA 1.** Especificações Microbiológicas para Plantas Medicinais - WHO, 1992.

Microorganismos	Plantas de uso interno	Plantas de uso tópico/infuso
Aeróbios mesófilos (UFC/g)	máx. $5,0 \times 10^5$	max. $5,0 \times 10^7$
Fungos e Leveduras (UFC/g)	máx. $5,0 \times 10^3$	máx. $5,0 \times 10^3$
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausência
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência
<i>Escherichia coli</i>	máx. $5,0 \times 10^1$	máx. $5,0 \times 10^2$
Outras Enterobactérias (UFC/g)	máx. $5,0 \times 10^3$	máx. $5,0 \times 10^4$

Entretanto, estudos e dados em literaturas disponíveis sobre os efeitos da radiação sobre os componentes químicos destes produtos são praticamente inexistentes, provavelmente devido à grande variedade e complexidade química dos fitoterápicos e, em alguns casos, até mesmo o desconhecimento do princípio ativo destes produtos.

Devido à grande preocupação existente na comunidade científica e nas indústrias de fitoterápicos no que se refere à possível ocorrência de alterações estruturais na composição química das plantas medicinais, o trabalho teve como objetivo avaliar qualitativamente e quantitativamente, o efeito de doses escalonadas de radiação gama ( $Co^{60}$ ) sobre os princípios ativos vegetais, e relacionar a dose radioativa com a redução da carga microbiana. O trabalho foi realizado em conjunto com o Departamento Técnico Científico da EMBRARAD, Empresa Brasileira de Esterilização.

## MATERIAL E MÉTODO

### 1. Material Vegetal

As espécies vegetais selecionadas para a realização do trabalho foram as seguintes: Funcho - *Foeniculum vulgare* Miller, *fructos*; Guaraná - *Paullinia cupana* Kunth, *sêmen*; Ginkgo - *Ginkgo biloba* L., *folium*; Kava-Kava - *Piper methysticum* G. Foster, *rhizoma*.

As espécies foram selecionadas obedecendo, basicamente, a dois critérios, a saber: parte usada (frutos, sementes, folhas e raiz) e tipos de princípios ativos (óleo essencial, alcalóides, flavonóides e lactonas terpênicas).

Após identificação botânica, as espécies foram processadas na forma de pó e seis amostras de 500g de cada espécie vegetal foram embaladas em embalagens plásticas devidamente seladas. Das seis amostras, cinco representaram os corpos de prova e uma correspondeu à testemunha. Em seguida, as amostras foram encaminhadas a EMBRARAD.

### 2. Controles Microbiológicos

Em todas as espécies vegetais foram determinados os níveis de aeróbios mesófilos, fungos e leveduras e pesquisa de patógenos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp). Os métodos utilizados foram os preconizados pela WHO, 1992.

### 3. Controles Qualitativos e Quantitativos

#### 3.1. Dosagem de Cafeína no Guaraná

A cafeína foi determinada gravimetricamente através do método descrito na Farmacopéia Brasileira II. A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando-se as seguintes condições (Wagner, 1996).

Fase Móvel: Acetato de etila 100,0  
Metanol 13,5  
Água 10,0

Fase estacionária: sílica gel 60F<sub>254</sub> Merck

Revelador:

Solução I: 1g de iodeto de potássio e 1g de iodo em 100ml de etanol

Solução II: 25ml de ácido clorídrico a 25% com 25ml de etanol 96%

#### 3.2. Dosagem de Óleo Essencial no Funcho

O teor de óleo essencial do funcho foi determinado por arraste de vapor de acordo com a Farmacopéia Brasileira III. A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando-se as seguintes condições (Wagner, 1996).

Fase Móvel: Tolueno 93  
Acetato de Etila 07

Fase estacionária: sílica gel 60F<sub>254</sub> Merck

Revelador: Vanilina Sulfúrica

#### 3.3. Dosagem de Flavonóides Totais calculados como Hiperosídeo no Ginkgo

A determinação dos flavonóides totais foi realizada através de método espectrofotométrico de acordo com a Farmacopéia Helvética VII edição. A instrumentação utilizada foi espectrofotômetro UV-VIS marca Shimadzu 1601.

A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando-se as seguintes condições(Wagner, 1996).

Fase Móvel: Clorofórmio 75,0  
Acetona 16,5  
Ácido Fórmico 8,5

Fase estacionária: sílica gel 60F<sub>254</sub> Merck

Reveladores:

Solução I - ácido difenilbórico a 1% em metanol(NP)

Solução II - polietilenoglicol-4000 a 5% em etanol (PEG)

Visualização em luz ultravioleta 365nm

### 3.4. Dosagem de Kavalactonas na Kava-Kava

A determinação de kavalactonas totais foi realizada gravimetricamente conforme descrito por Koch *et al* (1973). A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando-se as seguintes condições(Wagner, 1996).

Fase Móvel: n-Hexano 70  
Acetato de etila 30

Fase estacionária: sílica gel 60F<sub>254</sub> Merck

Revelador: Anisaldeído sulfúrico

### 3.4. Tratamento pela Radiação Gama

O tratamento foi realizado na EMBRARAD, Empresa Brasileira de Esterilização e a metodologia utilizada foi a de teste em cego, onde as amostras foram identificadas com nomes próprios (Karl, David, Ary, Eduardo, Paulino e Donizete). Em seguida, as amostras foram submetidas a doses escalonadas de radiação

gama: 0 KGy (tes-temunha), 5, 10, 15, 20 e 25 KGy. A dose a que cada amostra foi submetida permaneceu sob a responsabilidade da EMBRARAD até que todas as amostras fossem reavaliadas quanto às suas características físico-químicas e microbiológicas. Por fim, os resultados obtidos foram comparados com as respectivas doses de radiação a que foram submetidas.

A radiação utilizada foi proveniente de uma fonte radioativa de Co<sup>60</sup>.

## RESULTADO

### 1. Controles Microbiológicos

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram os resultados obtidos e indicam que houve uma redução significativa da carga microbiana na ordem de 10000 UFC/g a partir da dose de 5 KGy.

### 2. Controles Analíticos

Na Tabela 6 são apresentados os resultados quantitativos dos princípios ativos vegetais e pode-se observar que não houve alteração significativa em nenhuma das amostras submetidas à irradiação.

As figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam os cromatogramas das seis amostras de cada espécie vegetal sem o tratamento (testemunha) e após tratamento com radiação gama. Qualitativamente os cromatogramas obtidos mostraram-se idênticos, independente do fato de tratar-se de uma droga irradiada ou não.

**TABELA 2.** Efeitos dos raios gama sobre a carga microbiológica do Funcho (*Foeniculum vulgare*)

Microorganismos	Ary Testemunha (0KGy)	Paulino (5KGy)	Donizete (10 KGy)	David (15 KGy)	Eduardo (20 KGy)	Karl (25 KGy)
Aeróbios mesófilos (UFC/g)	6,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
Fungos e Leveduras (UFC/g)	9,0 x 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
Patógenos	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Outras Enterobactérias (UFC/g)	1,0 x 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>

**TABELA 3.** Efeitos dos raios gama sobre a carga microbiológica do Guaraná (*Paullinia cupana*).

Microorganismos	Ary Testemunha (0KGy)	Paulino (5KGy)	Donizete (10 KGy)	David (15 KGy)	Eduardo (20 KGy)	Karl (25 KGy)
Aeróbios mesófilos (UFC/g)	$8,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
Fungos e Leveduras (UFC/g)	$2,5 \times 10^4$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
Patógenos	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Outras Enterobactérias (UFC/g)	$1,2 \times 10^4$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$

**TABELA 4.** Efeitos dos raios gama sobre a carga microbiológica do Ginkgo (*Ginkgo biloba*).

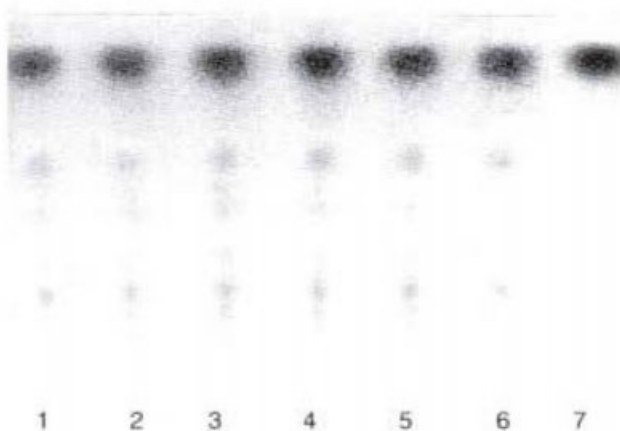
Microorganismos	Ary Testemunha (0KGy)	Paulino (5KGy)	Donizete (10 KGy)	David (15 KGy)	Eduardo (20 KGy)	Karl (25 KGy)
Aeróbios mesófilos (UFC/g)	$2,1 \times 10^4$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
Fungos e Leveduras (UFC/g)	$2,8 \times 10^4$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
Patógenos	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Outras Enterobactérias (UFC/g)	$7,0 \times 10^4$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$

**TABELA 5.** Efeitos dos raios gama sobre a contaminação microbiológica da Kava-Kava (*Piper methysticum* Forst).

Microorganismos	Ary Testemunha (0KGy)	Paulino (5KGy)	Donizete (10 KGy)	David (15 KGy)	Eduardo (20 KGy)	Karl (25 KGy)
Aeróbios mesófilos (UFC/g)	$5,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^3$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
Fungos e Leveduras (UFC/g)	$4,4 \times 10^6$	$7,7 \times 10^2$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
Patógenos	$4,0 \times 10^2$ UFC/g <i>E. coli</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Outras Enterobactérias (UFC/g)	$1,0 \times 10^4$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$

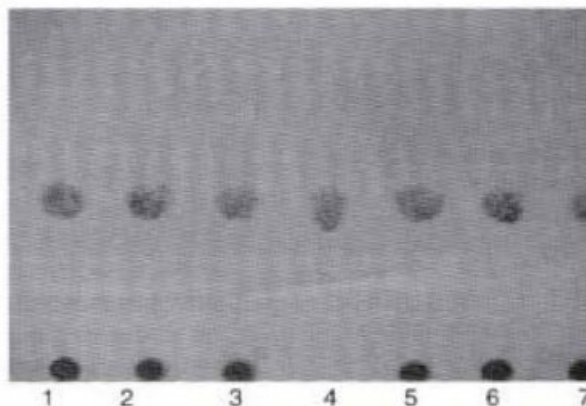
**TABELA 6.** Efeitos dos raios gama sobre o teor de Princípios Ativos Vegetais (%).

Material Vegetal	Ary Testemunha (0KGy)	Paulino (5KGy)	Donizete (10 KGy)	David (15 KGy)	Eduardo (20 KGy)	Karl (25 KGy)
<i>Foeniculum vulgare</i> (óleo essencial)	1,3	1,3	1,3	1,2	1,3	1,3
<i>Paullinia cupana</i> (cafeína)	3,5	3,6	3,8	3,9	4,1	4,2
<i>Ginkgo biloba</i> (flavonóides totais)	0,95	0,93	0,94	0,94	0,94	0,92
<i>Piper methysticum</i> (Kavalactonas totais)	6,2	6,3	6,5	6,1	6,4	6,3



**FIGURA. 1.** *Fingerprint Foeniculum vulgare*

- 1- Ary (Testemunho)
- 2- Paulinio (5Kgy)
- 3- Donizete (10Kgy)
- 4- David (15Kgy)
- 5- Eduardo (20 KGy)
- 6- Carl (25Kgy)
- 7- Padrão Trans-Anetol 1:30 em tolueno (Rf 0,86)



**FIGURA. 2.** *Fingerprint Paullinia cupana*

- 1- Ary (Testemunho)
- 2- Paulinio (5Kgy)
- 3- Donizete (10Kgy)
- 4- Padrão Cafeína 0,5% tolueno (Rf0, 45)
- 5- Davi (15Kgy)
- 6- Eduardo (20 Kgy)
- 7- Carl (25KGy)

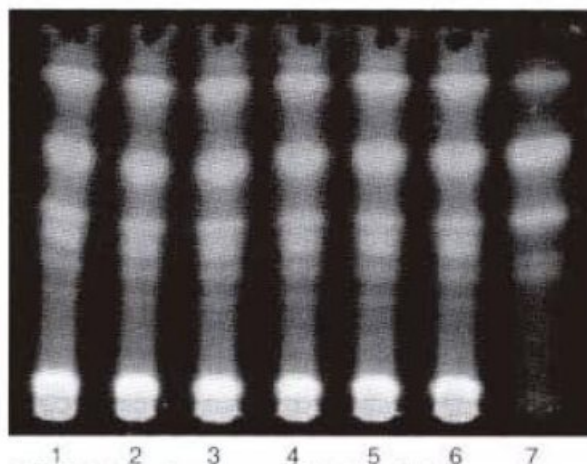


FIGURA. 3. *Fingerprint Ginkgo biloba*

- 1- Ary (Testemunho)
- 2- Paulinio (5Kgy)
- 3- Donizete ( 10Kgy)
- 4- Davi ( 15Kgy)
- 5- Eduardo (20 Kgy)
- 6- Carl (25Kgy)
- 7- Padrão Bilobetina(Rf 0,45), Ginkgetina(Rf0, 6), Sciadopitysina(Rf0, 8)

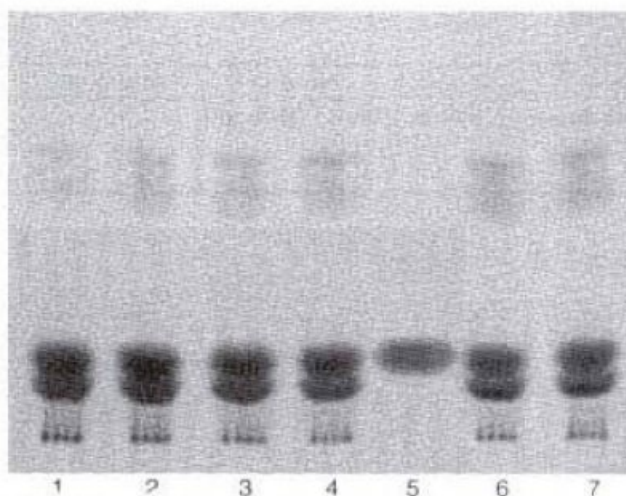


FIGURA. 4. *Fingerprint Piper methysticum*

- 1- Ary (Testemunho)
- 2- Paulinio (5Kgy)
- 3- Donizete (10Kgy)
- 4- Davi (15Kgy)
- 5- Padrão Kavaína (Rf 0,25)
- 6- Eduardo (20 Kgy)
- 7- Carl (25Kgy)

## DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos observou-se a grande eficácia da radiação gama na redução da carga microbiana de materiais vegetais, já citada e comprovada em muitas literaturas. Amostras submetidas a doses de 5 KGy apresentaram redução da carga microbiana de até 10000 UFC/g. Este resultado confirma dados em literatura que especificam que doses de 6 a 10 KGy são suficientes para reduzir a carga bacteriana aos níveis desejáveis. Uma contaminação inferior a  $10^4$  não justifica um

tratamento ionizante. Ao contrário, uma planta apresentando uma contaminação superior a  $10^6$  deve ser eliminada, pois é considerada como material em estado de degradação e, portanto, a radiação ou qualquer outro método de descontaminação deve ser evitado.

Com relação aos efeitos da radiação gama sobre o teor de princípios ativos vegetais testados neste trabalho (óleo essencial, cafeína, flavonóides e lactonas terpênicas), os resultados demonstraram que não houve diferença entre os

valores da amostra testemunha (0 KGy) e demais amostras irradiadas, com exceção do Guaraná onde se observou um pequeno aumento no teor de cafeína proporcional ao aumento das doses de radiação gama. Este fato pode estar relacionado ao efeito das radiações gama sobre as cadeias poliosídicas que se traduz em uma ação favorável ao nível de membranas celulares, facilitando a difusão para o exterior dos princípios ativos contidos nas drogas vegetais (Sincholle *et al.*, 1987). Também, não foram observadas alterações nos cromatogramas de nenhuma das amostras, o que pode sugerir que não houve alterações qualitativas nos materiais vegetais submetidos à radiação gama que pudessem ser detectados através da metodologia empregada. Estes resultados sugerem que os ativos vegetais testados apresentam estabilidade ou radioproteção (Sincholle *et al.*, 1987) frente a doses de radiação gama de até 25 KGy.

### CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o processo de descontaminação com radiação gama ( $Co^{60}$ ) pode ser utilizado como uma alternativa para a descontaminação de plantas medicinais. Entretanto, salienta-se que este trabalho deve ser estendido a todas as plantas submetidas a este processo e que métodos de maior especificidade e precisão deverão ser utilizados para a verificação de possíveis alterações estruturais nas moléculas dos princípios ativos vegetais. Além disso, recomenda-se que ações preventivas devem ser tomadas no sentido de evitar ou diminuir a contaminação microbiana das plantas medicinais. Estas ações podem ser efetuadas através do processo de qualificação dos fornecedores de matérias-primas vegetais, onde procedimentos de Boas Práticas Agrícolas, especialmente relacionados aos processos de colheita, secagem e armazenagem, devem ser colocados em prática. Com a redução da carga microbiana durante o processamento das drogas vegetais pode-se evitar o uso de processos de descontaminação e, desta forma, utilizar os materiais vegetais da forma oferecida pela natureza.

### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BLAZEK, J. Radio sterilization of drugs, II sterilization of chamomile. *Pharmazie*, v. 28, n. 5, p. 339-340, 1973.

- CHAIGNEAU, M., MURAZ, B. Sur des produits résiduels de la désinfection des plantes médicinales par l'oxyde d'éthylène. *Ann.Pharmaceutiques Françaises*, v. 44, n. 5, p. 339-346, 1987.
- CHEN, G., TAN, X., LUO, M. Quality observations of certain chinese herbal drugs and patent drugs after sterilization with cobalt-60 radiation. *Zhongcaoyao*, v. 12, n.12, p. 541-542, 1981.
- KABELITZ, L. Mikrobiologische belastungen na heil-und gewürzpflanzen. *Arznei-und Gewürzpflanzen*, v. 1, p. 9-16, 1996.
- KARMAZIN, M., DLOUHA, J., LUDVA, J. Decontamination of alkaloid drugs by ionizing radiation. *Ceskoslovenska Farmacie*, v. 39, n. 1, p. 18-21, 1990.
- KOCH, M. et al. Dosage des kawalactones totales et des dihyabro-5,6 kawalactones dans les préparations de kawa (*Piper methys-ticum* Forst, Pipéracées). *Annales Pharmaceutiques Française*, v. 31, n. 2, p. 133-138, 1973.
- LOGGIA, R. Della. *Piante Ufficiali per infusi e tisane*. Milano: Organizzazione Editoriale Medico Farmaceutica, p.35., 1993
- PHARMACOPEA Helvética. 7<sup>a</sup> ed. Berne : Departement Federal de L'interieur, 1994. 6 V. (Edição Francesa)
- SAINT-LEBE, L., HENON, Y., THERY, V. **Le traitement\_ionisant des produits secs et deshydrates** : cas des plantes medicinales a infusion. France: Agence Internationale de l'Energie Atomique Organisation des Nations Uniers pour l'Alimentation et l'Agriculture, 1985.
- SINCHOLLE, D. et al. Medicinal plants and decontamination. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* v. 62, n. 1, p. 14-18, 1987.
- STUYCK, S. et al. Influence of gamma ionizing radiation on antioxidative effect of plant polyphenolic parts. *Journal de Chimie Physique et de Physico Chimie Biologique*, v. 95, n. 4, p. 871-874, 1998.
- WAGNER, H., BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer-Verlag, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Microbial contamination limits in medicinal plant materials. In:\_\_\_\_\_. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva : WHO, 1992. p. 59-61.
- YOOK, H-S et al. Effects of ionizing energy and ozone treatment on the microbial decontamination and physicochemical properties of aloe powders and been pollen. *Journal Food Science Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 89-95, 1997.
- ZAIED, S.E.A., AZIZ, N.H., ALI, A.M. Comparative effects of washing, thermal treatments and gamma irradiation on quality of spices. *Nahrung*, v. 40, n. 1, p. 32-36, 1996.