

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE PRODUTO SECO
POR ASPERSÃO DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. COM
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

ISIS COSTA RODRIGUES

MANAUS
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

ISIS COSTA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE PRODUTO
SECO POR ASPERSÃO DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy
COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza

Co-Orientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

**MANAUS
2013**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Rodrigues, Isis Costa

R696d Desenvolvimento e padronização de produto seco por aspersão de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy com atividade antifúngica / Isis Costa Rodrigues. - Manaus: UFAM, 2013.
139 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) —
Universidade Federal do Amazonas, 2013.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tatiane Pereira de Souza

Co-orientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

1. Plantas medicinais 2. Medicina popular 3. Farmacologia 4.
Vismia guianensis I. Souza, Tatiane Pereira de (Orient.) II. Souza,
João Vicente Braga de (Co-orient.) III. Universidade Federal do
Amazonas IV. Título

CDU 633.88:582.684.1(043.3)

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE PRODUTO SECO POR ASPERSÃO
DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

ISIS COSTA RODRIGUES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, Linha de pesquisa: Desenvolvimento, Avaliação da Qualidade e da Utilização de Insumos e Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Prof^a. Dra Marne Carvalho de Vasconcellos
Coordenadora PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof^a. Dra. Tatiane Pereira de Souza – Presidente e Orientadora
Universidade Federal do Amazonas

Dr. João Vicente Braga de Souza – Co-orientador

Prof^a. Dra. Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi – Membro Externo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^a. Dra Nikeila Chacon de Oliveira Conde – Membro Externo
Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 15 de março de 2013.

Dedico à minha família: aos meus pais Maristela Costa e Francisco dos Santos e ao meu irmão Israel, pelo apoio incondicional, pela dedicação durante todos esses anos, pelo incentivo, pelo carinho, pelo amor, pelas palavras de conforto nas horas difíceis, pelo exemplo, por serem o meu porto seguro, por não medirem esforços para que eu chegasse a esta etapa da minha vida, por tudo que representam pra mim... Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, que plantou em mim um sonho que hoje se materializa.

À professora Dr.^a Tatiane Pereira de Souza pela orientação durante todos esses anos, pela confiança em mim, pela paciência, pelo exemplo profissional, pelos ensinamentos e pelo incentivo, que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao Dr. João Vicente Braga de Souza pelo auxílio, pelos ensinamentos, pelo bom humor, e pela disponibilidade de seu laboratório.

Ao Dr. Pedro Ros Petrovick pelo auxílio, atenção e pela disponibilidade de seu laboratório.

Ao Dr. Francisco Célio Chaves que sempre me auxiliou nas coletas e na confecção da excicata.

A Dr.^a Gilsane Von Poser pela colaboração.

Aos técnicos do Laboratório de Micologia do INPA: Dona Eliana, Seu Rosalvo e Ana Cláudia que sempre me ajudaram no que precisei.

Aos Técnicos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Dorotéia Couto e Newton pela colaboração.

Aos amigos Daniel Simpson e Chanderlei Tavares pela amizade, pelas conversas, pelas gargalhadas, pela companhia, pelo incentivo e por nunca deixarem meus dias monótonos com suas brincadeiras.

Às amigas Jane Vasconcelos, Carolina Pacheco e Patrícia Daniele pelas conversas, pelo incentivo, por sempre estarem dispostas a ouvir e ajudar.

À Rebeca Valente pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Fabrício Rolim, Jaqueline Marinho, Leidyana Moraes, Lílian Bastos, Marcos Gurgel, Karla Açussena, Gabriel Oliveira pela amizade.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas, com atividades realizadas também no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e no Laboratório de Desenvolvimento Galênico, empregando equipamentos da Central Analítica e do Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico da Faculdade de Farmácia e a Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

Na Amazônia, o uso das plantas medicinais pelas populações nativas e ribeirinhas é uma importante fonte de conhecimentos etnofarmacológicos. Uma das plantas, com propriedade medicinal, muito utilizada é a *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy. A seiva (resina avermelhada) obtida da casca e a infusão das folhas são muito utilizadas, na medicina popular, contra pano branco (*Pitiriase versicolor*) e impinges (*Tinea corporea*). O desenvolvimento dos fungos causadores de dermatoses, entre outros fatores, é favorecido pelo clima tropical da região norte do Brasil. Dessa forma, essa espécie vegetal é bastante promissora para o estudo tecnológico no sentido de transformação do material vegetal em um produto padronizado que possa ser utilizado com segurança e eficácia terapêutica. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e padronização de um produto seco por aspersão de *V. guianensis* com comprovada atividade antifúngica. Para isso, foram utilizadas folhas como matéria-prima vegetal, esta que foi caracterizada através de técnicas farmacopeicas e não farmacopeicas. Através de um planejamento fatorial foi obtida e padronizada uma solução extrativa com atividade antifúngica, a partir da qual foi obtido o ESA (extrato seco por aspersão) e o PSA (produto seco por aspersão), estes que foram caracterizados e avaliados quanto a atividade antifúngica pelo método de microdiluição. Ambos os extratos secos apresentaram atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, *Malassezia furfur* e *Trichophyton rubrum* com CIM (concentração inibitória mínima) que variou de 0,5 a 8 mg/mL, entretanto, o PSA apresentou melhores características de rendimento e de estabilidade física. Com tudo isso, constata-se que os extratos secos por aspersão de *V. guianensis* apresentam características tecnológicas que viabilizam sua futura transformação em uma forma farmacêutica.

Palavras-chave: atividade antifúngica, extrato seco, *Vismia guianensis*.

ABSTRACT

In the Amazon, the use of medicinal plants by native and riverine population is an important source of ethnopharmacological knowledge. One of the plants widely used with medicinal properties, is *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy. The sap (reddish resin) obtained from the infusion of bark and leaves are widely used in folk medicine against white cloth (PV) and impinges (*Tinea corporea*). The development of the fungi that cause skin conditions, among other factors, is favored by the tropical climate of northern Brazil. Thus, this plant species is very promising for technology studying the sensing processing of the plant material in a standardized product which can be used with safety and therapeutic efficacy. In this sense, the present study aimed to the development and standardization of a spray dried extract of *V. guianensis* with proven antifungal activity. For this were used leaves as raw material, such that was characterized by pharmacopoeial techniques and not pharmacopoeial. Using a factorial design was obtained, optimized and standardized a solution with antifungal activity, from which the ESA was obtained (spray dried extract) and PSA (spray dried product), they have also been characterized and these were characterized and evaluated for antifungal activity by microdilution method. Both dry extracts showed antifungal activity against fronts of *Candida albicans*, *Malassezia furfur* and *Trichophyton rubrum* with MIC (minimum inhibitory concentration) ranged from 0,5 to 8 mg / mL, however, the PSA showed better performance characteristics and physical stability. With all this, it appears that the spray dried extracts of *Vismia guianensis* have technological characteristics that enable its future transformation into a pharmaceutical form.

Keywords: antifungal activity, dry extract, *Vismia guianensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Folhas e frutos de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.	42
Figura 2: Fluxograma para obtenção dos extratos de <i>Vismia guianensis</i>	59
Figura 3: Histograma de distribuição granulométrica da Matéria-prima vegetal de <i>V. guianensis</i>	81
Figura 4: Curva de Retenção e Passagem para MPV de folhas de <i>V. guianensis</i>	82
Figura 5: Bioensaio com a finalidade de determinar a CIM dos extratos das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 36232.	84
Figura 6: Concentração inibitória mínima dos extratos polares frente à <i>C. albicans</i>	86
Figura 7: Concentração inibitória mínima dos extratos polares frente à <i>Malassezia furfur</i>	86
Figura 8: Representação gráfica dos efeitos dos fatores principais sobre o resíduo seco.	89
Figura 9: Representação gráfica dos efeitos dos fatores principais sobre o teor de taninos totais.....	92
Figura 10: Representação gráfica da CIM dos ESAs obtidos através do planejamento fatorial frente às cepas de <i>C. albicans</i>	93
Figura 11: Representação gráfica da CIM dos ESA obtidos através do planejamento fatorial frente às cepas de <i>M. furfur</i>	93
Figura 12: Representação gráfica da CIM dos ESA obtidos através do planejamento fatorial frente às cepas de <i>T. rubrum</i>	94
Figura 13: Espectro de varredura da solução extrativa e do padrão epicatequina através de leitura direta.	96
Figura 14: Curva de Calibração para epicatequina.....	97
Figura 15: Curva de calibração do Extrato Seco por Aspersão (ESA).....	99
Figura 16: Extrato seco por aspersão de <i>V. guianensis</i> sem adjuvante (ESA) e com adjuvante (PSA)	103
Figura 17: Histograma de distribuição das partículas do ESA e do PSA.....	107
Figura 18: Representação gráfica da distribuição da distribuição granulométrica do PSA e do ESA de <i>V. guianensis</i> , em função da frequência acumulada percentual	107
Figura 19: Fotomicrografia do ESA (x 2700).	108

Figura 20: Fotomicrografia do ESA (x 9000).	109
Figura 21: Fotomicrografia do PSA mostrando as partículas do adjuvante (x 1400).	109
Figura 22: Perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada	110
Figura 23: Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>V. guianensis</i>	111
Figura 24: Espectro de varredura do pico 1 do ESA	111
Figura 25: Isoterma de sorção de umidade do ESA e do PSA	112
Figura 26: Aspecto macroscópico do ESA antes da exposição a 65% de umidade relativa, e após 15 dias de exposição	113
Figura 27: Aspecto macroscópico do PSA antes da exposição a 65% de umidade relativa, e após 15 dias de exposição.	113
Figura 28: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 36232.	116
Figura 29: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>C. albicans</i> Tp 415.	117
Figura 30: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>C. albicans</i> U1101.	117
Figura 31: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>M. furfur</i> 399.	118
Figura 32: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>M. furfur</i> 697.	118
Figura 33: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>M. furfur</i> 401.	119
Figura 34: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 36232 após 11 dias de sua realização.	120
Figura 35: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>C. albicans</i> Tp 415, após 11 dias de sua realização.	120
Figura 36: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de <i>V. guianensis</i> frente à cepa de <i>C. albicans</i> U 1101, após 11 dias de sua realização.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituição química de diferentes espécies de <i>Vismia</i>	40
Tabela 2: Referência das cepas testadas	60
Tabela 3: Modelo fatorial para avaliação de parâmetros extrativos	63
Tabela 4: Desenho fatorial 2x3,.....	64
Tabela 5: Condições operacionais de secagem da solução extrativa.....	65
Tabela 7: Caracterização da Matéria-prima vegetal de <i>V. guianensis</i>	79
Tabela 8: Triagem fitoquímica para os quatro lotes analisados	83
Tabela 9: Valores de resíduo seco (g%) para as diferentes soluções extrativas obtidas através do fatorial	87
Tabela 10: Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos dos fatores principais e interações para o resíduo seco das soluções extrativas	88
Tabela 11: Valores de polifenóis totais (g%) para os diferentes ESAs obtidos através do fatorial	90
Tabela 12: Valores de taninos totais (g%) para os diferentes ESAs obtidos através do planejamento fatorial	90
Tabela 13: Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos dos fatores principais e interações para os taninos totais dos ESAs	91
Tabela 14: Caracterização da solução extrativa padronizada	95
Tabela 15: Parâmetros de regressão da curva de Calibração para epicatequina	98
Tabela 16: Parâmetros de linearidade para substância de referência (epicatequina) e do ESA de <i>V. guianensis</i>	99
Tabela 17: Repetibilidade do padrão epicatequina e ESA	100
Tabela 18: Precisão intermediária das substâncias de referência e do ESA de <i>V. guianensis</i>	100
Tabela 19: Resultados do estudo de recuperação de epicatequina pelo ESA de <i>V. guianensis</i>	101
Tabela 20: Rendimento da operação de secagem por <i>spray drying</i>	102
Tabela 21: Teor de taninos totais dos extratos secos.....	104

Tabela 22: Características do extrato seco (ESA) e do produto seco (PSA) por aspersão de <i>V. guianensis</i>	105
Tabela 23: Teor de taninos Totais dos extratos após exposição a ambiente com umidade relativa controlada de 65%	114
Tabela 24: Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos secos e do cetoconazol frente aos micro-organismos testados	116

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL:.....	24
2.2 ESPECÍFICOS:	24
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Utilização de plantas medicinais	26
3.2 Fitoterápicos.....	27
3.3 Controle de Qualidade de Matéria Prima Vegetal (MPV)	29
3.4 Secagem de extratos vegetais	31
3.4.1 Secagem por aspersão	32
3.5 A espécie estudada	38
3.5.1 Família Hypericaceae Juss.....	38
3.5.2 Gênero <i>Vismia</i>	39
3.5.3 A espécie <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy	41
3.5.3.1 Composição química.....	42
3.5.3.2 Estudos etnofarmacológicos e pré-clínicos	43
3.6 Infecções fúngicas	44
3.6.1 Micoses cutâneas.....	44
3.6.2 Fungos dermatófitos	45
3.6.2.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	46

3.6.3 <i>Candida albicans</i>	46
3.6.4 <i>Malassezia furfur</i>	47
3.6.5 Agentes antifúngicos.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Materiais.....	50
4.1.1 Equipamentos e acessórios.....	50
4.1.2 Solventes e reagentes	51
4.1.3 Adjuvantes farmacêuticos.....	51
4.1.4 Substâncias de referência (padrões)	51
4.1.5 Reagentes e soluções	51
4.2 Métodos	52
4.2.1 Material Vegetal	52
4.2.2 Tratamento do material vegetal e Obtenção da Matéria-Prima Vegetal	52
4.2.3 Caracterização Matéria-Prima Vegetal.....	53
4.2.3.1 Determinação de perda por dessecação	53
4.2.3.2 Análise granulométrica por tamisação	53
4.2.3.3 Teor de extrativos	54
4.2.3.4 Prospecção fitoquímica	55
4.2.3.4.1 Pesquisa de antraquinonas	54
4.2.3.4.2 Pesquisa de saponinas	55
4.2.3.4.3 Pesquisa de alcaloides.....	55
4.2.3.4.4 Pesquisa de taninos.....	56
4.2.3.4.4.1 Reação da gelatina	56
4.2.3.4.4.2 Reação com sais de ferro.....	56
4.2.3.4.4.3 Reação com acetato de chumbo.....	56
4.2.3.4.5 Pesquisa de flavonoides	57
4.2.3.4.5.1 Reação de Shinoda.....	57

4.2.3.4.5.2 Reação de Taubock.....	57
4.2.3.4.5.3 Reação de Pew.....	58
4.2.3.4.5.4 Reação com cloreto de ferro III	58
4.2.3.4.5.5 Reação com cloreto de alumínio.....	58
4.2.4 Estudo preliminar para obtenção de solução extrativa padronizada.....	58
4.2.5 Avaliação da atividade antifúngica	59
4.2.5.1 Micro-organismos	60
4.2.5.2 Inóculos.....	60
4.2.5.3 Microdiluição	61
4.2.6 Avaliação de parâmetros extrativos para obtenção da solução extrativa	62
4.2.6.1 Determinação do resíduo seco	64
4.2.6.2 Obtenção dos extratos secos	64
4.2.6.3 Atividade antifúngica	65
4.2.6.4 Doseamento de taninos totais	65
4.2.6.4.1 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal	65
4.2.6.4.2 Determinação do coeficiente de extinção molar do padrão de epicatequina	66
4.2.6.4.3 Doseamento espectrofotométrico de polifenóis totais e fração não-tanante através de leitura direta para determinação de taninos totais	66
4.2.6.4.4 Determinação do teor de taninos totais	67
4.2.7 Validação da metodologia analítica	68
4.2.7.1 Linearidade	67
4.2.7.1.1 Padrão (epicatequina)	68
4.2.7.1.2 Extrato seco por aspensão	68
4.2.7.2 Exatidão.....	69
4.2.7.3 Repetibilidade	69
4.2.7.4 Precisão intermediária	70
4.2.8 Obtenção da solução extrativa padronizada.....	70

4.2.8.1 Caracterização da solução extrativa padronizada	70
4.2.8.1 Determinação do resíduo seco	70
4.2.8.2 Determinação do pH.....	71
4.2.8.3 Determinação da densidade.....	71
4.2.8.4 Determinação do teor de taninos totais na solução extrativa	71
4.2.9 Obtenção e desenvolvimento dos extratos secos por aspersão	72
4.2.10 Caracterização do Extrato Seco por Aspersão e Produto Seco por aspersão	73
4.2.10.1 Avaliação das Características Macroscópicas	73
4.2.10.2 Umidade residual.....	73
4.2.10.3 Determinação do teor de taninos totais	73
4.2.10.4 Rendimento operacional	74
4.2.10.5 Determinação da densidade bruta e de compactação, Fator de Hausner e Índice de Carr e de Densificação.....	74
4.2.10.6 Análise granulométrica	75
4.2.10.7 Avaliação da higroscopicidade	75
4.2.10.8 Cromatografia em camada delgada.....	76
4.2.10.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	76
4.2.10.10 Análise das partículas em microscopia eletrônica de varredura	77
4.2.12 Avaliação da atividade antifúngica	77
4.2.11 Análise estatística.....	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	78
5.1 Caracterização da Matéria-Prima Vegetal	79
5.2 Estudo preliminar de atividade antifúngica para padronização da solução extrativa	83
5.2.1 Planejamento fatorial.....	87
5.2.1.1 Resíduo seco	87
5.2.1.2 Taninos totais.....	89
5.2.1.3 Atividade antifúngica	92

5.3 Caracterização da solução extrativa padronizada	94
5.4 Doseamento Espectrofotométrico	96
5.4.1 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal	96
5.4.2 Curva de calibração do padrão epicatequina	97
5.5 Validação da metodologia analítica	98
5.6 Obtenção e Caracterização do Extrato Seco por Aspersão e do Produto seco por aspersão.....	101
5.6.1 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos secos por aspersão.....	114
6 CONCLUSÕES.....	122
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da existência humana as plantas apresentam diversas utilidades, as quais resultam de uma série de influências culturais como a dos colonizadores europeus, indígenas e africanos (AMORIM et al., 2003).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de algumas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Nas regiões mais pobres do país e, até mesmo, nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

A medicina popular, principalmente, a que se baseia na utilização de plantas medicinais, desfruta de uma posição respeitável, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços modernos é limitada (AGRA et al., 2007).

Alguns medicamentos modernos tiveram seu desenvolvimento a partir de plantas medicinais e do conhecimento das suas propriedades biológicas, como exemplo pode ser citado, aspirina, digoxina e morfina. Dispensa-se grande importância às espécies vegetais, o que pode ser verificado pelo aumento das pesquisas visando o desenvolvimento de novos medicamentos que tenham origem na flora (VICKERS e ZOLLMAN, 1999).

A fitoterapia vem crescendo, grandemente, nos últimos anos como forma de terapia tradicional. Em 2001, estimava-se que o mercado mundial de fitoterápicos girasse em torno de 22 bilhões de dólares (YUNES et al., 2001), mais recentemente, este mercado foi avaliado em 44 bilhões de dólares (MIOTO, 2010). No entanto, o Brasil apesar de sua extensa e diversificada flora, detendo cerca de um terço da flora mundial, não tem se destacado neste

setor, ficando, inclusive, atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et al., 2001).

A escassa inovação tecnológica em pesquisa e exploração de produtos naturais é uma das características marcantes de países em desenvolvimento. No Brasil, as inovações têm sido de baixa ou média intensidade, sendo que os fitoterápicos mais vendidos no mercado brasileiro são produzidos a partir de espécies estrangeiras (WAGNER, 2002).

Na Amazônia, o uso das plantas medicinais pelas populações nativas e ribeirinhas representa uma importante fonte de conhecimentos de terapêutica tradicional. Uma das plantas, com propriedade medicinal, muito utilizada pela população amazônica é a *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy. O gênero *Vismia*, é constituído por pequenas árvores e arbustos, sendo que 80% das setenta espécies conhecidas podem ser encontradas na América do Sul e Central e as demais se distribuem pela África e, mais raramente, pela Ásia (EWAN, 1962). Pertencente à família Hypericaceae, é uma árvore de pequeno porte conhecida popularmente como lacre. A seiva (resina avermelhada) obtida da casca e a infusão das folhas são muito utilizadas, na medicina popular, contra pano branco (*Pitiriase versicolor*) e impinges (*Tinea corporea*). O desenvolvimento dos fungos causadores de dermatoses entre outros fatores é favorecido pelo clima tropical da região norte do Brasil (SANTOS et al., 2006).

Testes fitoquímicos realizados com os extratos hidroalcoólico e clorofórmico dos frutos frescos e dessecados de *V. guianensis* identificaram a presença de fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis, catequina, flavonas, ácidos fixos fortes, triterpenoides pentacíclicos e quinonas (LOPES e GONÇALVES, 1992). A resina e extrato hexânico das folhas apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* (GONÇALVES e MORS, 1978). Da raiz de *V. guianensis*, foi isolado o pigmento vismiona H, assim como as xantonas V1, V2, V1a e V2a (BOTTA et al., 1986).

A terapêutica antimicrobiana convencional, no Brasil, segue de acordo com o perfil internacional, sendo realizada há muitos anos. Novos fármacos são lançados no mercado e o seu uso adotado imediatamente. Vários prejuízos têm sido relatados em função do uso iatrogênico e abusivo de antimicrobianos, tanto de origem sintética quanto natural. A resistência microbiana e a automedicação são alguns desses problemas (VEGNIA et al., 2004). Diversos estudos têm relatado as plantas medicinais como uma alternativa no combate às infecções tanto de origem bacteriana quanto fúngica.

A técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) é muito utilizada na obtenção de extratos secos com melhores características tecnológicas e maior concentração de constituintes com atividade biológica. A maioria dos medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil é encontrada na forma farmacêutica sólida, utilizando extratos secos como principal matéria-prima ativa. Como vantagens da utilização desta técnica, pode-se citar: maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, além da maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010).

A espécie *V. guianensis* foi escolhida para este estudo por ser bastante utilizada na medicina popular da região Amazônica, com comprovação científica de algumas atividades biológicas, principalmente, para afecções da pele, destacando-se as micoses (SEO et al., 2000; SANTOS et al., 2006; SANTOS et al., 2007). Dessa forma constitui promissora espécie para o estudo tecnológico no sentido de transformação do material vegetal em um produto padronizado que possa ser utilizado com segurança e eficácia terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Desenvolver e padronizar um produto seco por aspersão de *Vismia guianensis* com atividade antifúngica.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a matéria-prima vegetal;
- Avaliar atividade antifúngica de *V. guianensis* frente à *Candida albicans*, *Malassezia furfur* e *Trichophyton rubrum*.
- Otimizar e padronizar o processo extrativo de *V. guianensis* com auxílio de ferramentas estatísticas;
- Desenvolver e caracterizar um produto seco por aspersão a partir da solução extrativa padronizada;
- Verificar atividade antifúngica de produto seco padronizado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Utilização de plantas medicinais

As plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos, fazendo parte do processo de evolução humana. Mesmo antes da existência de qualquer forma escrita, o homem já as utilizava como recurso terapêutico. As experiências obtidas revelaram sucessos e fracassos, ou seja, muitas vezes havia cura, outras vezes morte ou efeitos colaterais severos (TOMAZZONI et al., 2006).

Plantas medicinais são utilizadas para as mais diversas finalidades, principalmente na medicina popular, chegando muitas vezes a serem utilizadas, pela população, para substituir a prescrição médica (MITSCHER et al., 1972). Isso ocorre, principalmente, pela grande aceitabilidade e disponibilidade das plantas quando comparadas com os medicamentos industrializados que dependem de tecnologia e matéria-prima externa (AMORIM et al., 2003).

No Brasil, muitas vezes, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, sendo comum a utilização das mesmas para fins medicinais diferentes dos descritos na literatura (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Em algumas comunidades, o conhecimento acerca de plantas constitui o único recurso terapêutico e, em muitos lugares, as plantas são comercializadas em feiras livres, mercados públicos, sendo também encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

É considerada planta medicinal toda aquela que possua em sua composição, substâncias químicas, biologicamente sintetizadas (a partir de nutrientes, água e luz) que possam provocar no organismo humano e animal, qualquer reação através da ação dos seus princípios ativos (FETROW e ÁVILA, 1999).

Dentre os fatores que têm sinalizado, positivamente, para a utilização medicinal de plantas, destaca-se o alto custo dos medicamentos industrializados associado ao difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica e, à tendência apresentada pelos consumidores em preferir produtos de origem natural (SIMÕES, 1999).

No entanto, as observações populares que relatam o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem para a divulgação das “virtudes terapêuticas”, estas que muitas vezes não possuem dados científicos que comprovem sua eficácia e toxicidade (MACIEL et al., 2002). Por outro lado, estudos científicos confirmam a eficácia e segurança do uso terapêutico de algumas plantas medicinais, as quais têm se mostrado, em alguns casos, mais eficazes do que fármacos tradicionais (YAMADA et al., 1993).

Do ponto de vista científico, a quantidade de plantas existentes no planeta é de cerca de 250 a 500 mil espécies, das quais apenas 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e menos ainda estudadas sob o ponto de vista biológico (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). No Brasil, apenas 8% das espécies foram estudadas em busca de moléculas bioativas (AMORIM et al., 2003).

3.2 Fitoterápicos

O desenvolvimento de um medicamento requer um rigoroso estudo, em todas as etapas de produção, a fim de garantir a qualidade da forma farmacêutica final. Dessa forma, a problemática da elaboração de um fitoterápico, reside no fato de que a constituição química de produtos de origem vegetal, bem como as características da matéria-prima, depende tanto de fatores agrônômicos quanto tecnológicos, relacionados aos procedimentos empregados na transformação da droga vegetal em um medicamento. Tais condições dificultam a definição

de especificações para a avaliação da qualidade das matérias-primas, uma vez que suas características podem variar de acordo com a origem e o processamento do vegetal (MAGALHÃES, 1997; LIST e SCHMDT, 1989; FARIAS, 2003).

Outra etapa importante na preparação de um medicamento de origem vegetal é a operação de extração. Normalmente, a seleção do tipo de solvente empregado está baseada no grupo de substâncias responsável pela atividade biológica, entretanto, quando esse dado não é conhecido, a escolha do solvente pode basear-se em estudos etnofarmacológicos e clínicos (LIST e SCHMDT, 1989). Os líquidos extratores mais empregados são misturas de solventes, tais como: etanol, metanol ou acetona com água, no entanto estudos devem ser realizados visando aumentar o rendimento na extração das substâncias de interesse, sempre considerando sua solubilidade e estabilidade (VOIGT, 2000).

A elaboração de um medicamento fitoterápico inicia-se com a obtenção de uma solução extrativa, a qual deve ser padronizada a fim de se manter a maior homogeneidade possível na composição, e para isso, algumas características tecnológicas são relevantes, tais como tamanho de partícula da droga vegetal, seleção do método de extração e do líquido extrator, condições de concentração, processos de purificação, adição de adjuvantes e condições de estocagem, que influenciam inevitavelmente na qualidade do produto acabado (BONATI, 1991).

O desenvolvimento de uma solução extrativa padronizada requer o conhecimento de todas as suas propriedades tecnológicas e/ou físico-químicas e, de fatores que influenciam as mesmas, criando condições para avaliar a manutenção e reprodutibilidade de sua qualidade. Sendo assim, é necessário detectar e estudar os efeitos de tais fatores, os quais podem ser estimados com auxílio de ferramentas estatísticas, tais como um desenho ou planejamento fatorial (BONATI, 1991; MONTGOMERY, 1991).

Observa-se que a utilização de fitoterápicos pela população brasileira é cada dia mais frequente, fato este, que pode ser justificado por avanços na área científica, que levaram ao desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, e por uma forte tendência pela busca de terapias menos agressivas (YUNES et al., 2001). Em todo o mundo, os fitoterápicos têm grande aceitação e ampla utilização terapêutica (CALIXTO, 2000).

3.3 Controle Qualidade de Matéria Prima Vegetal (MPV)

A primeira etapa para o controle de qualidade de uma MPV é garantir a veracidade da espécie vegetal desejada. Nesse sentido, é essencial a obtenção, logo após a coleta, de uma exsicata para identificação taxonômica do material. Além disso, a coleta deve ser feita com cuidado, evitando a retirada de partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e, também, materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não sejam de interesse para a investigação, uma vez que esses materiais irão afetar a composição química da MPV e favorecer a proliferação de micro-organismos (MATTOS, 1997).

Logo após a coleta, o material deve ser submetido à secagem que tem por finalidade a retirada de água e, com isso, impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano. A umidade residual dependerá do tipo de órgão que constitui o material vegetal (BACCHI, 1996). De forma geral, o ideal é que o teor de umidade da droga vegetal esteja abaixo de 14 % (LIST e SCHIMDT, 1989).

O conteúdo de umidade é um dos fatores mais importantes que afetam a qualidade de grãos e sementes, uma vez que favorece a atividade de insetos e proliferação de fungos, durante o armazenamento. A ação prejudicial destas pestes, destrutivas dos grãos e sementes, aumenta à medida que o conteúdo de umidade também aumenta. Além disso, os grãos são

vendidos tendo o peso como base, do qual a água faz parte (LIST e SCHIMDT, 1989; SIMÕES, 1999).

A operação de secagem caracteriza-se pela exposição do material a temperaturas relativamente baixas, normalmente inferiores a 60 °C e a longo tempo de contato, geralmente sete dias. Tal procedimento visa à manutenção dos constituintes químicos presentes no vegetal. A secagem será um tanto mais rápida quanto mais dividido estiver o material vegetal a secar, pois, deste modo, oferecerá uma maior superfície de evaporação e, pelo mesmo motivo, o material deverá ser disposto em camadas finas. A secagem pode ser feita em temperatura ambiente ou com utilização de ar quente, em estufas com circulação de ar. Quando ao ar livre, preferencialmente, deverá ser feita à sombra, já que a irradiação solar poderá causar modificação em alguns constituintes do vegetal (MATTOS, 1997).

A moagem tem por finalidade reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o assim para a próxima etapa, a extração. O aumento da área de contato entre o material sólido e o líquido extrator torna mais eficiente a operação. A escolha pelas dimensões mais apropriadas depende também do órgão em questão, quanto mais sólido for, maior será o grau de divisão necessário (SIMÕES, 1999).

É desejável determinar o conteúdo de umidade de um produto em diferentes situações, por exemplo, na colheita, durante a secagem e durante as operações de compra e venda, quando o risco de adulteração com água pode estar presente. Vários fatores, além do conteúdo de umidade, têm efeitos sobre a estabilidade da matéria-prima durante o armazenamento, no entanto o conteúdo de umidade é um dos principais fatores que governa a manutenção da qualidade dos grãos (LIST e SCHIMDT, 1989).

A análise granulométrica da MPV fornece a distribuição percentual, em peso, dos

tamanhos de partículas que constituem a matéria-prima. Essa caracterização é essencial para os processos físicos voltados para a extração das substâncias químicas de interesse. Ou seja, a análise granulométrica permite identificar o tamanho e a distribuição das partículas, o que influenciará diretamente na eficiência do processo extrativo (LIST e SCHIMDT, 1989).

A multiplicidade dos constituintes químicos presentes nas plantas associada à ocorrência de pequenas quantidades de substâncias de interesse, juntamente com grandes quantidades de substâncias conhecidas e comuns em várias outras espécies, dificulta a identificação dos princípios imediatos desejados. Algumas dessas dificuldades estão condicionadas à própria natureza da planta, como ser vivo em constante dinamismo químico, outras, com o grau de precisão das técnicas utilizadas pelo pesquisador. No primeiro caso, estão as variações de composição devido à influência das mudanças estacionais, do clima, do solo, e algumas vezes até na duração do fotoperíodo, como é o caso da maioria dos glicosídeos, cuja concentração nas folhas aumenta durante o dia com a fotossíntese e diminui durante a noite ou, por exemplo, o caso de constituintes hidrossolúveis que podem ser retirados das folhas pela chuva, o que poderia falsear um resultado em uma planta coletada em tais condições; ou ainda, a presença de substâncias que apresentam propriedades físicas muito próximas, homólogos e isômeros, como muitas vezes ocorre em misturas de triterpenóis e seus derivados que necessitam de métodos analíticos muito sofisticados para sua identificação. Por todas essas razões torna-se, praticamente, impossível um mapeamento completo e exato dos constituintes fitoquímicos de uma planta (MATTOS, 1997).

3.4 Secagem de extratos vegetais

Transformar uma matéria-prima vegetal em um produto industrializado e apropriado para aplicação terapêutica é uma tarefa bastante complexa que exige técnicas de

processamento específicas e padronizadas, e neste contexto, destaca-se o processo de secagem dos extratos vegetais (COUTO et al., 2011). A seleção de uma operação específica é determinada pelas características físicas e físico-químicas do produto a ser obtido, pela natureza da matéria-prima a ser transformada e pelo volume de produção exigido (SONAGLIO et al., 2005).

Os extratos secos apresentam diversas vantagens em relação às formas fluidas, do ponto de vista tecnológico, como maior estabilidade e facilidade de padronização, transporte e acondicionamento (OLIVEIRA et al., 2006).

A técnica de secagem tem sido utilizada como uma das operações mais frequentes na produção de medicamentos, sendo empregada no processamento de diversos materiais para obtenção de pós e grânulos, tendo como principal objetivo a retirada da água, responsável por propiciar um meio reacional favorável para reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiana (DE SOUZA et al., 2006). A secagem pressupõe a eliminação da fase líquida até valores residuais, com uma eficiência que depende das características do líquido extrator tratado, geralmente a água, do princípio da técnica e do tipo de evaporador (ROCHA, 2006). Das técnicas de secagem existentes, a que é considerada a mais versátil de todas, segundo List e Schmit (1989), é a realizada com *spray drying* que funciona segundo o princípio do aumento da superfície da solução, suspensão ou emulsão a secar, através de sua aspersão, elevando a área de contato do fluido de secagem com o ar quente.

3.4.1 Secagem por aspersão

A técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) está em posição de destaque quando comparada aos outros métodos de secagem. O produto obtido possui inúmeras

vantagens como maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010).

A secagem por aspersão consiste em três etapas fundamentais. Primeiramente o fluido é disperso na forma de gotículas, gerando um aumento da área superficial. Em seguida, ocorre o contato dessas gotículas com a corrente de ar aquecido (ocorre transferência de calor). Por último, ocorre a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida. O líquido da superfície evapora-se rapidamente pela transferência do ar aquecido. As partículas solidificadas, geralmente, apresentam o mesmo tamanho e forma da gotícula que as originou. Na última etapa, o produto de secagem é transportado por uma corrente de ar sendo posteriormente coletado. A evaporação superficial da gotícula leva à formação de uma camada de material seco externa. Através desta camada, o líquido no interior da gotícula propaga-se para o exterior. Dependendo da elasticidade e da permeabilidade da crosta, serão produzidos distintos materiais secos como esferas intactas, com superfície imperfeita ou fragmentada, sólidas ou ocas (RANKELL et al., 2001).

Geralmente, as partículas formadas pelo *spray drier* são esféricas e seu tamanho pode ser descrito por seu diâmetro geométrico. Este é um importante parâmetro que influencia as forças de fluxo das partículas em fluidos, bem como o acondicionamento das partículas quando elas formam um pó. O diâmetro geométrico é também usado frequentemente como uma referência, porque é, em princípio, diretamente acessível por meio de técnicas ultramicroscópicas. No entanto, a medição do diâmetro geométrico por análise de imagem não é tão simples. Os métodos, raramente, se interessam pelo tamanho de uma única partícula, mas sim na distribuição do tamanho de todas as partículas em um produto. No

contexto de aplicações farmacêuticas, a fração de massa de uma forma de dosagem de partículas, em um certo intervalo de tamanho é frequentemente procurada. Esta informação pode ser obtida pela análise de imagem de uma amostra da dose, mas o cuidado deve ser tomado para assegurar que uma amostra representante estatisticamente relevante seja analisada (VEHRING, 2008).

De acordo com Oliveira e Petrovick (2010) as propriedades do produto final são determinadas pelos fatores relacionados às características do material de entrada e do processamento.

O uso de adjuvantes para auxiliar o processo de secagem, nesta técnica, apresenta-se como um dos fatores relacionados às características do material de entrada, sendo sua utilização prática muito comum. São utilizados como adjuvantes neste processo: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina entre outros (VASCONCELOS et al., 2005). Neste sentido, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de *spray drying*, principalmente, quando se refere à secagem de extratos vegetais, é uma fase muito importante, pois determina a estabilidade e a qualidade dos mesmos, podendo até afetar as características de biodisponibilidade dos produtos obtidos (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010).

O dióxido de silício coloidal, que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, tem sido amplamente empregado, apresentando excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (DE CAMPOS, 1996; DE SOUZA, 1997). Estudos realizados com a finalidade de avaliar a concentração de dióxido de silício coloidal para secagem de extratos vegetais verificaram que a adição deste adjuvante nas concentrações de 10% e 20%, em relação ao teor de sólidos na

solução extrativa, causou redução significativa na higroscopicidade dos produtos secos, não ocorrendo formação de aglomerados (CARVALHO, 1997).

Segundo Patel e colaboradores (2009) os parâmetros críticos relacionados ao processo da secagem por aspersão são:

- a) **Temperatura de entrada do ar:** quanto maior a temperatura de entrada do ar mais rápida a evaporação do solvente, entretanto, a temperatura elevada pode alterar as propriedades físico-químicas de produtos termolábeis (MICHAEL, 2009).
- b) **Temperatura de saída do ar:** governam o dimensionamento de equipamentos de recuperação de pó, quanto maior é a saída de ar maior será a temperatura de recuperação do pó dos equipamentos e dutos de transporte (MAURY et al., 2005). Temperaturas de saída de ar controlam o teor de umidade final do pó.
- a) **Viscosidade:** viscosidade elevada impede a formação da gota correta. À medida que a viscosidade é reduzida, menos energia ou pressão é necessária para formar um *spray* especial padrão. Por outro lado, a viscosidade elevada da formulação impede a formação adequada das gotas durante a aspersão (SOARES, 2002).
- b) **Teor de sólidos:** deve ser tomado bastante cuidado com altas cargas sólidas (acima de 30%) para manter a pulverização adequada e garantir a formação de gotículas corretas. Devido ao custo do processo, o *spray dryer* deve operar com o máximo teor de sólidos possível, possibilitando uma utilização adequada do calor (MASTERS, 2009). Baixas concentrações de sólidos necessitam que grande quantidade de solvente seja eliminada ou requerem a

adição de adjuvantes de secagem, visando à formação de partículas maiores e à otimização do rendimento do processo (DE CAMPOS, 1996).

- a) **Tensão superficial:** adição de uma pequena quantidade de surfactante pode reduzir significativamente a tensão superficial. Isto pode resultar num padrão mais amplo de pulverização, menor tamanho de gota, e maior velocidade de queda.
- b) **Temperatura da alimentação:** Por meio da avaliação da temperatura do ar de saída e da inspeção das paredes da câmara de secagem é determinado o fluxo de alimentação. Se a temperatura do ar de entrada permanecer constante, uma diminuição na taxa de alimentação do líquido acarretará em aumento na temperatura do material de saída (MASTERS, 2009; RANKELL et al., 2001).
- c) **Volatilidade do solvente:** a volatilidade elevada é desejável em qualquer processo de secagem. Infelizmente as escolhas são limitadas hoje, em muitos casos, se restringe a escolha da água como solvente. Excetuando-se os casos onde se utiliza um sistema de ciclo fechado, onde se utiliza um gás inerte como o nitrogênio na secagem de solventes orgânicos, evitando assim risco de explosão (ÇELIK e WENDEL, 2005).
- d) **O material do bico:** a maioria das aplicações farmacêuticas usam inserções de aço inoxidável. No entanto, bicos de carboneto de tungstênio estão frequentemente disponíveis e têm excelente resistência à abrasão e boa resistência à corrosão para a maior parte de matéria-prima.

O "coração" de qualquer *spray dryer* é o atomizador, pequeno no tamanho, mas de grande importância, a instalação do atomizador é essencial na secagem por pulverização. O atomizador deve satisfazer várias funções importantes que estão resumidas abaixo:

- Dispersar o material de alimentação em pequenas gotas, que devem ser bem distribuídas no interior do secador e misturadas com o gás quente.
- As gotículas produzidas não devem ser tão grandes para que não sejam incompletamente secas, nem tão pequena para que a recuperação do produto não seja dificultada. Pequenas partículas também podem superaquecer-se e queimar.
- O atomizador deve também atuar como um dispositivo de medição, controlar a taxa à qual o material é alimentado no secador. Existem diversos tipos de atomizadores: atomizador de ar ou dois bocais de fluidos; bicos de atomização sem ar; bicos de pressão; bicos de disco rotatório e bicos de ultrassom.

Outro importante fator nesta técnica de secagem é o fluxo de ar, os quais encontra-se vários modelos de equipamentos:

- Fluxo cocorrente: em um secador de cocorrente, o pulverizador é dirigido para o ar quente que entra no secador e ambos passam através da câmara na mesma direção;
- Fluxo contracorrente: neste design do secador, o *spray* e o ar são introduzidos em extremidades opostas ao secador, com o atomizador posicionado na parte superior e o ar que entra no inferior;
- Fluxo misto: estes secadores combinam o cocorrente e contra fluxo de corrente, em um misto o ar entra na parte superior e o atomizador é localizado na parte inferior.

Dependendo do tipo de fluxo de ar há um modelo apropriado de câmara de secagem. O ar dentro da câmara mantém um padrão de fluxo, impedindo a deposição de produto, parcialmente, seco sobre a parede ou atomizador (RONALD, 1997). O movimento do ar e a temperatura de entrada de ar influenciam o tipo de produto final.

A produção de partículas pelo processo de aspersão ganhou muita atenção nos últimos anos. A secagem por aspersão é uma das tecnologias mais interessantes para a indústria farmacêutica, sendo um processo ideal, onde o produto final deve respeitar as normas de qualidade precisas sobre distribuição granulométrica, teor de umidade residual, densidade e morfologia (PATEL et al., 2009).

3.5 A espécie estudada

3.5.1 Família Hypericaceae Juss.

Esta Família compreende árvores, arbustos ou ervas perenes ou anuais, caule ereto ou decumbente, sem espinhos, glabro, ramos ferrugíneos glabros ou estrelados. Folhas opostas, simples, verde, glandular, sésseis, pecioladas, sem estípulas, linear-lanceoladas, elíptico-oblongas, ovadas, glabro ou estrelado-ferrugíneas, a margem inteira, ondulada, revolutas, o ápice acuminado obtuso ou emarginado, base cuneante ou obtusa, venação ou eucamptódroma, o pecíolo, às vezes alado. Inflorescência terminal ou axilar, cimosa, corimbosa ou subcorimbosa, frouxa, flores hermafroditas, ocasionalmente solitárias, as brácteas elípticas a oblongas, membranáceas, as bractéolas lineares a elípticas, os pedicelos curtos e ocasionalmente alados; o cálice possui de 5-4 sépalas, livres ou conadas perto da base, oblongas, lanceoladas, desiguais, membranáceas, coriáceas, glandularer; corola actinomorfas ou zigomorfas, pétalas 4-5 livres; ovário superior, 2-5

carpelos, ovóides a globosos (1-3-5) locular, a placentação axiais ou parietal, numerosos óvulos, os estilos (2-3-5) conados na base, apicais; estigma capitado. Fruto capsular. Esta família foi segregada de Clusiaceae (ROBSON, 1978), a qual anteriormente era conhecida como Guttiferae (STANDLEY e WILLIAMS, 1961; WATSON e DALLWITZ, 1992; RODRIGUEZ, 2001; HAMMEL e ROBSON, 2001).

Os caracteres que a diferenciam de Clusiaceae são principalmente presença de estames fasciculados, anteras pequenas e estilos livres (ROBSON, 1978; STEVENS, 2001, GUSTAFSSON et al., 2002). Com dados moleculares, a delimitação e separação da família Hypericaceae de Clusiaceae foi melhor suportada (APGII, 2003; DAVIS et al., 2005; TOKUOKA e TOBE, 2006).

Hypericaceae é distribuída principalmente nas áreas tropicais e temperadas do mundo e reúne oito gêneros com cerca de 560 espécies.

3.5.2 Gênero *Vismia*

Este gênero compreende 52 espécies, com ampla distribuição nas Américas Central e Sul (EWAN, 1962). As antraquinonas são metabólitos típicos deste gênero (MIRAGLIA et al., 1981) que foi descrito por Domingos Vandelli e o nome é dedicado a Visme, comerciante português que se dedicava à Botânica. A maioria das espécies deste gênero fornece resinas de colorações diferentes e várias têm valor medicinal (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Diversos métodos e testes utilizando extratos de espécies de *Vismia* têm demonstrado a presença de importantes substâncias antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias, inseticidas, antivirais, entre outros, cujos resultados merecem atenção especial e, estudo mais aprofundado sobre este importante gênero. Antraquinonas e derivados de quinonas,

terpenóides, benzofenonas, xantonas, lignanas, cumarinas e os componentes voláteis foram descritos como constituintes das espécies *Vismia* (VIZCAYA et al., 2012).

As antraquinonas representam a classe de substâncias mais isoladas do gênero, representadas principalmente pelas vismiaquinonas (A e B), as quais geralmente são coloridas e se caracterizam por serem pós de grãos muito finos (VIZCAYA et al., 2012). Por outro lado, as laurentiquinonas (isoladas de *Vismia laurentii*) demonstraram atividade antimalárica contra o *Plasmodium falciparum*, e receberam os nomes de laurentiquinona A, B e C (NOUNGOUE et al., 2009).

Recentemente, Vizcaya e colaboradores (2012) fizeram revisão sobre a constituição química de várias espécies do gênero *Vismia*. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 1.

Tabela 1: Constituição química de diferentes espécies de *Vismia*

Constituinte químico	Espécie	Referência
Antraquinonas	<i>V. reirchartiana</i>	(Goncalves & Mors, 1981)
	<i>V. japurensis</i>	(Miraglia et al., 1981)
	<i>V. martiana</i>	(Nagen & Faria de Jesús, 1990)
	<i>V. parviflora</i>	(Nagen & Faustino, 1997)
	<i>V. baccifera</i>	(Hussein et al., 2003)
	<i>V. laurentii</i>	(Nguemeving et al., 2006)
	<i>V. guianensis</i>	(Epifano et al., 2007).
Antronas	<i>V. baccifera</i> var. <i>ferruginea</i>	(Delle Monache et al., 1979)
	<i>V. decipiens</i>	(Gonzales et al., 1980a)
	<i>Psospermum corymbiferum</i>	(Delle Monache et al., 1985)
	<i>Psospermum febrifugum</i>	(Botta et al., 1983)
	<i>V. laurentii</i>	(Nguemeving et al., 2006)
	<i>V. guaramirangae</i>	(Delle Monache et al., 1983)
	<i>V. guianensis</i>	(Botta et al., 1986)
Antranoides prenilados	<i>V. baccifera</i> var. <i>ferruginea</i>	(Delle Monache et al., 1979)
	<i>V. decipiens</i>	(Gonzales et al., 1980)
	<i>V. macrophyla</i>	(Hussein et al., 2003);
	<i>V. guianensis</i>	(Botta et al., 1986);
Benzofenonas	<i>V. decipiens</i>	(Gonzales et al., 1980)
	<i>V. guaramirangae</i>	(Camelle et al., 1982)
	<i>V. cayennensis</i>	(Fuller et al., 1999)
	<i>V. guianensis</i>	(Seo et al., 2000)
Flavonóides	<i>V. laurentii</i>	(Nguemeving et al., 2006)

	<i>V. parviflora</i>	(Nagen & Faustino, 1997).
Xantonas	<i>V. guianensis</i>	(Botta et al., 1986; Epifano et al., 2007).
	<i>V. latifolia</i> Aubl	(Santos et al., 2000)
	<i>V. rubescens</i>	(Tamokou et al., 2009);
	<i>V. guaramirangae</i>	(Cardona et al., 1986)
Sesquiterpenos	<i>V. cayennensis</i>	(Pinheiro et al., 1984)
	<i>V. guaramirangae</i>	(Camelle et al., 1982)
	<i>P. febrifugum</i>	(Botta et al., 1983)
	<i>V. cayennensis</i>	(Pinheiro et al., 1984).
Cumarinas	<i>V. guianensis</i>	(Seo et al., 2000)
Triterpenos	<i>V. cayennensis</i>	(Miraglia et al., 1981),
	<i>V. japurensis</i>	(Simmonds et al., 1985),
	<i>V. guaramirangae</i>	(Camelle et al., 1982),
	<i>V. laurentii</i>	(Nguemeving et al., 2006);
Lignanans	<i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	(Salas et al., 2008)
	<i>V. guaramirangae</i>	(Delle Monache et al., 1983)

3.5.3 A espécie *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Vismia guianensis (Aubl.) Choisy, espécie nativa da América do Sul, encontrada também na Colômbia, Venezuela, Guiana e Brasil, nas matas de vegetação secundária dos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Bahia e Minas Gerais (EWAN, 1962).

Conhecida popularmente como lacre, árvore da febre, goma-lacre, pau-de-lacre ou lacre-branco. É uma árvore de pequeno porte, mede de 3 a 7 metros de altura (figura 1), copa aberta e irregular, com ramos novos ferrugíneos-pubérulos, cujas folhas são verdes na face adaxial e amareladas na face abaxial (LORENZI e MATOS, 2002).



Figura 1: Folhas e frutos de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Fonte: Tatiane Pereira de Souza

Tem como sinônimos relevantes: *Hypericum guianense* Aubl., *Vismia guianensis* var. *acuminata* (Lam.) M.E.Berg, *Vismia acuminata* (Lam.) Pers., *Vismia caparosa* Kunth, *Vismia ferruginea* Kunth, *Vismia reichardtiana* (Kuntze) Ewan (BITTRICH, 2012).

É utilizada pela aplicação de seu látex (resina amarelo-avermelhada denominada goma-lacre ou goma-guta) e da infusão das folhas, no combate das afecções dermatológicas denominadas “impingens” causadas por fungos, além de outras aplicações, como purgativo (ALBUQUERQUE, 1980). O decocto e infusão das suas folhas e cascas são utilizados para reumatismo, como tônico e anti-térmico (ALMEIDA, 1993).

3.5.3.1 Composição química

Muitos metabólitos secundários já foram identificados na sua constituição: β -sitosterol, vismiona H (BOTTA et al., 1985), quinonas (GONZALES et al., 1980b), diantronas (POLITI et al., 2004), antraquinonas (POLITI et al., 2004) e xantonas (BOTTA et al., 1986). Seo e colaboradores (2000) conseguiram isolar da fração clorofórmica das raízes de *V. guianensis* cinco benzofenonas (vismiaguiononas A, B, C, D e E) e duas benzocumarinas (vismiaguianinas A e B).

Estão presentes quatro classes de metabólitos secundários como componentes principais para as folhas de *V. guianensis*: antraquinonas, flavonoides, xantonas e benzofenonas (POLITI et al.; 2004)

Foram identificados na composição química dos frutos de *V. guianensis* dois antranoides prenilados: γ -hidroxi-ferruginina A e γ,γ -dihidroxi-ferruginina A (MONACHE et al.; 1980).

As antraquinonas presentes em *V. guianensis* apresentaram efeitos citogênicos *in vitro* (EPIFANO et al., 2007) e a fração hexânica apresentou grande teor de fenólicos quando comparado as outras frações do fruto verde de *V. guianensis* (SILVA et al., 2010).

3.5.3.2 Estudos etnofarmacológicos e pré-clínicos

Alguns estudos têm demonstrado a atividade de *V. guianensis* no combate a células cancerígenas. A vismiona, metabólito presente em *V. guianensis* e em outras espécies do gênero, mostrou atividade *in vitro* contra linhagem de tumores experimentais – carcinoma de ovário M5076 e melanocarcinoma B16, segundo Pasqua e colaboradores (1995). Foi identificada, também, atividade letal de extratos orgânicos e aquosos frente à linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humana (SUFFREDINI et al., 2004).

A γ -hidroxiferruginina A, isolada do látex dessa espécie é capaz de inibir a DNA α -topoisomerase II humana podendo servir como ponto de partida para o desenvolvimento de futuros medicamentos antitumorais (LINS et al., 2007).

A atividade antioxidante também tem sido demonstrada, sendo atribuída à presença de substâncias fenólicas: antranoides prenilados ferruginina A e γ -hidroxiferruginina e da antraquinona vismiona A (ALVAREZ et al., 2008).

Segundo Santos e colaboradores (2006) a atividade antimicrobiana da planta é relacionada à fração hexânica de extratos brutos das raízes e casca. Os micro-organismos sensíveis a sua ação são *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. É uma planta antimicrobiana (TADA et al., 1991) e o látex, as folhas e as cascas são usados em infecções por fungos na pele (PASQUA et al., 1995).

Foi realizada uma observação de sua ação antimicrobiana contra a *S. aureus* com teste de difusão em disco do extrato seco de *V. guianensis* (Aubl.) Choisy diluído em DMSO nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL, ocorrendo formação de halo de inibição com todas as concentrações (CAMELO, 2010).

3.6 Infecções fúngicas

3.6.1 Micoses cutâneas

Micoses cutâneas são infecções fúngicas que se localizam nas camadas superficiais da pele e anexos, podendo ser causadas por fungos dermatófitos, leveduras ou fungos filamentosos não dermatófitos (OLIVEIRA et al., 2006). Estudos epidemiológicos indicam que as micoses cutâneas estão entre as doenças de maior incidência no mundo (PERÓN et al., 2005), podendo acometer todas as faixas etárias e gerando gastos de milhões de dólares em tratamentos todos os anos (ABDEL-RAHMAN et al., 2005). A distribuição e frequência das micoses cutâneas e seus agentes etiológicos varia segundo a região geográfica e o nível socioeconômico da população (LUPI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006) destacando-se, entre os fatores predisponentes, ocupação profissional, hábitos e costumes individuais.

As micoses cutâneas variam quanto às formas clínicas e agentes causais, entretanto, a maioria dos autores relata como agentes etiológicos mais frequentes os dermatófitos (80 – 90%), seguidos pelas leveduras (5 – 17%) e fungos filamentosos não dermatófitos (3 – 12%) (PERÓN et al., 2005). As infecções por dermatófitos afetam aproximadamente 40% da população mundial e representam 30% de todas as infecções micóticas cutâneas, sendo mais comuns as que comprometem pele e unhas (ALMEIDA et al., 2009).

3.6.2 Fungos dermatófitos

Dermatófitos é um grupo de fungos queratinofílicos estreitamente relacionados, capazes de invadir tecidos queratinizados de humanos e animais, causando infecções denominadas dermatofitoses (WEITZMAN e SUMMERBEL, 1995).

Os dermatófitos são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, podendo ser também identificados com base na sua origem: antropofílico (humanos), zoofílicos (animais) e geofílicos (solo) (SANTOS et al., 1997). Constituem o grupo de fungos mais frequentemente isolados em laboratórios de Micologia. Estima-se que 10 a 15% da população humana poderão ser infectadas por estes micro-organismos no decorrer de sua vida (PONTES et al., 2002).

Os dermatófitos causam uma patologia chamada *tinea*, que deriva do latim e significa “verme”. Esse termo é utilizado em associação à parte do corpo acometida para descrever a patologia (WEITZMAN e SUMMERBEL, 1995).

As dermatofitoses manifestam-se como uma inflamação da epiderme, derme e folículos pilosos, desencadeada por uma reação imunológica mediada por antígenos fúngicos que se difundem a partir da epiderme infectada. O hospedeiro pode responder de várias

formas a esta infecção, com uma simples mancha escamosa ou com uma reação eczematosa (WEITZMAN e SUMMERBEL, 1995).

3.6.2.1 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum é um dermatófito antropofílico de distribuição universal. É um fungo muito contagioso. A transmissão se dá pelo contato com as lesões de pessoas contaminadas. Pode afetar pelos e pele, causando processos inflamatórios geralmente crônicos, às vezes, lesões profundas conhecidas como granulomas tricofíticos (TRABULSI et al, 1999). *T. rubrum* tem sido o agente etiológico mais isolado nos casos de dermatofitoses humanas (CERVELATTI et al., 2004).

Cerca de 90% das dermatofitoses crônicas recorrentes são causadas por *T. rubrum*, este que pode ter um comportamento invasivo, causando infecções oportunistas atípicas em pacientes com o sistema imune comprometido (WEITZMAN e SUMMERBEL, 1995; GONG et al.; 2007).

3.6.3 *Candida albicans*

Leveduras do gênero *Candida* pertencem à microbiota de mucosas e pele de mamíferos, sendo descritas em todo o mundo como agente etiológico de micoses oportunistas em diversas espécies de animais domésticos e silvestres (LACAZ et al.,1980). Dentre as inúmeras espécies de *Candida*, a *C. albicans* é reconhecida como agente etiológico na maioria dos casos de candidíase em mamíferos, porém outras espécies como *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* tem apresentado crescente importância nos quadros clínicos (LACAZ et al.,1980, MORETTI et al., 2004).

3.6.4 *Malassezia furfur*

Malassezia furfur (Robbin) Baillon, 1889 (*Pityrosporum orbiculare* Sabouraud) é um micro-organismo lipofílico, agente etiológico da pitiríase versicolor (LACAZ e NAGAO, 1983; LEEMING e NOTMAN, 1987; NOGUEIRA et al., 1988). Também, pode estar associada à foliculite, dermatite seborréica e atópica, psoríase, fungemia e infecções sistêmicas (LOPES et al., 1994). É uma levedura que requer lipídio para seu desenvolvimento, faz parte da microbiota cutânea normal e do couro cabeludo (FAERGEMANN e FREDRIKSSON, 1979).

Fatores predisponentes endógenos ou exógenos geralmente estão relacionados com a patogenicidade de *M. furfur* (DORN e ROHENERT, 1977; NOGUEIRA, 1988). Entre os fatores encontram-se: clima quente e úmido, que favorece a hiperoleosidade e a hiperidratação, predisposição genética (FAERGEMANN e FREDRIKSSON, 1979), má nutrição, avitaminoses, distúrbios endócrinos, uso de corticoides, gravidez e síndrome da imunodeficiência adquirida – HIV (FAERGEMANN e FREDRIKSSON, 1979; NOGUEIRA et al., 1988).

3.6.5 Agentes antifúngicos

Os principais grupos de antifúngicos sistêmicos comumente utilizados para o tratamento de micoses superficiais e cutâneas são os imidazóis (cetoconazol), triazóis (fluconazol e itraconazol) e alilamina (terbinafina). Hoje, há uma grande quantidade de agentes antifúngicos, tanto de uso tópico, como sistêmico, entretanto, o arsenal terapêutico ainda é bastante restrito, ficando clara a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos (SIGURGEIRSSON et al.; 2009).

Os fármacos antifúngicos disponíveis, atualmente, produzem recorrência ou causam resistência e podem apresentar certa toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes (ZACCHINO, 2001).

Os agentes antifúngicos podem ser classificados em duas categorias: os que afetam a membrana celular e os que agem intracelularmente afetando processos vitais como a síntese de DNA, RNA ou proteínas (SCHAECHTER et al., 2002). Segundo Zacchino (2001), os principais mecanismos de ação dos antifúngicos são:

- inibidores de esteroides da membrana fúngica;
- inibidores da síntese de DNA/RNA;
- inibidores da topoisomerase;
- inibidores da parede celular fúngica.

O fato dos fungos possuírem parede celular (estrutura essencial para eles), diferentemente das células dos mamíferos, faz com que todos os sistemas envolvidos na sua síntese e montagem tornem-se alvos úteis para o desenvolvimento de novos antifúngicos mais específicos (ZACCHINO et al, 2001).

Segundo Polak (1999), o fármaco ideal para cura das infecções fúngicas ainda não foi descoberto. Utilizam-se fármacos obtidos como produtos de síntese orgânica ou biossíntese, dentre os quais, muitos já foram fadados ao desuso por sua toxicidade (LACAZ et al., 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético Nova Ética, modelo 114;
- Aparelho Mini Spray Dryer (modelo MSD 1.0) da Labmaq do Brasil;
- Balança analítica BEL, precisão de 0,02 mg;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AY 220, precisão de 0,01 mg;
- Banho-maria Quimis, modelo 0334M-28;
- Coluna cromatográfica de aço inoxidável Phenomenex®, Gemini 5 μ C18 110Å, 250 X 4,6mm;
- Cromatógrafo analítico Shimadzu modelo LC 20AT *proeminence*, provido de duas bombas 2LC-10ADvp, forno de coluna modelo CTO 010ASvp, sistema de controle modelo CBM 20, degaseificador modelo DGU-20A5, injetor automático de amostras modelo SIL-20A, e dois detectores ligados em série: detector com arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A e detector de fluorescência modelo RF-10 XL;
- Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu, modelo UV-1700 pharma spec;
- Estufa com circulação e renovação de ar Solab, modelo SL102;
- Lavadora ultrassônica Clear Unique;
- Microscópio eletrônico de Varredura (Jeol – JSM 6060);
- Moinho coloidal Tecnal;
- Rotavapor Tech Lab, modelo IKA RV10, com banho de água modelo IKA HB10;
- Sistema de filtração Milipore;
- Tamisador Bertel;

- Termo balança analítica BEL engineering modelo Top Ray, com sistema de secagem por infravermelho;
- Volúmetro de compactação J. engelsman, segundo a Ph. Eur. (1997);
- Medidor de PH Digital Portátil modelo PH-1700 da Instrutherm.

4.1.2 Solventes e reagentes

- Água destilada e água deionizada em equipamento Milli-Q;
- Solventes grau HPLC: acetonitrila (Tédia Brasil);
- Solventes P.A.: metanol, etanol (CRQ); acetato de etila, hexano, diclorometano (Quemis).

4.1.3 Adjuvantes farmacêuticos

- Dióxido de silício coloidal (Aerosil).

4.1.4 Substâncias de referência (padrões)

- Cetoconazol (Sigma - Aldrich);
- Epicatequina (Sigma - Aldrich).

4.1.5 Reagentes e soluções

- Ágar sabouraud-dextrose oliva;
- Ágar sabouraud-dextrose;

- Anisaldeído;
- Caldo sabouraud-dextrose oliva;
- Caldo sabouraud-dextrose;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Resazurin (Sigma - Aldrich).

4.2 Métodos

4.2.1 Material Vegetal

Constituído de folhas de *Vismia guianensis*, coletadas no campo de plantação experimental da EMBRAPA – Amazônia Ocidental. A identificação das amostras foi realizada por especialista na família e foram registradas no Herbário EAFM do IFAM - CMZL (Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas), Campus Manaus - Zona Leste, sob o número de registro 6.794.

4.2.2 Tratamento do Material Vegetal e Obtenção da Matéria-Prima vegetal

O material vegetal, após coleta, foi colocado para secar a temperatura ambiente por 48 horas, a sombra, em lugar seco e arejado. Após prévia secagem, o material vegetal foi selecionado manualmente. Após a seleção, as folhas foram pesadas e amostras retiradas para a análise do teor de umidade. Todo o material com valor de umidade acima de 12% foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, as folhas foram submetidas à moagem em

moinho de facas. O material cominuído resultante foi misturado, constituindo assim a matéria-prima vegetal.

4.2.3 Caracterização Matéria-Prima vegetal

4.2.3.1 Determinação de perda por dessecação (F. BRAS. V, 2010)

Cerca de 0,5 g, exatamente pesados, da amostra foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e levados para estufa a $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por um período de 2 horas, em seguida os pesa-filtros foram resfriados em dessecador por 20 minutos e pesados. Este procedimento foi repetido até peso constante. Depois disto foi calculada a diferença de peso entre a amostra inicial e a final determinando-se a perda por dessecação. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.3.2 Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2000)

Cerca de 50 g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foram submetidos à passagem através de tamises com abertura de malha de 1,00; 0,800; 0,710; 0,600; 0,500; 0,400; 0,330 e 0,250 mm. A tamisação foi realizada, em tamisador, a 60 vibrações por segundo durante 15 min. As frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas e os dados analisados por método gráfico. Foram construídas curvas de retenção e passagem, e histograma de distribuição, a fim de se obter o diâmetro médio de partículas do pó. Os resultados expressam a média de três determinações.

4.2.3.3 Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Cerca de 1 g da matéria-prima vegetal foi colocada em erlemeyer adicionado de 100 mL de água destilada, pesado o conjunto, e submetido à extração por decocção durante 10 minutos. Após resfriamento, pesou-se novamente o conjunto, reconstituiu-se a massa inicial com água destilada e filtrou-se desprezando os primeiros 20 mL do filtrado. Cerca de 20 g do filtrado, pesados, foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporados à secura em banho-maria, com agitação ocasional. Após a evaporação, o pesa-filtro, contendo a amostra, foi levado à estufa $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante, calculando-se o teor de sólidos. O resultado foi expresso pela média de três determinações e o teor extrativo foi calculado segundo a equação abaixo (1):

$$\text{TE} = \frac{\text{g} \cdot \text{FD} \cdot 100}{(\text{m} - \text{p})} \quad (1)$$

Onde; TE = teor de extrativos (% , m/m); g = massa (g) do resíduo seco, FD = constante, igual a 5; m = massa da amostra inicial (g); p = perda por dessecação da amostra (% , m/m).

4.2.3.4 Prospecção fitoquímica (COSTA, 1994; MATTOS, 1997)

4.2.3.4.1 Pesquisa de antraquinonas

Foi agitado 1 g do material vegetal com 10 mL de éter etílico, com posterior filtração. À solução etérea foi adicionado 1 mL de amônia diluída, agitando em seguida. Camada aquosa rosa indica resultado positivo.

4.2.3.4.2 Pesquisa de saponinas

A solução extrativa foi obtida pela adição de 10 mL de água destilada em 2 g do material vegetal, aquecendo à ebulição por 3 minutos, com posterior filtração através de algodão para tubo de ensaio. Em seguida, o tubo foi agitado verticalmente e vigorosamente por 20s. O resultado positivo é indicado pela presença de espuma persistente por mais de 20 minutos e resistente à adição de 1 mL de HCL 2N.

4.2.3.4.3 Pesquisa de alcaloides

Foram colocados 5 g do material vegetal, pulverizados, alcalinizados com carbonato de sódio à 10% e com posterior adição de 25 mL de clorofórmio. A mistura foi filtrada em funil de separação através de papel embebido em clorofórmio e particionada com 7 mL de ácido clorídrico à 2%. A camada ácida foi separada e utilizada nas reações de caracterização, uma gota da solução foi aplicada em lâmina de microscópio ao lado de uma gota dos reagentes de Dragendorff, Bouchadart, Mayer e Bertrand unindo-as posteriormente. O resultado positivo é observado pela precipitação da mistura sobre fundo escuro.

4.2.3.4.4 Pesquisa de taninos

Foram preparados decoctos com 5 g do material vegetal e 100 mL de água destilada.

4.2.3.4.4.1 Reação da gelatina

Foram adicionadas 2 gotas de ácido clorídrico em 2 mL de solução extrativa e posteriormente solução de gelatina a 2,5% gota a gota. A formação de precipitados indica a presença de taninos.

4.2.3.4.4.2 Reação com sais de ferro

Foram adicionados 10 mL de água destilada em 2 mL de solução extrativa e 4 gotas de solução de cloreto de ferro III a 1% em metanol. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e a coloração verde indica presença de taninos condensados.

4.2.3.4.4.3 Reação com acetato de chumbo

A 5 ml da solução extrativa foram adicionados 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

4.2.3.4.5 Pesquisa de flavonoides

A extração foi realizada com 3 g do material vegetal e 20 mL de éter de petróleo, sob aquecimento, em banho-maria. O resíduo obtido após filtragem foi transferido para béquer e após secagem foi adicionado 20 mL de metanol, aquecendo-se por 10 minutos em banho-maria. Filtra-se ainda quente e o filtrado é evaporado até securo, o resíduo é tratado com 10 mL de etanol, obtendo assim o extrato final.

4.2.3.4.5.1 Reação de Shinoda

Do extrato final foi transferida alíquota de 1 mL para tubo de ensaio e adicionando-se fragmento de magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado gota a gota. O resultado positivo é observado pelo aparecimento de coloração rósea ou vermelha após o desprendimento do gás hidrogênio.

4.2.3.4.5.2 Reação de Taubock

3 mL do extrato foi evaporado até securo em banho de aquecimento, esfriado e umedecido o resíduo com algumas gotas de acetona. Posteriormente foram adicionados alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico, evaporando em banho-maria até securo, evitando aquecimento prolongado. O resíduo obtido foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e a mistura obtida foi observada sob luz ultravioleta (254 nm). O aparecimento de fluorescência amarelo esverdeada indica a presença de flavonoides.

4.2.3.4.5.3 Reação de Pew

Em banho-maria foram evaporados até secura 3 mL do extrato final em tubo de ensaio e ao resíduo foram adicionados 3 mL de metanol, uma pequena porção de zinco metálico e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. O resultado positivo é confirmado pelo surgimento de coloração vermelha.

4.2.3.4.5.4 Reação com cloreto de ferro III

Foram adicionadas algumas gotas de cloreto de ferro III a 2% a 1 mL do extrato final. Dependendo do flavonoide existente a coloração varia entre verde, amarelo e até violáceo.

4.2.3.4.5.5 Reação com cloreto de alumínio

Foram umedecidas diferentes áreas de papel de filtro com o extrato, colocando sobre cada uma delas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. O aparecimento de fluorescência verde-amarelada sob a luz ultravioleta indica resultado positivo.

4.2.4 Estudo preliminar para obtenção de solução extrativa padronizada

Para seleção do líquido extrator foram preparados:

- três extratos com diferentes solventes através da técnica de maceração seguindo protocolo descrito na figura 2:

- dois extratos através da técnica de maceração por um período de 24 horas, sendo um utilizando etanol e outro utilizando metanol como solvente.

Todos os extratos foram obtidos, inicialmente, com uma relação droga:solvente de 5% (m/V), reduzidos de volume em rotavapor e o resíduo colocado em capela com exaustão até secura total, a fim de serem avaliados quanto à atividade antifúngica.

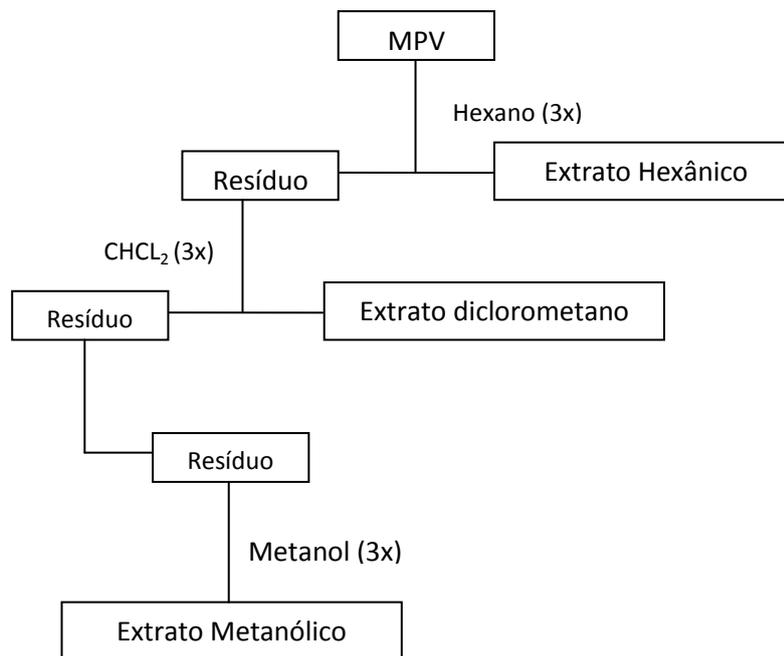


Figura 2: Fluxograma para obtenção dos extratos de *Vismia guianensis*

4.2.5 Avaliação da atividade antifúngica

Foi realizada seguindo a Norma M27-A2, que descreve o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica, estabelecida pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) agora denominado CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), que, embora não seja exclusivo para dermatófitos, padroniza o teste de susceptibilidade antifúngica (TSA) para fungos filamentosos utilizando duas metodologias (macro e microdiluição em

caldo), ambas com boa reprodutibilidade interlaboratorial (NCCLS, 2002). Quando era desejada uma melhor visualização dos resultados, para que fossem registrados através de figuras, adicionou-se alamar blue contra cepas de *Candida albicans*, *Malassezia furfur* e *Trichophyton rubrum* (COLLINS e FRANZBLAU, 1997).

4.2.5.1 Micro-organismos

Foram utilizados micro-organismos da coleção fúngica do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Utilizou-se três cepas diferentes para cada micro-organismo testado e as referências de cada cepa encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Referência das cepas testadas

Micro-organismo	Cepa		
<i>Candida albicans</i>	ATCC 36232/05	U 1101/09	Tp 415/08
<i>Malassezia furfur</i>	PV 401/07	PV 399/05	PV 697/07
<i>Trichophyton rubrum</i>	ATCC 28189/03	U 136/10	Tp 470/09

Onde: ATCC (*American type culture collection*); U (isolado de unhas); Tp (isolado dos pés); PV (ptíriase versicolor).

4.2.5.2 Inóculos

Foi realizada a subcultura (repique) dos organismos, em tubos estéreis com ágar Sabouraud-dextrose para *C. albicans* e *T. rubrum*, e ágar Sabouraud-dextrose oliva para *M. furfur* executando passagens dos micro-organismos para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação foi de 35 °C.

C. albicans - o inóculo foi preparado escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm de cultura de 24 - 48 horas a 37 °C.

M. furfur - o inóculo foi preparado escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm de cultura de 48 - 72 horas a 37 °C.

T. rubrum - o inóculo foi preparado retirando-se fragmentos de cultura 10 – 15 dias a 28 °C.

As colônias ou fragmentos de cultura foram suspensos em 5 mL de meio de cultura estéril (caldo sabouraud-dextrose). A suspensão resultante foi colocada em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada após contagem de células em câmara de Neubauer, para obter-se uma suspensão-padrão contendo de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL.

4.2.5.3 Microdiluição

O teste de microdiluição foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 poços com fundo chato). Inicialmente, foi adicionado em cada poço 100 µL do meio de cultura. Em seguida, as concentrações do fármaco padrão, cetoconazol (32 µg/mL) foram dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100 µL, com uma pipeta multicanal. A fileira 1 continha a maior concentração do fármaco (16 µg/mL) e a fileira 10 a menor concentração do fármaco (0,03 µg/mL). Para os extratos em teste foi realizado o mesmo procedimento que para o fármaco-padrão, exceto no que se refere à concentração testada (várias concentrações foram testadas neste trabalho, inicialmente 1,2 mg/mL e posteriormente 64 mg/mL, como maior concentração a ser analisada).

Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado, com 100 µL da correspondente suspensão do inóculo, o que leva à diluição e à concentração do inóculo no poço de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Os poços controle de crescimento na fileira 11 contêm 100µL de meio estéril, isento de fármaco, e foram inoculados com 100µL das suspensões concentradas dos inóculos. Os organismos de controle de qualidade foram testados da mesma maneira e incluídos toda vez que se testou um isolado. A fileira 12 da placa de microdiluição foi usada para efetuar o controle da esterilidade (apenas meio isento de fármaco).

As placas de microdiluição foram incubadas à 35 °C por um período de 24 horas. Observou-se o crescimento celular e nos casos em que se julgou necessário, foram adicionados 50 µL de solução-padrão de Alamar Blue (0,05 mg/ml) em cada poço para verificar a viabilidade celular pela mudança de coloração. Os testes foram realizados em duplicata, tanto para o fármaco de referência quanto para os extratos testados.

4.2.6 Avaliação de parâmetros extrativos para obtenção da solução extrativa

A partir do extrato que apresentou melhor atividade antimicrobiana foi avaliada a influência do processo extrativo seguindo um experimento fatorial do tipo 2x3 replicado, onde as variáveis independentes estudadas foram: método de extração e tipo de solvente extrator (tabela 3), e as variáveis dependentes, a fim de padronizar uma solução extrativa com melhores características físico-química e biológica, foram o resíduo seco, teor de taninos totais e atividade antimicrobiana.

Foram estudados três métodos de extração:

- maceração, na qual a extração da matéria-prima vegetal foi realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período de 24 horas, sob a agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator.

- a decocção sob-refluxo, onde a matéria-prima vegetal foi colocada para ebulição juntamente com o solvente em balão acoplado a um condensador, sendo aquecida durante um tempo de 15 minutos, contado a partir do início da fervura.

- extração por aparelho de ultrassom, onde parece haver o rompimento da parede celular que envolve a célula vegetal por efeitos da cavitação e a intensificação da transferência de massa devido à facilidade de acesso do solvente no interior da célula, por período de tempo de 15 minutos.

O outro parâmetro extrativo avaliado foi o tipo de solvente extrator: etanol e etanol:água (50:50 v/v).

A relação droga:solvente (m/v) foi mantida fixa, sendo 5% (m/v) em todos os métodos extrativos.

Tabela 3: Modelo fatorial para avaliação de parâmetros extrativos

Fatores	Níveis
A) Tipo de solvente	Etanol:Água 50:50 v/v (-1) Etanol (+1)
B) Método	Maceração (-1) Ultrassom (0) Decocção (+1)

Segundo o planejamento fatorial proposto foram obtidas 6 soluções extrativas as quais permitiram verificar a influência individual e interação dos fatores estudados (tabela 4).

Tabela 4: Desenho fatorial 2x3

Experimento	Fator A	Fator B
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	+1	-1
5	+1	0
6	+1	+1

4.2.6.1 Determinação do resíduo seco (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Uma alíquota de 20,0 mL de solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro tarado e evaporada, até secura, em banho-maria. O pesa-filtro, contendo o resíduo, foi colocado em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, em seguida foi colocado em dessecador para arrefecimento por 20 minutos e pesados. Esse procedimento foi repetido de hora em hora até atingir peso constante. O resultado foi expresso em relação a 100 g da solução extrativa pela média de seis determinações.

4.2.6.2 Obtenção dos Extratos secos

Os extratos secos por aspersão foram obtidos em *Mini Spray Dryer* (modelo MSD 1.0, da Labmaq do Brasil) através da secagem das soluções extrativas obtidas de acordo com

o planejamento fatorial. As soluções extrativas foram secas sem adição de adjuvantes e as condições operacionais de secagem que foram utilizadas estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Condições operacionais de secagem da solução extrativa

Parâmetros	Valores
Temperatura de entrada	110 °C
Temperatura de saída	80 ± 3 °C
Fluxo de alimentação	0,65 mL/min
Diâmetro do atomizador	1,0 mm

4.2.6.3 Atividade antifúngica

Foi avaliada a atividade antifúngica, conforme item 4.2.5, dos extratos secos obtidos através do planejamento fatorial.

4.2.6.4 Doseamento de Taninos totais por espectrofotometria UV-VIS

4.2.6.4.1 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal

Foram obtidos espectros de varredura da solução obtida pela diluição do extrato seco por aspensão e comparação com espectro de varredura da substância de referência (epicatequina), na região do ultravioleta e do visível ($\lambda = 200$ a 800 nm). O comprimento ideal após varredura encontrado foi de 278 nm.

4.2.6.4.2 Determinação do coeficiente de extinção molar ($A_{1cm}^{1\%}$) do padrão de epicatequina

Foi determinado através de curva de calibração a partir de uma solução de epicatequina a 1% (m/v), utilizando-se a seguinte equação (2):

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{A_p \cdot 10}{C} \quad (2)$$

onde: $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de absorção específica da epicatequina, A_p = absorvância da solução de epicatequina, C = concentração da epicatequina (mg/mL)

4.2.6.4.3 Doseamento espectrofotométrico de Polifenóis Totais e Fração não-tanante através de leitura direta para determinação de Taninos totais (BÖHME e HARTKE 1976, modificado por MARTINS et al., 1998).

Foram avaliados todos os extratos obtidos através do planejamento fatorial através de:

- Determinação de polifenóis totais (PT)

Preparou-se uma solução-mãe utilizando-se 0,0125 g de extrato seco diluído em 100 mL de água (solução mãe), em seguida transferiu-se uma alíquota de 5 mL dessa solução para um balão de 10 mL e completou-se o volume com água destilada, então realizou-se a leitura da absorvância em comprimento de onda a 278 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

- Determinação da fração não-tanante (FNT)

150 mg de caseína foi adicionado a 10,0 mL da solução-mãe. A mistura foi agitada em agitador magnético, durante uma hora e, em seguida, filtrada com papel filtro. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água destilada, sendo realizada leitura da absorbância em comprimento de onda a 278 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.6.4.4 Determinação do teor de taninos totais (TT)

O teor de taninos totais foi calculado através da diferença entre o teor de polifenóis totais e da fração não-tanante, através das equações 3, 4 e 5.

$$PFT = \frac{A1 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_{1\%}} \quad (3) \quad FNT = \frac{A2 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_{1\%}} \quad (4)$$

$$TT = PFT - FNT \quad (5)$$

onde: PFT = polifenóis totais (g%); FNT = fração não-tanante (g%); TT = taninos totais; A1 = absorbância de polifenóis totais; A2 = absorbância da fração não-tanante; FD = fator de diluição; m = massa de matéria-prima vegetal (g); p = perda por dessecação de matéria-prima vegetal (g); $A^{1\%}$ = coeficiente de absorção específica da epicatequina.

4.2.7 Validação da metodologia analítica

A metodologia de quantificação por leitura direta foi validada seguindo os parâmetros descritos abaixo (USP 25, 2002; ICH, 1995).

4.2.7.1 Linearidade

A linearidade foi estabelecida pela média de três curvas calibração.

As curvas de calibração do padrão epicatequina e do Extrato Seco por Aspersão (ESA) foram obtidas conforme descrito abaixo:

4.2.7.1.1 Padrão (epicatequina)

A curva de calibração foi obtida através da realização da análise de soluções aquosas do padrão nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL no comprimento de onda de 278 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco. Os resultados correspondem à média de três leituras para cada concentração.

4.2.7.1.2 ESA (extrato seco por aspersão)

A curva de calibração foi obtida através da realização da análise de soluções do ESA nas concentrações 12,5; 25; 37,5; 50 e 62,5µg/mL no comprimento de onda de 278 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco. Os resultados correspondem à média de três leituras para cada concentração.

4.2.7.2 Exatidão

A exatidão foi realizada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da solução padrão adicionada à amostra. A amostra sem adição de padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado (concentração estimada) foram analisadas e a recuperação foi expressa em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada, conforme a equação 6 da RE 899/2003 (BRASIL, 2003):

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração média experimental/concentração teórica}) \times 100 \quad (6)$$

Quantidades conhecidas de epicatequina foram adicionadas em triplicata à solução de ESA (25 µg/ml) em três níveis de concentração baixo (1 µg/mL), médio (2 µg/mL) e alto (3 µg/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 278 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco.

4.2.7.3 Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada pela análise de seis amostras individuais, tanto do padrão como da solução do extrato seco, conforme descrito abaixo. A repetibilidade foi expressa através do coeficiente de variação (CV).

Para o estudo da repetibilidade por leitura direta foi utilizada a análise de seis determinações a 100% da concentração testada, ou seja, 2 µg/mL para o padrão e 50 µg/mL para o ESA. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 278 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco.

4.2.7.4 Precisão intermediária

Foi verificada através de três concentrações do ESA (25, 37,5 e 50 µg/mL) e do padrão (1, 2, 3 µg/mL) escolhidas a partir da curva de calibração, sendo analisada em três dias diferentes, em triplicata. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação percentual.

4.2.8 Obtenção da Solução Extrativa Padronizada

Através dos resultados do planejamento fatorial, verificou-se que a solução extrativa que apresentou melhores resultados na inibição fúngica foi obtida através de maceração, por um período de extração de 24 horas, utilizando uma relação droga:solvente de 5 % (m/V) e etanol:água (50:50 v/v) como líquido extrator. Sendo assim, este método escolhido para padronização da solução extrativa e obtenção do extrato seco padronizado, com características físicas e biológicas definidas.

4.2.8.1 Caracterização da Solução Extrativa Padronizada

4.2.8.1 Determinação do resíduo seco

Foi realizado conforme item 4.2.6.1.

4.2.8.2 Determinação do pH

Foi realizada com uma amostra de 10,0 mL de solução extrativa em Medidor de pH Digital calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. O resultado foi expresso pela média de três determinações, segundo FARMACOPÉIA BRASILEIRA V (2010).

4.2.8.3 Determinação da densidade

Foi realizada em picnômetro de 25 mL, previamente calibrado através da aferição do mesmo vazio e contendo água. Em seguida foi determinada a massa do picnômetro contendo a solução extrativa. A densidade foi calculada segundo a equação 7 abaixo e o resultado expressa a média de três repetições, segundo FARMACOPÉIA BRASILEIRA V (2010).

$$D_{25}^{25} = \frac{m_{se}}{m_{H_2O}} \quad (7)$$

d = densidade relativa; m_{se} = massa de solução extrativa; m_{H_2O} = massa da água.

4.2.8.4 Determinação do Teor de Taninos Totais na solução extrativa

- **Determinação de polifenóis totais (PT):** Uma alíquota de 10,0 mL da solução extrativa foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume completado com água destilada (solução-mãe). Alíquota de 50,0 mL da solução mãe foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume completado com água destilada, em seguida, 5,0 mL dessa solução foi diluída para balão de 25,0 mL com água destilada e desta, retirou-se 5,0 mL

e diluiu-se para balão de 10,0 mL, então realizou-se a leitura direta em espectrofotômetro no comprimento de onda de 278 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

- **Determinação da fração não-tanante (FNT):** 150 mg de caseína foi adicionado a 10,0 mL da solução diluída em balão volumétrico (50,0 ml de solução extrativa para 100,0 mL de água). A mistura foi agitada em agitador durante uma hora e em seguida filtrada com papel filtro. 5,0 mL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume completado com água destilada, em seguida, transferiu-se 5,0 mL para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata, conforme descrito para os polifenóis totais.

- **Determinação do teor de taninos totais (TT):** calculado conforme item 4.2.6.4.4.

4.2.9 Obtenção e Desenvolvimento do Extrato Seco por Aspersão

O extrato seco por aspersão foi obtido em *Mini Spray Dryer* (modelo MSD 1.0, da Labmaq do Brasil) através da secagem da solução extrativa. O desenvolvimento foi realizado através da avaliação da viabilidade de obtenção de extrato seco com e sem adjuvante farmacêutico. Foi avaliada a utilização de dióxido de silício coloidal (Aerosil) na proporção de 30%, a fim de se aumentar o rendimento da operação de secagem a melhorar a estabilidade de produto obtido.

A concentração percentual dos adjuvantes foi calculada com base no resíduo seco da solução extrativa.

O extrato seco selecionado para o estudo tecnológico foi aquele que apresentou melhor atividade antifúngica.

O material a ser seco foi mantido sob agitação, com auxílio de agitador magnético, durante todo o procedimento de secagem, com o intuito de obter um produto com características homogêneas. Os ESA (Extrato seco sem adjuvante) e o PSA (obtido com adjuvante) foram adicionados em frascos opacos, a fim de protegê-los da luz. As condições operacionais de secagem que foram utilizadas estão descritas na tabela 5, sendo as mesmas utilizadas para obtenção dos extratos secos obtidos pelo planejamento fatorial.

4.2.10 Caracterização do Extrato Seco e Produto Seco por Aspersão

4.2.10.1 Avaliação das Características Macroscópicas

As características macroscópicas foram avaliadas pela observação visual da cor e aspecto do produto segundo CARVALHO (1997).

4.2.10.2 Umidade residual

A umidade residual foi determinada por método gravimétrico, utilizando-se estufa a 105 °C, o ensaio foi realizado em triplicata, segundo Farmacopeia Brasileira V (2010).

4.2.10.3 Determinação do Teor de Taninos Totais

A determinação quantitativa foi realizada conforme descrito no item 4.2.6.4.3.

4.2.10.4 Rendimento Operacional

O rendimento operacional foi determinado pela pesagem do produto obtido no final da secagem e comparação com o teor de sólidos esperado.

4.2.10.5 Determinação da densidade bruta e de compactação, Fator de Hausner e Índice de Carr e de Densificação (HAUSNER, 1967; CARR, 1965).

Os volumes brutos e de compactação foram medidos em volúmetro de compactação, onde 10 g do pó, exatamente pesados, foram vertidos numa proveta de 25 mL (volume bruto = V_b) e submetidos a 10 (V_{10}), 500 (V_{500}) e 1250 quedas sequenciais (DIN 5394). O ensaio foi continuado em sequência de 1250 quedas até que a diferença entre duas leituras subsequentes fosse inferior ou igual a 0,1 mL, sendo este considerado o volume de compactação (V_c). A partir dos dados obtidos neste ensaio foram calculadas as densidades brutas e de compactação, o Fator de Hausner, o Índice de Carr e de densificação, segundo as equações (8, 9, 10, 11 e 12), respectivamente. Os resultados do Índice de densificação foram extrapolados para massa de 100 g, conforme a literatura recomenda.

$$d_b = \frac{M_a}{V_b} \quad (8) \quad d_c = \frac{M_a}{V_c} \quad (9) \quad FH = \frac{d_c}{d_b} \quad (10)$$

$$IC = \frac{d_c - d_b}{d_c} \times 100 \quad (11) \quad D = V_{10} + V_{500} \quad (12)$$

Onde: db = densidade bruta (g/mL); Ma = massa (g); dc = densidade de compactação; FH = Fator de Hausner; IC = índice de Carr; D = índice de densificação.

4.2.10.6 Análise granulométrica

Realizada pela medida do diâmetro de *Feret* através da contagem de, no mínimo, 500 partículas em microscópio óptico com ocular provida de nônio com 10 vezes de aumento e objetiva de 40 vezes. O nônio contém a escala de 1 mm que apresenta 100 divisões, onde cada divisão do nônio corresponde a 3,4 μm . A lâmina foi preparada com uma pequena quantidade de pó disperso a seco. O diâmetro médio e o desvio padrão das partículas foram determinados graficamente (LANTZ, 1989). Os resultados foram obtidos através das curvas de distribuição granulométrica em função da frequência acumulada percentual. O diâmetro médio foi calculado considerando o diâmetro de 50% das partículas e o desvio padrão da distribuição.

4.2.10.7 Avaliação da higroscopicidade (NYQVIST, 1983)

Foi realizada através do ensaio de estabilidade em ambiente com atmosfera controlada de 65% de umidade relativa, determinada com o uso de um termohigrômetro. Utilizou-se uma solução saturada de Iodeto de Potássio para a criação da atmosfera desejada no interior de um dessecador. As amostras dos produtos secos, colocadas no dessecador, foram pesadas sequencialmente durante 15 dias, nas três primeiras 24 horas e depois a cada 72 horas para verificar ganho de umidade. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

4.2.10.8 Cromatografia em camada delgada

Foi desenvolvida em placas de sílica gel 60 F254 de 8 cm x 5,5 cm, onde foi aplicado 5 µL do extrato seco ressuspenso em metanol. Os padrões analisados foram os seguintes: ácido clorogênico, quercetina, hiperosídeo e quercetrina. A fase móvel utilizada foi uma solução de acetato de etila - metanol - água (100:13, 5: 10 v/v/v). As placas cromatográficas foram reveladas com Anisaldeído.

4.2.10.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas desenvolvidas para análise do perfil do ESA de *V. guianensis* foram: fase estacionária, coluna de fase reversa C₁₈. Como sistema de eluição foi empregado gradiente linear conforme tabela 6, constituído de fase móvel acetonitrila e água.

Tabela 6: Gradiente de eluição do sistema cromatográfico

Tempo (min.)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0	10	90
15	40	60
30	100	0
45	100	0
55	10	90

As análises foram realizadas injetando 2 µL de uma solução a 4 µg/mL de ESA dissolvido em acetonitrila, empregando fluxo de 0,8 mL/min.; detecção: 275 nm.

4.2.10.10 Análise das partículas em microscopia eletrônica de varredura

As amostras do extrato seco e do produto seco foram previamente metalizadas em metalizador Jeol Jee 4B (JVG-IN) utilizando-se um filme de ouro em suporte de metal. A análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol – JSM 6060. A morfologia, a superfície e homogeneidade de tamanho e forma das partículas foram observadas. A tensão utilizada foi de 10 kV.

4.2.11 Avaliação da atividade antifúngica

Avaliou-se a atividade antifúngica do ESA e do PSA conforme item 4.2.5.

4.2.12 Análise estatística

Na análise estatística aplicou-se a análise de variância (ANOVA) *one way* e *two way*, teste “t” de Student, regressão e correlação linear, apropriados à validação metodológica e desenho estatístico fatorial envolvido (MONTGOMERY, 1991).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)

Para caracterização da MPV foram analisados alguns parâmetros físico-químicos: o teor de umidade, o teor extrativo, a determinação do diâmetro médio de partícula e a triagem fitoquímica. O excesso de umidade pode promover o crescimento microbiano, a presença de fungos ou insetos e a deterioração de substâncias por hidrólise. A determinação do diâmetro médio de partícula é importante para garantir a reprodutibilidade do processo extrativo, uma vez que a superfície de contato entre o líquido extrator e a droga vegetal influencia na extração (LIST e SCHMIDT, 1989). Os resultados para caracterização das matérias-primas vegetais, dos quatro lotes analisados, encontram-se descritos na tabela 7 abaixo.

Tabela 7: Caracterização da Matéria-prima vegetal de *Vismia guianensis*

Ensaio	Primeiro lote (03/2011) $\bar{x} \pm s$	Segundo lote (11/2011) $\bar{x} \pm s$	Terceiro lote (06/2012) $\bar{x} \pm s$	Quarto lote (10/2012) $\bar{x} \pm s$
Perda por dessecação (%)	11,36 ^a ± 0,04	7,2 ^c ± 0,01	7,7 ^b ± 0,1	7,8 ^b ± 0,17
Teor extrativo (%)	21,15 ^a ± 0,13	19,05 ^b ± 0,45	15,5 ^c ± 0,3	11,9 ^d ± 0,2
Diâmetro médio (µm)	647,3 ^a ± 0,04	594,6 ^a ± 0,003	614,3 ^a ± 0,02	626,1 ^a ± 0,05

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($\alpha = 0,05$).

Pode ser observado que as amostras de todos os lotes analisados apresentaram perda por dessecação abaixo de 11,5%, indicando que a operação de secagem foi eficiente em eliminar o conteúdo de umidade e, também, que a umidade residual está apropriada para o armazenamento, ou seja, abaixo de 14%, evitando, assim, o desenvolvimento de micro-

organismos que possam comprometer a estabilidade da MPV e contaminar os produtos elaborados a partir da mesma (LIST e SCHMIDT, 1989).

O ensaio de teor extrativo descreve a quantidade de sólidos solúveis presentes na matéria-prima vegetal e, também, a eficiência da água em extrair as substâncias presentes nas células vegetais (WHO, 1998; LIST e SCHMIDT, 1989). Quando se compara o teor extrativo, pode ser observado que houve uma redução gradual do teor de sólidos solúveis em água, onde o primeiro lote apresentou o maior teor de extrativos, havendo uma diferença significativa de 10% entre o primeiro e o quarto lote. Este fato pode estar relacionado com as características agronômicas do solo e de temperatura na hora da coleta, levando em consideração, também, que nas três últimas coletas a planta estava em estágio de frutificação, e normalmente as plantas que estão em fase de frutificação ou em floração possuem baixas concentrações de substâncias químicas nas folhas (MARTINS, 1995).

A análise granulométrica é importante para identificação da distribuição de tamanho de partícula da matéria-prima vegetal, uma vez que a granulometria da matéria-prima é um dos fatores de grande influência no processo extrativo, exigindo assim, uma padronização (LIST e SCHMIDT, 1989). A padronização da granulometria das matérias-primas vegetais é interessante do ponto de vista tecnológico, uma vez que partículas muito grandes (diminuem a superfície de contato com o líquido extrator) e muito reduzidas (pela capacidade de formar aglomerados reduzindo, também, a superfície de contato para extração) costumam diminuir a eficiência do processo extrativo (LIST e SCHMIDT, 1989), sendo assim, um diâmetro médio em torno de 500 μm é bastante favorável para a extração dos componentes químicos, o que foi apresentado por todos os lotes analisados, um diâmetro médio que variou de 594 a 647 μm , sem diferença estatisticamente significativa. Um estudo realizado analisando a influência do tamanho de partícula na eficiência da extração do princípio ativo de *Pothomorphe*

umbellata, analisou os tamanhos de 840 e 420 μm , verificando que, a diminuição do tamanho de partícula aumenta em três vezes a extração do princípio ativo (NORIEGA et al., 2005).

Na Figura 3 estão descritos os histogramas de distribuição granulométrica das matérias-primas vegetais, demonstrando uma ampla faixa de distribuição granulométrica onde, a maioria das partículas ficou retida entre as faixas de 500 a 800 μm , com prevalência na faixa de 800 a 710 μm para os primeiro, segundo e terceiro lotes e na faixa de 600 a 500 μm para o quarto lote.

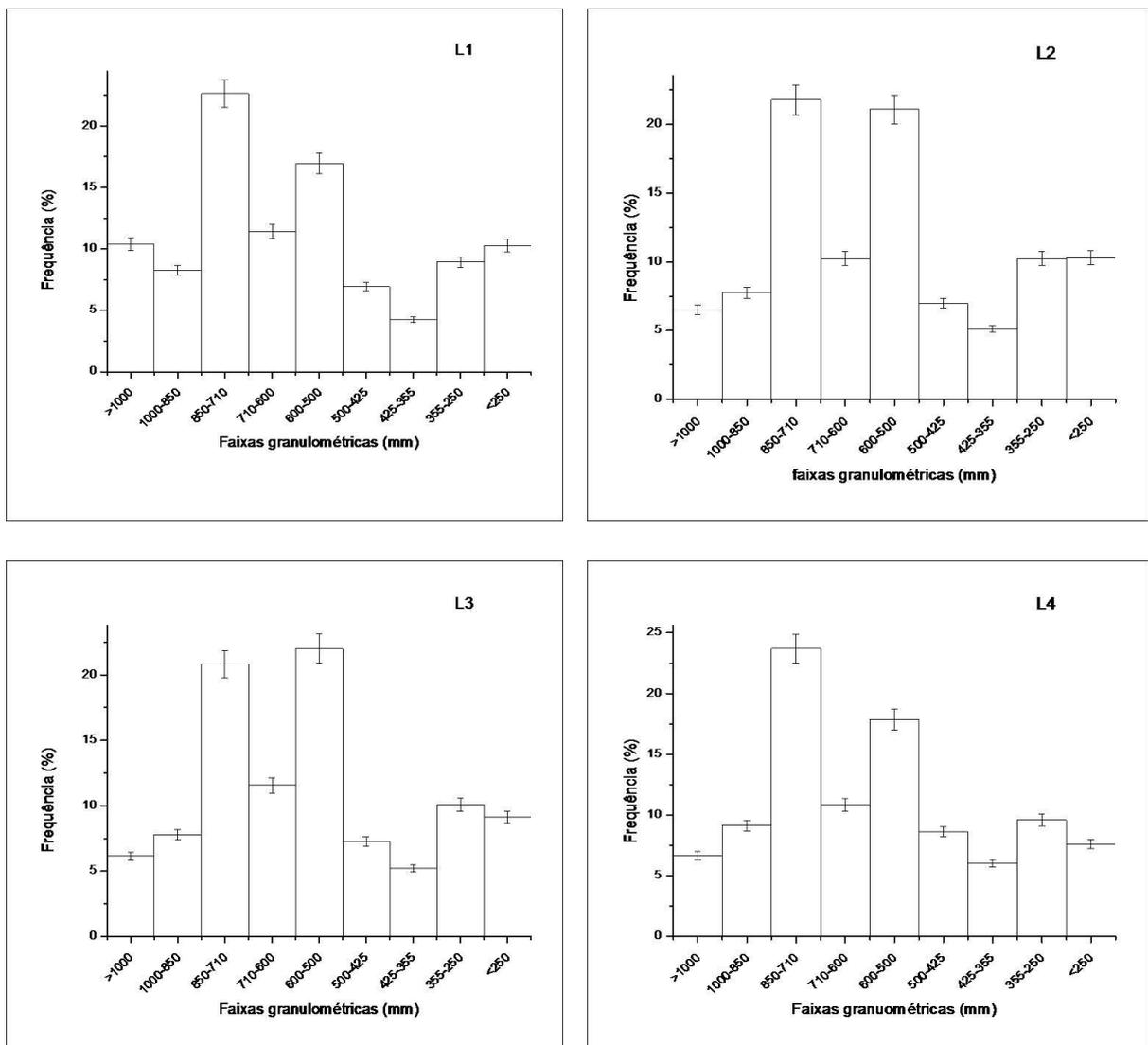


Figura 3: Histograma de distribuição granulométrica da Matéria-prima vegetal de *Vismia guianensis*. Onde: L1(primeiro lote); L2 (segundo lote); L3 (terceiro lote) e L4 (quarto lote).

Através dos gráficos de retenção e passagem (figura 4), obtidos a partir da distribuição granulométrica das MPV, é possível determinar o tamanho médio das partículas, o qual variou de 594,6 a 647,3 μm nos diferentes lotes estudados, observando-se como um tamanho adequado para o processo extrativo (LIST e SCHMIDT, 1989).

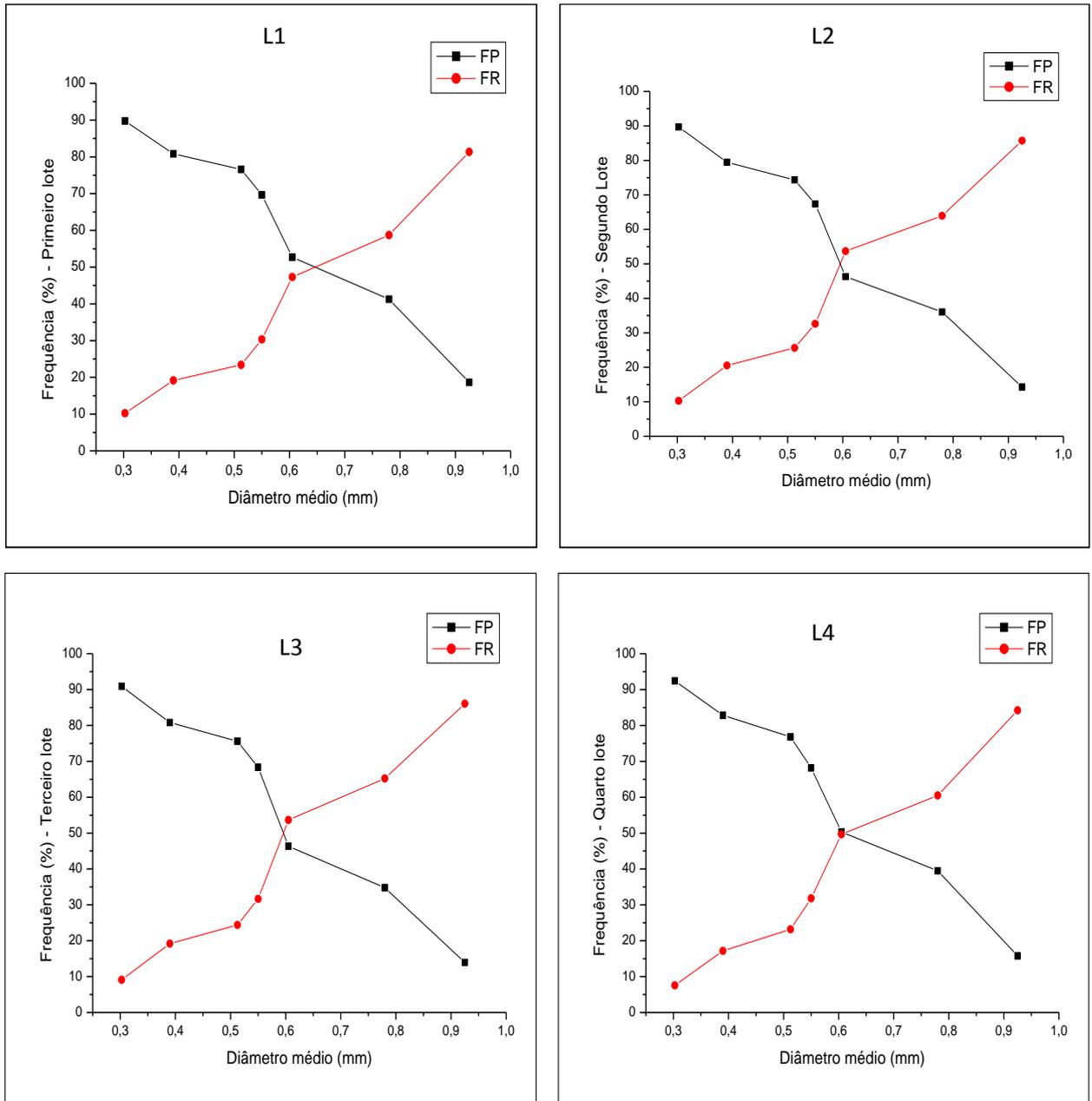


Figura 4: Curva de Retenção e Passagem para MPV de folhas de *V. guianensis* do primeiro (L1), segundo (L2), terceiro (L3) e quarto (L4) lotes.

Os resultados para triagem fitoquímica, referente a todos os lotes, encontra-se na tabela 8, a qual demonstra que foram identificados os seguintes metabólitos secundários: antraquinonas, antraquinonas glicosiladas, flavonoides, saponinas, taninos hidrolisáveis e condensados, em todos os lotes estudados. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2009a), que também realizou a triagem fitoquímica das folhas de *V. guianensis*.

Tabela 8: Triagem fitoquímica para os quatro lotes analisados

Metabólito	Positivo	Negativo
Antraquinonas	X	
Antraquinonas glicosiladas	X	
Alcaloides		X
Flavonoides	X	
Saponinas	X	
Taninos	X	
Taninos hidrolisáveis	X	
Taninos condensados	X	

5.2 Estudo preliminar de atividade antifúngica para padronização da solução extrativa

O ensaio preliminar para determinar a solução extrativa com melhor atividade antifúngica foi iniciado com a avaliação de três extratos a 5% (m/v) de *V. guianensis*: extrato metanólico, extrato diclorometânico e extrato hexânico (preparados conforme item 4.2.4), como fármaco padrão positivo foi utilizado cetoconazol, frente à cepa ATCC 36232 de *C. albicans*.

O bioensaio foi realizado com a finalidade de determinar qual a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* ATCC 36232 (figura 5), onde foi verificado que o extrato metanólico das folhas inibiu o crescimento

do microrganismo e demonstrou concentração inibitória mínima de 160 $\mu\text{g/mL}$. O cetoconazol apresentou concentração inibitória mínima de 2 $\mu\text{g/mL}$, concordando com outro teste descrito na literatura (BATISTA et al, 1999). Os demais extratos das folhas testados (hexânico, diclorometânico) não inibiram o crescimento de *C. albicans*, em nenhuma das concentrações testadas. Chegando à conclusão que provavelmente as substâncias ativas foram extraídas pelo metanol.

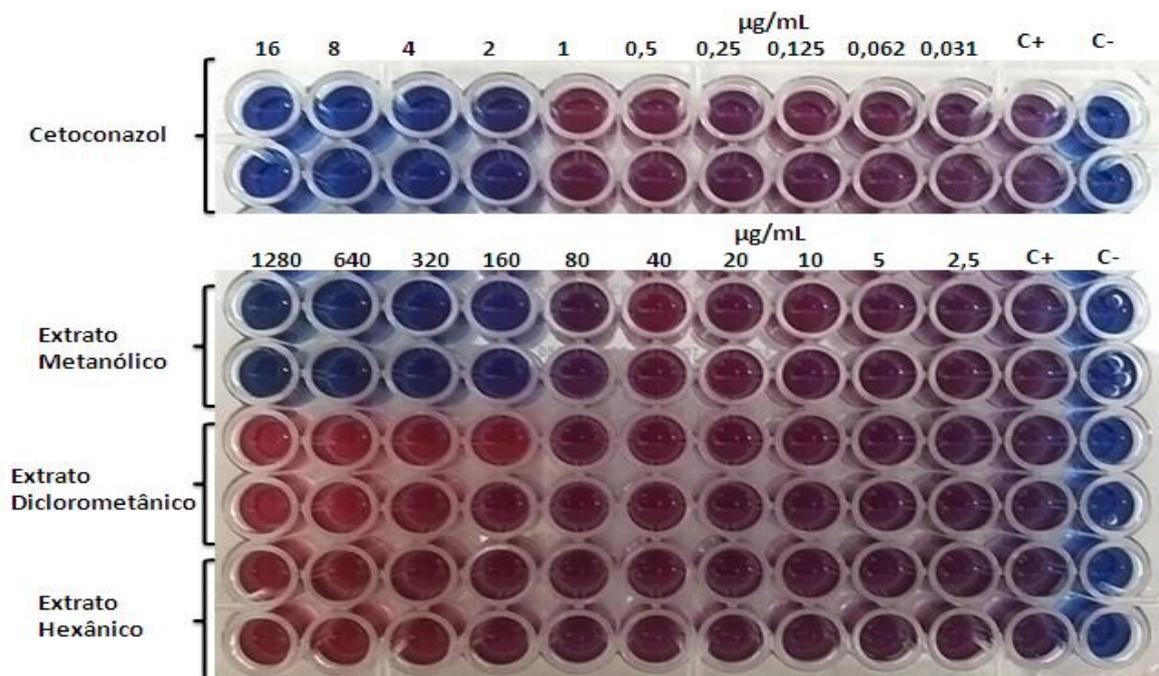


Figura 5: Bioensaio com a finalidade de determinar a CIM dos extratos das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* ATCC 36232.

O Alamar Blue é um indicador fluorescente/colorimétrico cujo princípio ativo é a resazurina (O'BRIEN et al., 2000). Esse apresenta a capacidade de indicar por meio de mecanismos de oxido-redução, o crescimento microbiano. A resazurina (azul e sem fluorescência) é reduzida a resorufin (rosa e altamente fluorescente), que é ainda mais reduzida para hidroresorufin (incolor e sem fluorescência) após algumas horas de reação. Não se sabe como essa redução ocorre, sugere-se que possa ser através da atividade enzimática

intracelular ou no meio como uma reação química (O'BRIEN et al., 2000), ou seja, a atividade enzimática intracelular das células do micro-organismo leva à redução da Resazurina a resofurin, sendo responsável pela mudança na coloração da reação, indicando onde houve ou não crescimento microbiano. Na Figura 5, pode ser observado que somente o Extrato metanólico e o cetoconazol (controle) foram capazes de promover inibição no crescimento de *C. albicans* (poços azuis).

Segundo Santos e colaboradores (2006), atividade antimicrobiana de *V. guianensis* é observada em sua fração hexânica de extratos brutos das raízes e casca, entretanto, os micro-organismos sensíveis a sua ação foram *Mycobacterium phlei*, *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*. Camelo (2010) realizou uma observação da ação antimicrobiana contra a *S. aureus* com teste de difusão em disco do extrato seco de *V. guianensis* (Aubl.) Choisy diluído em DMSO nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL, ocorrendo formação de halo de inibição com todas as concentrações (CAMELO, 2010).

Considerando que o extrato metanólico apresentou melhores resultados, realizou-se outro ensaio utilizando uma solução extrativa obtida com um solvente mais polar (etanol). Analisou-se, novamente, o extrato metanólico testado anteriormente, juntamente com os extratos metanólico e etanólico obtidos através de maceração por 24 horas, com a mesma relação droga:solvente de 5% (m/v). A atividade desses extratos foi avaliada frente a mais duas cepas de *C. albicans* (isolados clínicos), frente a três cepas de *M. furfur* (isolados clínicos) e frente a cepas de *T. rubrum* (dois isolados clínicos e um ATCC). Os resultados demonstraram que para as cepas de *C. albicans* testadas não houve diferença na CIM entre todos os extratos analisados, o que pode ser verificado nos gráficos encontrados na figura 6. A figura 7 mostra a CIM dos extratos para as cepas de *M. furfur*, onde pode ser verificado que apenas o extrato metanólico apresentou pequena diferença dos demais extratos na CIM para a

cepa PV 697, os outros extratos reproduziram o mesmo resultado para cada micro-organismo.

Para as cepas de *T. rubrum* todos os extratos inibiram com CIM de 1 mg/mL.

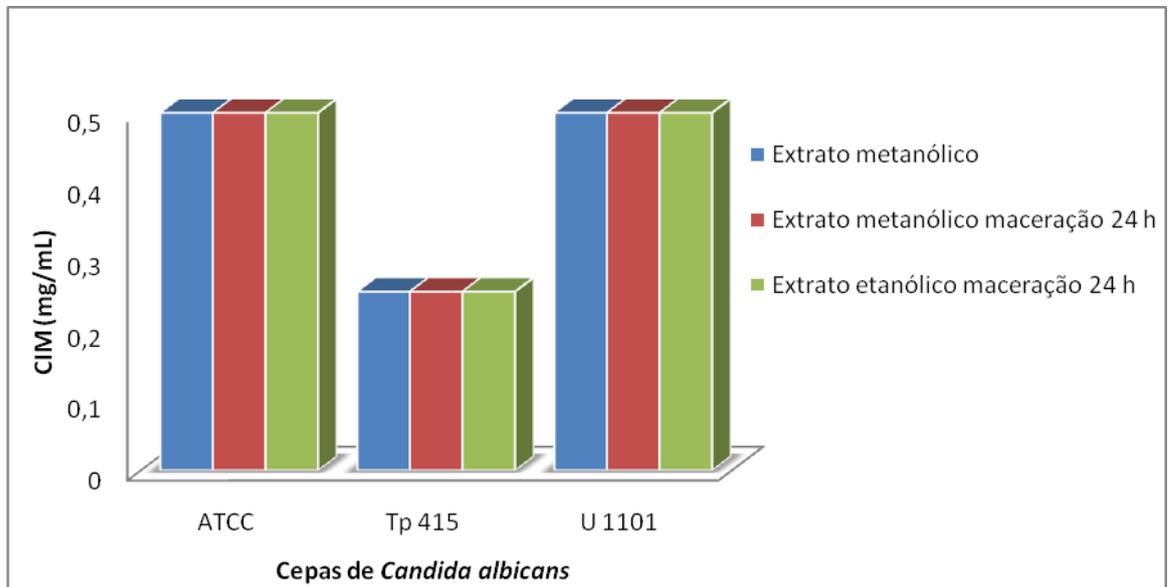


Figura 6: Concentração inibitória mínima dos extratos polares frente à *C. albicans*.

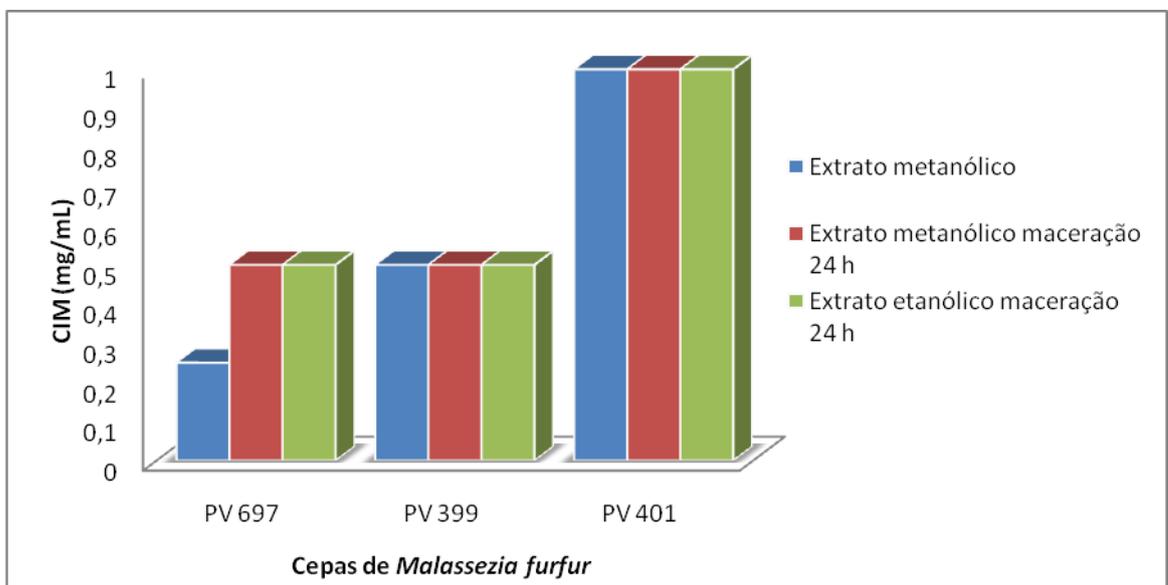


Figura 7: Concentração inibitória mínima dos extratos polares frente à *M. furfur*.

Com esses dados, foi selecionado o solvente etanol para realizar o desenho fatorial, visto que não houve diferença significativa na CIM quando comparado ao extrato metanólico, e levando em consideração que o uso de etanol é muito mais viável, tecnologicamente, pela possibilidade dos extratos obtidos serem secos por aspensão, o que não é o caso do metanol, além do custo de sua obtenção.

5.2.1 Planejamento fatorial

5.2.1.1 Resíduo seco

O resíduo seco é um ensaio onde se determina a quantidade de sólidos solúveis presentes em uma solução extrativa, sendo utilizado para avaliação do rendimento operacional num processo de secagem. Na tabela 9, encontram-se os valores de resíduo seco das soluções extrativas (g%) obtidas seguindo o planejamento fatorial 2x3.

Tabela 9: Valores de resíduo seco (g%) para as diferentes soluções extrativas obtidas através do fatorial

Método de extração	Tipo de solvente	
	Etanol:água (50:50 v/v) $\bar{x} \pm s$ (CV)	Etanol $\bar{x} \pm s$ (CV)
Ultrassom	1,15 ± 0,002 (0,20)	0,62 ± 0,002 (0,42)
Decocção	1,53 ± 0,005 (0,37)	1,17 ± 0,01 (1,43)
Maceração	1,17 ± 0,003 (0,32)	0,83 ± 0,001 (0,2)

De acordo com a tabela 9, pode-se observar que o método de decocção utilizando etanol:água (50:50 v/v), apresentou o melhor resíduo seco, sugerindo que este método de extração e tipo de solvente foi mais eficaz em extrair maior concentração de substâncias da matéria-prima vegetal.

A análise estatística dos resultados (tabela 10) demonstra que os fatores A (tipo de solvente) e B (método de extração) apresentam influência significativa sobre o resíduo seco das soluções extrativas, havendo uma interação significativa entre ele, sendo o tipo de solvente o fator mais significativo. Ou seja, dependendo da proporção de solvente a seleção do método de extração será importante para a o teor de resíduo seco presente na solução extrativa.

Tabela 10: Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos dos fatores principais e interações para o resíduo seco das soluções extrativas

Fator analisado	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
A (solvente)	0,765291	1	0,765291	13172,21	$1,28 \cdot 10^{-19}$	4,747225
B (método)	0,689334	2	0,344667	5932,418	$1,06 \cdot 10^{-18}$	3,885294
Interações	0,031466	2	0,015733	270,7972	$1,04 \cdot 10^{-10}$	3,885294

A figura 8 representa, graficamente, o efeito dos fatores sobre o resíduo seco. É possível visualizar que há influência significativa do tipo de solvente (fator A) no rendimento extrativo, onde as soluções obtidas com etanol: água (50:50 v/v) obtiveram um maior rendimento. O efeito do método (fator B) gera uma diferença significativa no resíduo seco total, sendo que as soluções obtidas através de decocção apresentaram maior resíduo comparado às preparadas através de ultrassom ou maceração.

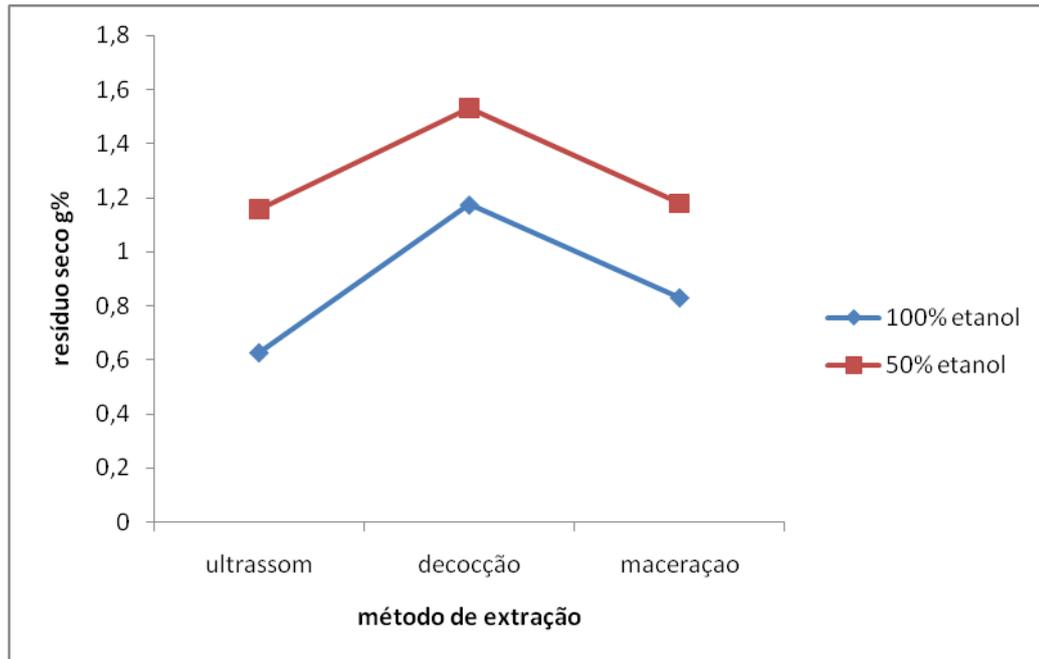


Figura 8: Representação gráfica dos efeitos dos fatores principais sobre o resíduo seco.

A representação gráfica das interações é uma maneira útil para visualizar o grau de interação entre os fatores estudados. Quando as retas são paralelas, entre si, significa que não há interação entre os fatores, o que não se verifica na figura 8, demonstrando que há interação entre os fatores estudados, ou seja, o método e o tipo de solvente conjuntamente exercem influência sobre o resíduo seco das soluções extrativas.

5.2.1.2 Taninos totais

De acordo com a metodologia utilizada, para determinar o teor de taninos totais é necessário, primeiramente, determinar a quantidade de polifenóis totais (g%), cujos resultados estão expressos na tabela 11. Os teores encontrados demonstram que além de taninos a espécie vegetal estudada possui outros componentes fenólicos, podendo estes ter influência em sua ação terapêutica.

Tabela 11: Valores de polifenóis totais (g%) para os diferentes ESAs obtidos através do fatorial

Método de extração	Tipo de solvente	
	Etanol:Água 50:50 (v/v) $\bar{x} \pm s$	Etanol $\bar{x} \pm s$
Ultrassom	6,87 ± 0,09 (1,4)	11,57 ± 0,03 (0,29)
Decocção	10,26 ± 0,12 (1,24)	8,5 ± 0,12 (1,45)
Maceração	8,77 ± 0,26 (3,0)	11,92 ± 0,51 (4,29)

O teor de taninos totais presentes no ESA, obtido a partir de diferentes ESAs, encontra-se na tabela 12, onde pode ser verificado que a maceração obtida com etanol apresentou maior teor.

Tabela 12: Valores de taninos totais (g%) para os diferentes ESAs obtidos através do planejamento fatorial

Método de extração	Tipo de solvente	
	Etanol:Água 50:50 (v/v) $\bar{x} \pm s$	Etanol $\bar{x} \pm s$
Ultrassom	3,26 ± 0,02 (0,81)	6,58 ± 0,3 (4,68)
Decocção	6,82 ± 0,03 (4,43)	4,89 ± 0,25 (5,14)
Maceração	5,12 ± 0,23 (4,51)	8,64 ± 0,5 (5,86)

A análise estatística dos resultados (tabela 13), assim como para o resíduo seco, demonstra que os fatores A e B apresentam influência significativa sobre o teor de taninos

totais dos extratos secos, sendo o tipo de solvente o fator mais significante, havendo uma interação significante entre eles (tipo de solvente e método), indicando que dependendo do tipo de solvente a seleção do método de extração será determinante para a o teor de taninos totais presente na solução extrativa.

Tabela 13: Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos dos fatores principais e interações para os taninos totais dos ESAs

Fator analisado	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
A (solvente)	38,42049	1	38,420492	409,7501	$1,21 \cdot 10^{-10}$	4,747225
B (método)	11,49596	2	5,7479805	61,30155	$5,02 \cdot 10^{-07}$	3,885294
Interações	2,224741	2	1,1123707	11,86331	0,001436	3,885294

Através da representação gráfica das interações (figura 9), observa-se que quando se trata dos métodos de ultrassom e maceração, o solvente etanol revelou melhores teores de taninos totais, e quando se trata de decocção o melhor teor de taninos foi obtido com a proporção de etanol:água 50:50 (v/v), revelando que quando há mistura dos dois solventes o calor pode ser um aliado no processo extrativo.

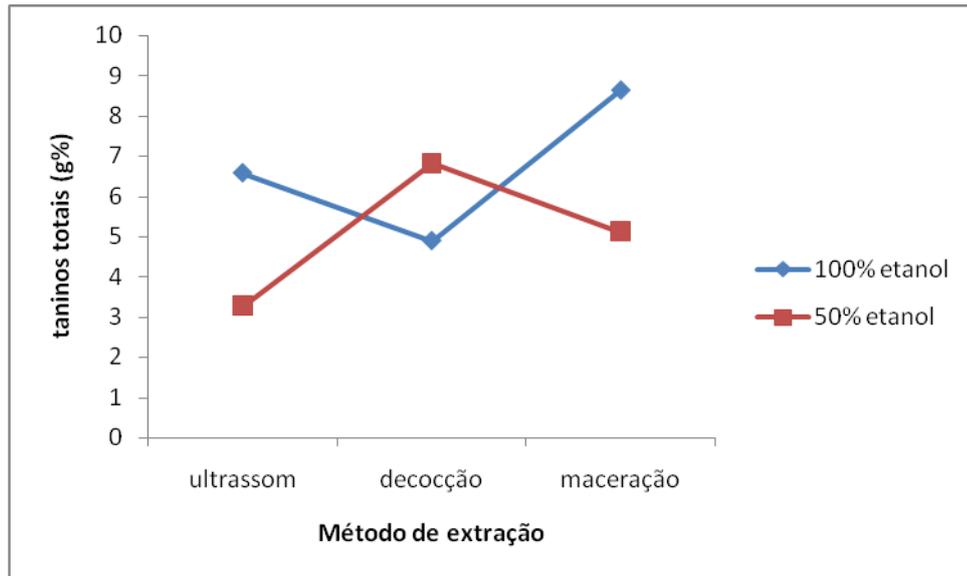


Figura 9: Representação gráfica dos efeitos dos fatores principais sobre o teor de taninos totais.

5.2.1.3 Atividade antifúngica

As soluções extrativas obtidas pelo planejamento fatorial foram secas em equipamento *spray drier* para avaliação da atividade antifúngica frente a três micro-organismos: *C. albicans*, *M. furfur* e *T. rubrum* (três isolados de cada micro-organismo) e a CIM de cada extrato seco por aspersão (ESA) é demonstrada na figura 10 para *C. albicans*, na figura 11 para *M. furfur* e figura 12 para *T. rubrum*. Na figura 10 pode-se observar que as menores CIM foram obtidas com os extratos secos oriundos de solução extrativa com etanol:água (50:50 v/v), e que a maceração, independente do tipo de solvente, mostrou-se mais eficaz contra os três isolados de *C. albicans* com uma CIM que variou de 2 a 0,5 mg/mL. O mesmo resultado foi encontrado para *M. furfur* (figura 11), onde os extratos obtidos a partir de solvente hidroalcoólico (50:50 v/v), também, mostraram-se mais eficazes frente às cepas com CIM de 4 a 2 mg/mL, sendo que em todas as cepas estudadas o método por maceração foi o que originou menor CIM. Com relação ao micro-organismo *T. rubrum*, praticamente, não houve diferença na CIM independente do método de extração e tipo de

solvente em quase todas as cepas testadas, a CIM foi de 1 mg/mL, com exceção do extrato obtido apenas com etanol pelo método de ultrassom frente à cepa ATCC (figura 12).

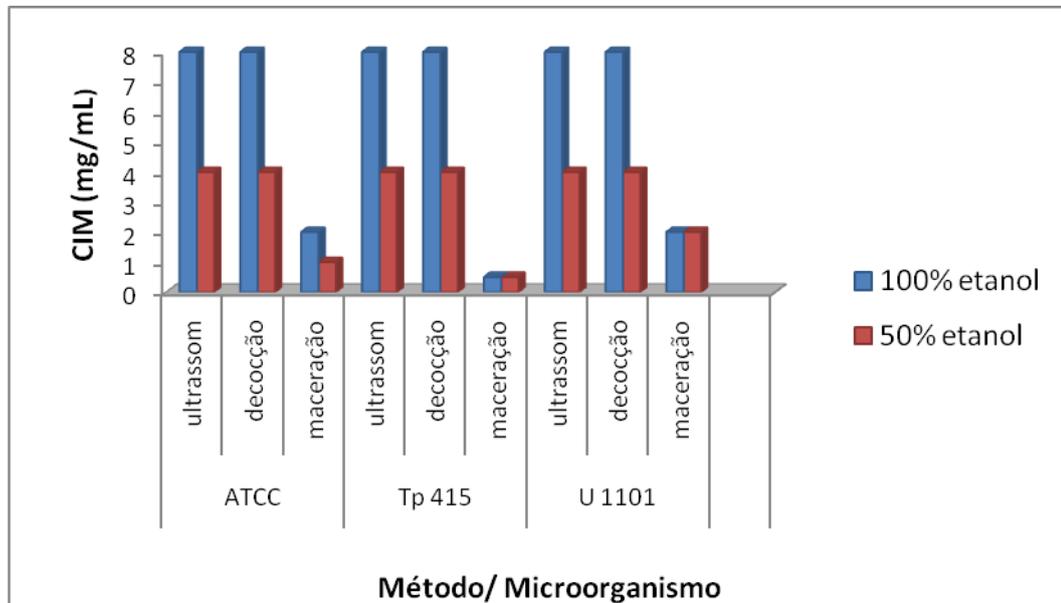


Figura 10: Representação gráfica da CIM dos ESA obtidos através do planejamento fatorial frente às cepas de *C. albicans*

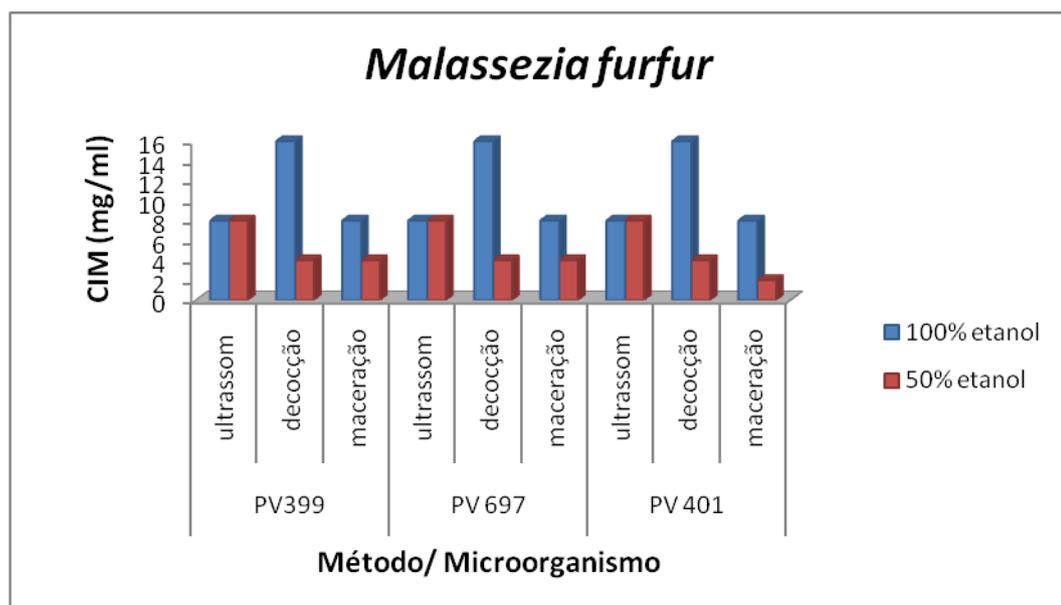


Figura 11: Representação gráfica da CIM dos ESA obtidos através do planejamento fatorial frente às cepas de *M. furfur*

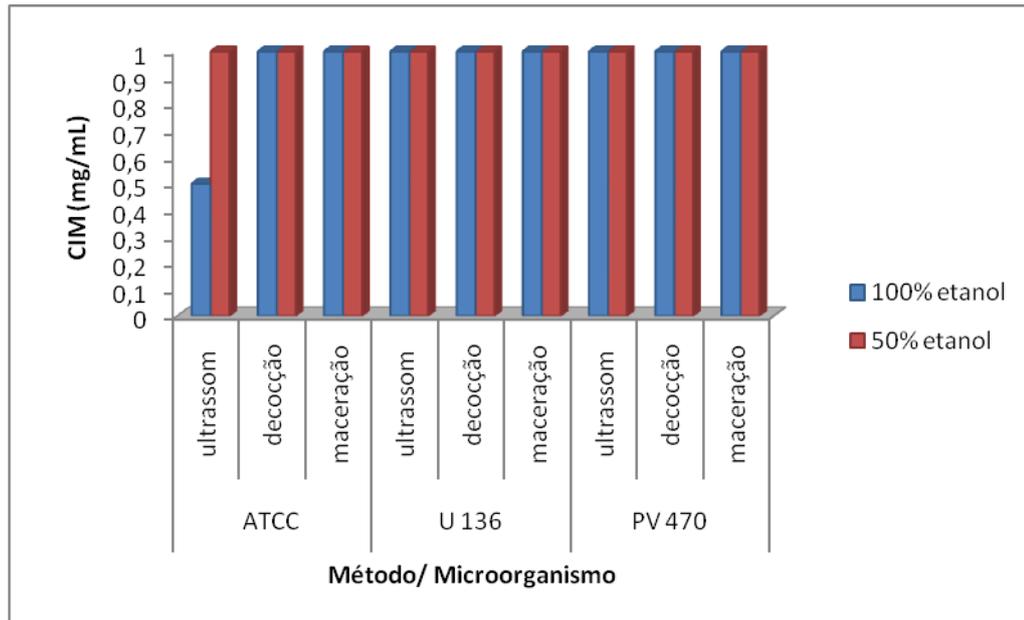


Figura 12: Representação gráfica da CIM dos ESA obtidos através do planejamento fatorial frente às cepas de *T. rubrum*

5.3 Caracterização da solução extrativa padronizada

Através dos resultados obtidos no planejamento fatorial, escolheu-se a solução que foi obtida através do método de maceração utilizando como solvente etanol:água (50:50 v/v) e relação droga:solvente de 5% (m/v), para padronização. A escolha foi baseada na atividade antifúngica, pois esta solução foi a que apresentou melhores resultados de inibição para todos os micro-organismos testados, apesar de não ser a que apresentou maior teor de resíduo seco ou teor de taninos totais, considerando que a atividade antifúngica é mais importante e pode ser atribuída a outro marcador químico que não sejam os taninos. Os resultados de caracterização encontram-se na tabela 14.

Tabela 14: Caracterização da solução extrativa padronizada

Ensaio	Resultados $\bar{x} \pm s$ (CV%)
Teor de Taninos Totais (g%)	1,36 \pm 0,03 (1,6)
Resíduo seco (g%)	1,170 \pm 0,003 (0,3)
pH	5,0 \pm 0,0
Densidade (g/mL)	0,82

O resíduo seco encontrado para essa solução foi de 1,17 g%, isso significa que 100g da solução extrativa apresenta 1,17 g de substâncias sólidas solúveis, ou seja, um baixo teor de sólidos solúveis, que pode refletir em um baixo rendimento no processo de secagem.

A densidade apresentada pela solução extrativa foi de 0,82 devido ao líquido extrator ser uma solução hidroalcoólica a 50% (v/v). O pH apresentado foi de 5,0, ou seja, um pH ácido que pode se mostrar eficaz no combate ao desenvolvimento microbiano e indicativo do teor de polifenóis presentes na solução que é de 1,36 g% em 100 g de solução. Taninos totais têm bastantes grupos hidrogeniônicos tornando as soluções extrativas com característica ácida.

5.4 Doseamento Espectrofotométrico

5.4.1 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal

A seleção do comprimento de leitura foi feita após análise do espectro de varredura do ESA com espectro de varredura da substância de referência epicatequina (figura 13), no qual pode ser observada a semelhança em ambos os espectros. Dessa forma, a epicatequina foi escolhida como substância de referência sendo o comprimento de onda de 278 nm utilizado para a realização dos ensaios de quantificação dos taninos totais.

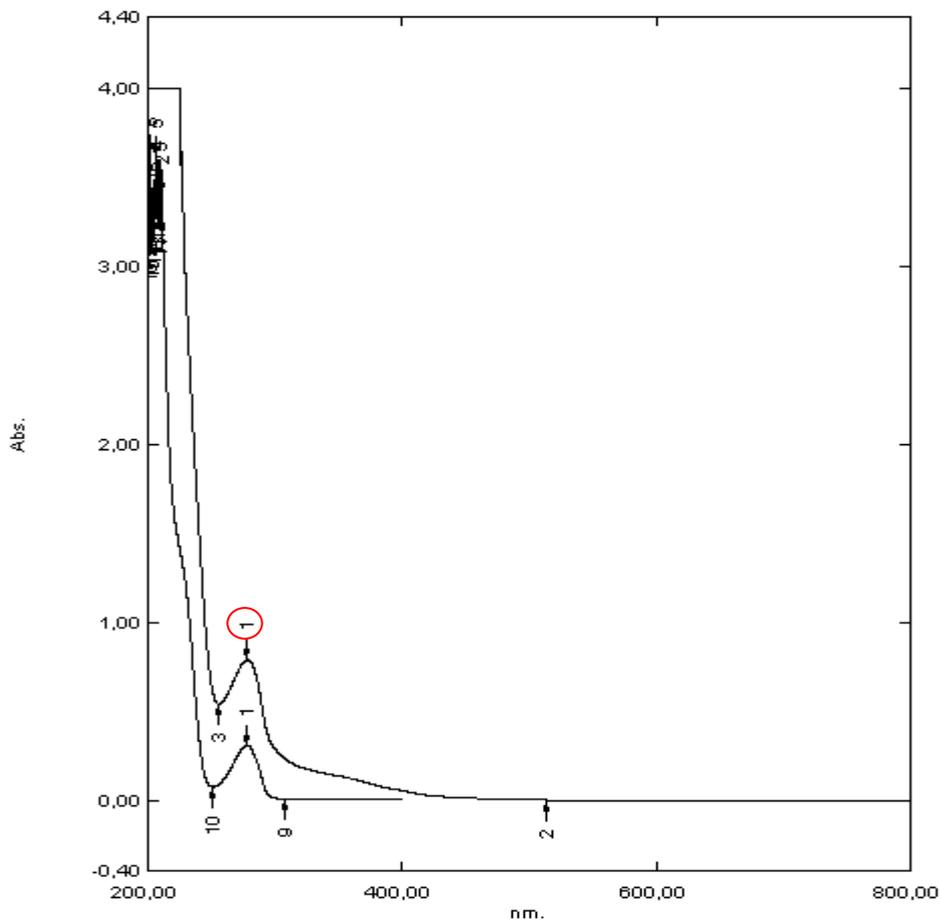


Figura 13: Espectro de varredura da solução extrativa (circulado em vermelho) e do padrão epicatequina através de leitura direta.

5.4.2 Curva de calibração do padrão epicatequina

A curva de calibração, obtida para verificar a viabilidade da utilização da epicatequina como uma substância de referência, para a quantificação dos taninos é mostrada na Figura 14. Os parâmetros de regressão estão descritos na tabela 15.

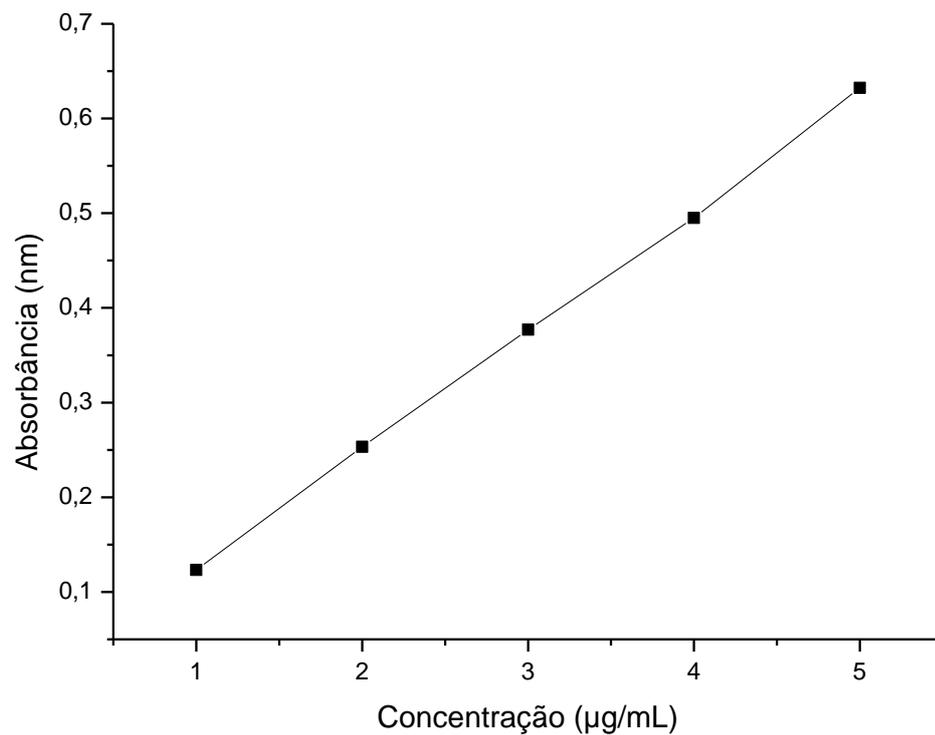


Figura 14: Curva de Calibração para epicatequina

Tabela 15: Parâmetros de regressão da curva de Calibração para epicatequina

Parâmetros da regressão	$\lambda = 278 \text{ nm}$
Interseção	-0,0017
Inclinação	0,01259
R^2	0,9994
CV%	3,16
$A_{1cm}^{1\%}$	1251,76

* CV% da inclinação da reta em três dias consecutivos

Pode ser observado um coeficiente de regressão significativo acima de 0,99, indicando regressão linear e que a faixa de trabalho selecionada está apropriada para os experimentos. A partir da curva também foi calculado o coeficiente de extinção molar $A_{1cm}^{1\%}$.

5.5 Validação da metodologia analítica

A linearidade foi determinada através da construção de curvas de calibração para o padrão epicatequina (figura 14) e para o ESA (figura 15). Pode ser observado, que curva obtida para o ESA apresenta coeficiente de regressão de 0,9998, demonstrando significância na linearidade. Na tabela 16, pode ser observado o grau de significância das curvas de calibração.

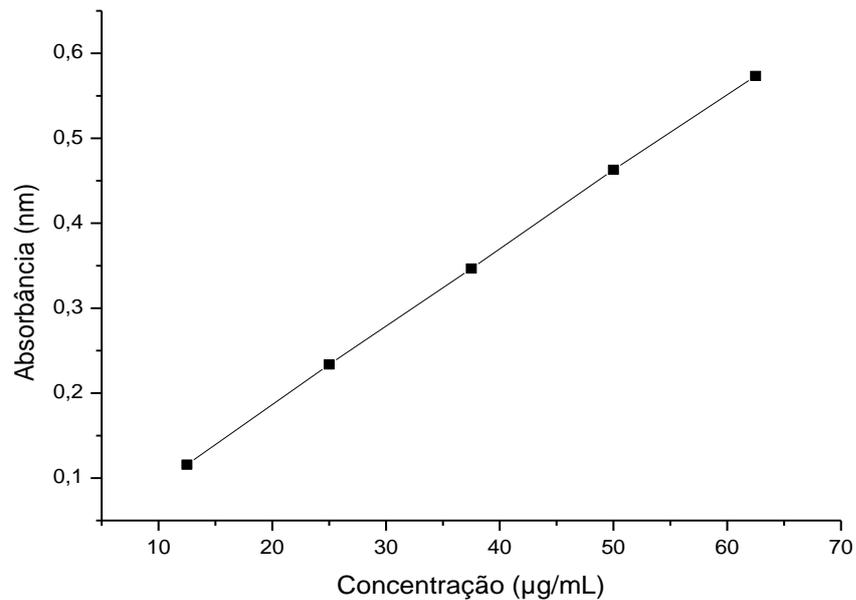


Figura 15: Curva de calibração do ESA

Tabela 16: Parâmetros de linearidade para substância de referência (epicatequina) e do ESA de *V. guianensis*

Substâncias	r^2	Equação da reta	CV %*
Epicatequina	0,9994	$y = 0,01259x - 0,0017$	3,16
ESA	0,9998	$y = 0,00797x - 0,010134$	1,03

* CV% da inclinação da reta em três dias consecutivos

A análise dos resultados dos ensaios de repetibilidade (tabela 17) e precisão intermediária (tabela 18) para a substância de referência e para o ESA, mostrou coeficientes de variação, menores que 5 % para ambos os ensaios, o que demonstra boa reprodutibilidade do método para a análise dos polifenóis presentes na solução extrativa.

Tabela 17: Repetibilidade do padrão epicatequina e ESA

Concentração	Epicatequina (UA) $\bar{x} \pm s$ (CV%)	Solução Extrativa (UA) $\bar{x} \pm s$ (CV%)
2 µg/mL	0,198 ± 0,001 (0,78)	-
50 µg/mL	-	0,553 ± 0,002 (0,38)

* CV% da absorvância em seis leituras consecutivas. UA = unidade de absorvância

Tabela 18: Precisão intermediária das substâncias de referência e do ESA de *V. guianensis*. Valores de Absorvância.

Concentrações	Epicatequina	ESA
	Precisão intermediária $\bar{x} \pm s$ (CV %)*	Precisão intermediária $\bar{x} \pm s$ (CV %)*
1 µg/mL	0,1098 ± 0,001 (1,50)	-
2 µg/mL	0,2248 ± 0,0001 (0,51)	-
3 µg/mL	0,3367 ± 0,003 (1,0)	-
25 µg/mL	-	0,2110 ± 0,004 (1,99)
37,5 µg/mL	-	0,3157 ± 0,001 (0,47)
50 µg/mL	-	0,4226 ± 0,005 (1,21)

* CV% da absorvância em três dias consecutivos

Os valores de exatidão do método estão descritos na tabela 19, constatado através do ensaio de recuperação de epicatequina após contaminação da solução extrativa. Pode ser observado que todas as concentrações estudadas demonstraram uma recuperação acima de 90% com baixo coeficiente de variação (< 2%), o que de acordo com a literatura indica que o método é exato (BRASIL, 2003).

Tabela 19: Resultados do estudo de recuperação de epicatequina pelo ESA de *V. guianensis*

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%) $\bar{x} \pm s$ (CV%)
3,78	3,71	95,88 \pm 0,11 (0,11)
7,46	7,33	95,79 \pm 0,05 (0,05)
11,64	11,36	93,61 \pm 0,60 (0,65)

5.6 Obtenção e Caracterização do Extrato Seco por Aspersão (ESA) e do Produto seco por aspersão (PSA)

A secagem por aspersão foi realizada sem e com adjuvante de secagem, para avaliar a influência deste no rendimento operacional e características tecnológicas do produto obtido. Convencionou-se chamar de Extrato Seco por Aspersão (ESA) a solução extrativa seca em *spray-dryer* sem adjuvante de secagem e de Produto Seco por Aspersão (PSA) a seca com auxílio de Aerosil como adjuvante de secagem.

Na tabela 20, verificam-se os rendimentos dos produtos secos obtidos a partir da solução extrativa padronizada de *V. guianensis*.

Tabela 20: Rendimento da operação de secagem por *spray drying*

Produtos	Rendimento operacional (%)
Extrato seco por aspersão	44,9 %
Produto seco por aspersão	52,20 %

Os resultados de rendimento obtidos demonstram que na operação de secagem o rendimento não foi satisfatório, havendo muitas perdas do produto durante o processo, podendo ser considerado que houve muita aderência dos extratos nas paredes do equipamento e o fato dos pós se apresentarem muito finos e leves, sendo carregados pelo ar de exaustão para o filtro de saída do equipamento. Observa-se, também, um rendimento maior do PSA quando comparado ao ESA, uma vez que os adjuvantes de secagem são utilizados para melhorar o rendimento operacional e as características tecnológicas dos produtos obtidos (CASADEIBAIG et al., 1989; CARVALHO, 1997). A utilização de adjuvantes tecnológicos exerce grande influência no rendimento do processo de secagem, contribuindo também, de forma positiva, na reconstituição em água do produto (SOARES, 2002).

No trabalho realizado por Ferreira (2009) verificou-se uma diferença de 7% a mais no rendimento de extrato seco de *Psidium guajava* utilizando como adjuvantes de secagem Aerosil e Eudragit, quando comparado ao mesmo extrato seco sem adição de adjuvantes. Oliveira (2009b) demonstrou através de um planejamento fatorial, onde se avaliou o rendimento das soluções extrativas de *Maytenus ilicifolia* como variável de resposta ao percentual de Aerosil adicionado à solução extrativa, que a maior proporção analisada (30%) proporcionou maior rendimento ao produto obtido. Vasconcelos (2005) avaliou a influência da concentração de Aerosil nas características dos extratos secos por aspersão de *Schinus*

terebinthifolius, demonstrando que maiores rendimentos de secagem eram obtidos com maiores concentrações do adjuvante, demonstrando também que a melhor proporção foi a de 30%.

O extrato seco por aspersão (ESA) (figura 16) apresentou-se como um pó de aspecto fino, de cor marrom médio, com tendência a formar aglomerados, possivelmente por sua maior higroscopicidade, esta que é um dos parâmetros de qualidade de um extrato seco, devendo ser o mais baixa possível para garantir a estabilidade e evitar contaminação biológica (LIST e SCHMIDT, 1989). Já o PSA obtido com Aerosil apresentou-se como um pó fino, sem aglomerações e de coloração marrom clara. A adição de Aerosil ao extrato proporcionou uma boa estabilidade física, mantendo o aspecto de pó fino e solto, além de conferir maior rendimento ao processo. Esta estabilidade pode ser atribuída a uma possível microencapsulação das partículas do pó pelo Aerosil (CORNEC, 1990).

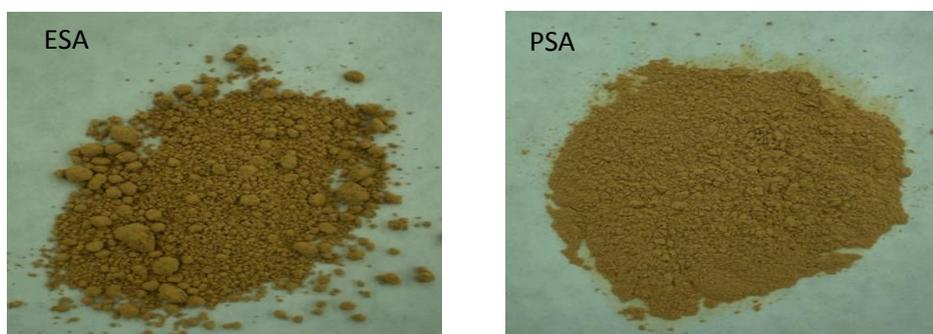


Figura 16: Extrato seco por aspersão de *Vismia guianensis* sem adjuvante (ESA) e com adjuvante (PSA)

Os ensaios de caracterização avaliam características consideradas importantes para a manutenção da garantia da qualidade e, também, da reprodutibilidade do processo de obtenção do extrato seco (DA SILVA, 2003). Assim como, propriedades importantes para o desenvolvimento subsequente de outros produtos (PETROVICK, 2006). Na tabela 21 encontram-se os resultados de teor de taninos totais dos extratos secos e pode-se observar que

o ESA apresentou um teor de taninos maior quando comparado ao PSA, o que pode refletir em uma interação do adjuvante com os taninos, que podem ter ficado retidos no filtro de papel no momento da filtração, impossibilitando sua quantificação. Estudos de espectroscopia de infravermelho avaliando a mistura de dióxido de silício coloidal com ácido gálico demonstrou que há uma interação física entres eles através da formação de pontes de hidrogênio (LONGHINI, 2006).

Tabela 21: Teor de taninos totais dos extratos secos

Ensaio	ESA	PSA
	$\bar{x} \pm s$ (CV%)	$\bar{x} \pm s$ (CV%)
Teor de Taninos (g%)	5,12 ^a ± 0,23 (4,51)	1,04 ^b ± 0,03 (3,17)

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

Na tabela 22 encontram-se os resultados de caracterização dos extratos secos. Com relação à umidade residual, verificou-se diferença estatística entre os produtos, onde o PSA apresentou menor umidade. No entanto, ambos os valores estão abaixo dos limites estabelecidos para produtos com acondicionamento não hermético (6 a 7%) (LIST e SCHMIDT, 1989), entretanto, o resultado de umidade para o ESA, está acima do valor máximo estabelecido pela Farmacopeia Brasileira V (2010) de 4%, fato este que pode ser justificado pela grande variação no conteúdo de umidade residual dos produtos obtidos pela técnica de *spray drying* devido às condições ambientais de umidade e temperatura quando os produtos são retirados do equipamento, e também, pode estar ligada à presença de constituintes multihidroxilados e outros grupos polares presentes nos extratos secos (PETROVICK, 2006).

Tabela 22: Características do extrato seco (ESA) e do produto seco (PSA) por aspersão de *Vismia guianensis*

Ensaio	ESA	PSA
	$\bar{x} \pm s$ (CV%)	$\bar{x} \pm s$ (CV%)
Umidade Residual (%)	4,23 ^a ± 0,15 (3,60)	3,23 ^b ± 0,11 (11,70)
Diâmetro médio de partícula	2,2754 µm	-
Densidade bruta (g/mL)	0,16 ^a ± 0,0004 (0,24)	0,23 ^b ± 0,0005 (0,24)
Densidade de compactação (g/mL)	0,21 ^a ± 0,005 (2,45)	0,33 ^b ± 0,0008 (0,24)
Fator de Hausner	1,35 ± 0,02 (2,20)	1,41 ± 0,0002 (0,01)
Índice de Carr (%)	26,26 ± 1,61 (6,15)	29,40 ± 0,01 (0,03)
Índice de densificação (mL)	162,13 ± 1,60 (6,15)	67,3 ± 1,39 (9,09)

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

No estudo tecnológico, fatores como índice de Carr (IC) e o fator de Hausner (FH) estão relacionados com a capacidade de empacotamento do pó, onde valores abaixo 20% e 1,2, respectivamente, indicam propriedades reológicas mais estáveis (FERREIRA, 2009). Como pode ser visualizado na tabela 22. Os produtos obtidos apresentaram deficientes propriedades de fluxo, com baixa densidade e alta instabilidade de empacotamento. Entretanto, apresentaram um fator de Hausner abaixo de 1,5, valor considerado razoável.

O índice de Carr (IC), o fator de Hausner e o índice de densificação são utilizados para avaliar características de compressibilidade de materiais particulados, fornecendo informações sobre a capacidade de empacotamento (CARR, 1965; WELLS, 1988).

O fator de Hausner informa que quanto mais próximo de 1, melhor o sistema de empacotamento (THOMAS e POURCELOT, 1991). Indicando que quanto menor o índice de

Carr, menor é a quantidade de adjuvante necessária para o processamento tecnológico (PELOZO, 2005).

O índice de Carr ou de compressibilidade é utilizado para medir o fluxo e o empacotamento dos pós indiretamente, valores de até 15% originam um escoamento adequado (MARSHALL, 2001). No que se refere ao índice de Carr para os extratos analisados, verifica-se que ambos apresentaram valores bem acima de 15%, indicando que os pós não possuem uma boa capacidade de escoamento. Os resultados obtidos demonstram que tanto o IC quanto o fator de Hausner apresentaram melhores valores para o ESA, contradizendo a literatura, pois os adjuvantes deveriam proporcionar melhores resultados, favorecendo o escoamento e fluidez dos extratos (LIST e SCHMIDT, 1989). Fato semelhante também foi encontrado por Costa (2012) onde o extrato seco por aspersão da *Libidibia ferrea* apresentou melhores resultados de empacotamento, ou seja, menores valores de IC e de FH que os extratos secos obtidos com diferentes adjuvantes de secagem.

O índice de densificação (ID) fornece informações sobre o comportamento do pó quando ele é submetido à movimentação, indicando a capacidade de rearranjo das partículas, valores superiores a 20 mL representam uma dificuldade de empacotamento (GUYOT et al, 1995). Pode-se verificar que ambos os extratos secos apresentaram índice de densificação muito superior ao limite estabelecido, refletindo em uma péssima capacidade de empacotamento das partículas do pó.

Os histogramas de distribuição das partículas do ESA e do PSA podem ser observados na figura 17. Verifica-se que a maioria das partículas do ESA (acima de 40%) e do PSA (acima de 50%) encontram-se na faixa de 0 a 3,5 μm sendo classificados como pó finíssimo de acordo com a Farmacopeia Brasileira V (2010). O tamanho das partículas pode estar relacionado ao baixo teor de sólidos em suspensão no fluxo de alimentação, onde a

quantidade de sólidos disperso na gotícula é pequena comparada à quantidade de água, gerando a formação de agregados finíssimos (MASTERS, 2009).

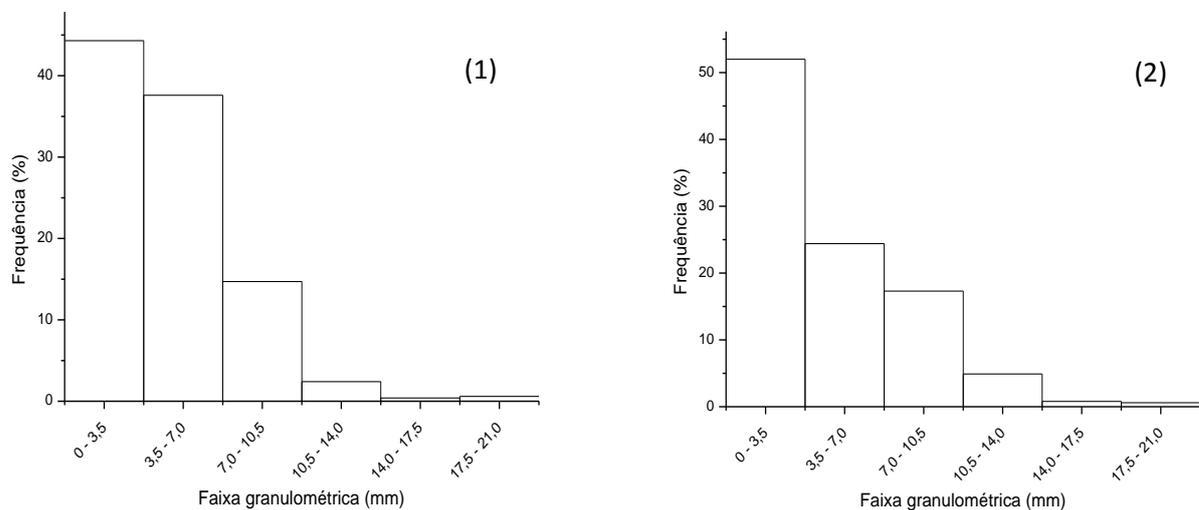


Figura 17: Histograma de distribuição das partículas do ESA (1) e do PSA (2).

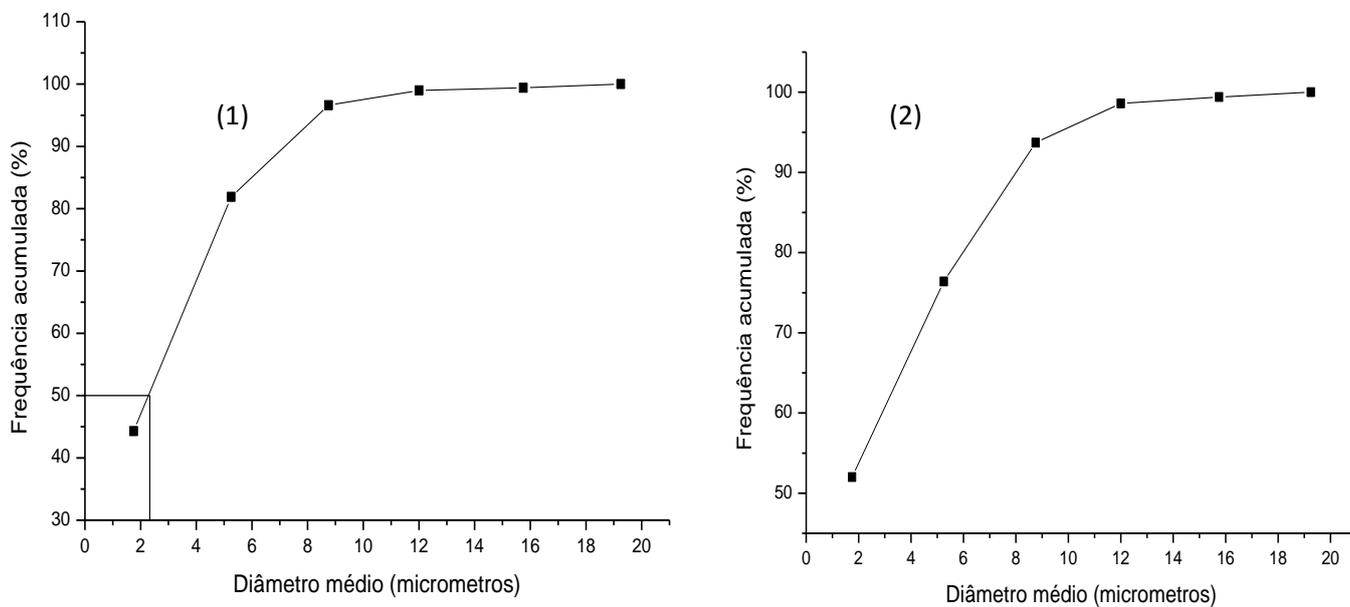


Figura 18: Representação gráfica da distribuição da distribuição granulométrica do ESA (1) e do PSA (2) de *V. guianensis*, em função da frequência acumulada percentual

A curva de distribuição granulométrica (figura 18) representa o tamanho de partícula em escala logarítmica em função da frequência acumulada percentual, em escala linear, podendo ser extrapolado o diâmetro médio das partículas (WELLS, 1988; LANTZ, 1989). Observa-se que a curva granulométrica obtida para o PSA não permitiu determinar o tamanho médio das partículas, pois a maioria delas encontra-se numa frequência superior a 50%. Para o ESA o tamanho médio das partículas foi de 2,27 μm .

A análise morfológica foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura. O resultado obtido (figuras 19, 20 e 21) demonstrou que o PSA e o ESA apresentam partículas de dimensões polidispersas com superfície rugosa, porosas e com furo central, de formato esférico e enrugado, o que é comum quando se utiliza álcool como solvente de extração (MATA et al., 2005). Partículas com aspecto semelhante também foram encontradas por Barakat (2011) e por Costa (2012) ao obterem extrato seco por aspersão de *Libidibia ferrea*.

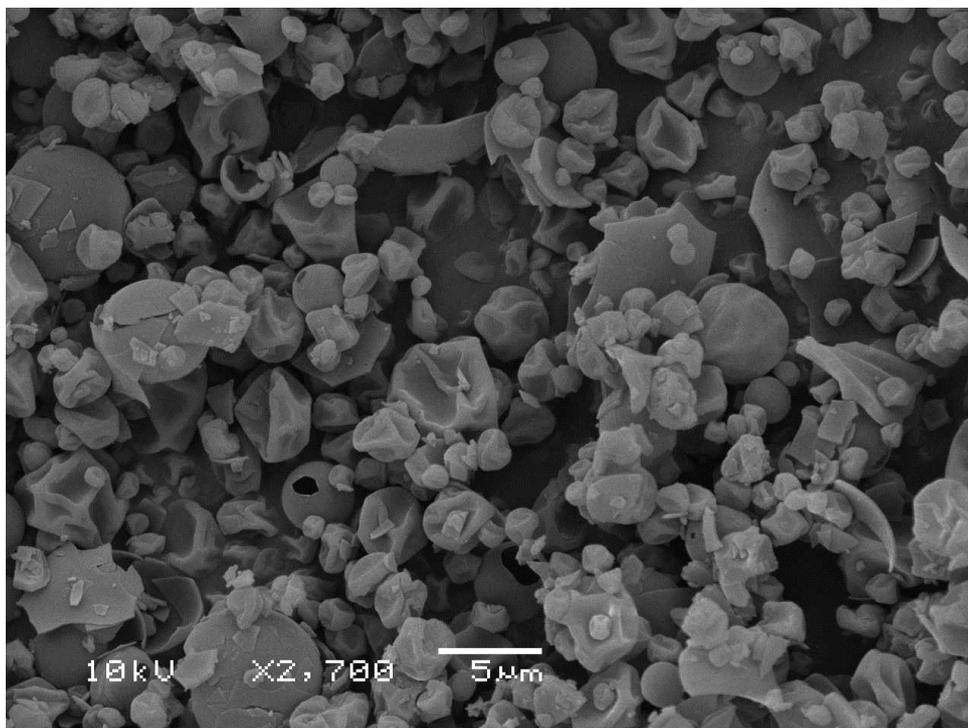


Figura 19: Fotomicrografia do ESA mostrando as características das partículas (enrugadas e com furo central) (x 2700).

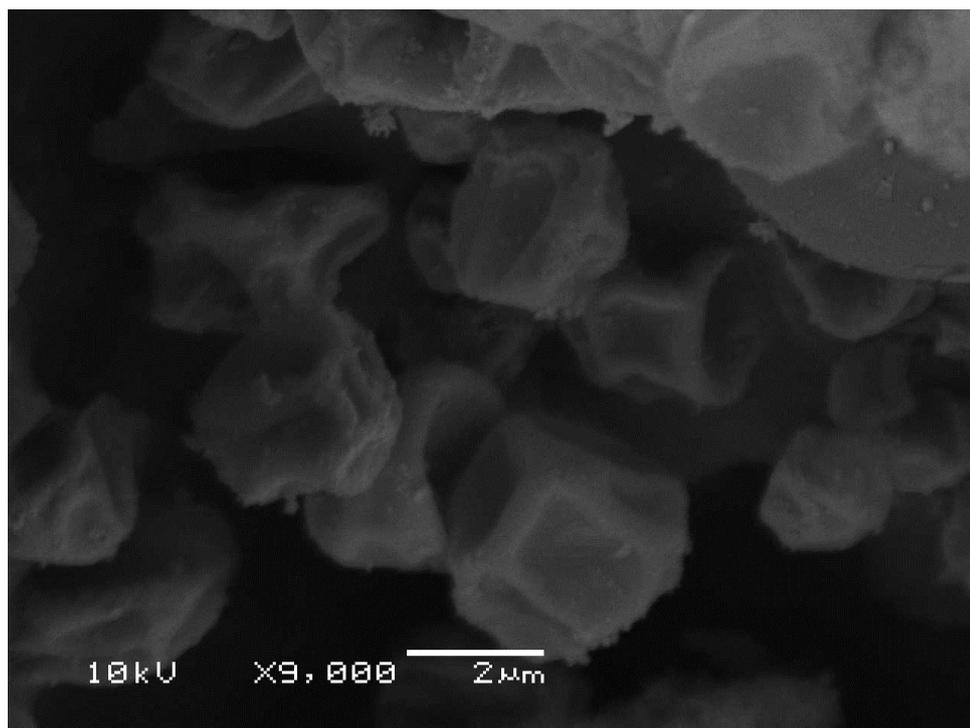


Figura 20: Fotomicrografia do ESA (x 9000) mostrando as características enrugadas das partículas.

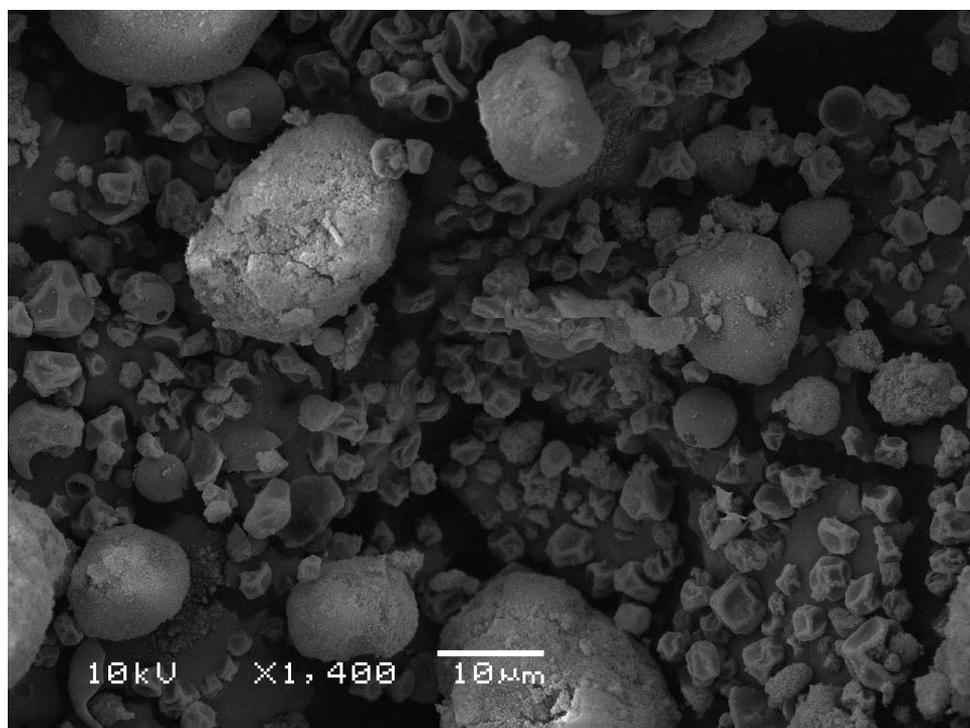


Figura 21: Fotomicrografia do PSA mostrando as partículas do adjuvante (x 1400).

A cromatografia em camada delgada realizada com o ESA (figura 22) demonstra que este, apresentou uma mancha no perfil cromatográfico semelhante ao da quercetrina (um dos padrões utilizados na placa), o que pode ser verificado pela semelhança no Rf de ambos. Verifica-se, também, que o rastro de cor marrom encontrado na eluição do extrato seco, geralmente, é característico de taninos. Ao realizar uma hidrólise ácida com ácido clorídrico a 10%, foi obtido como resultado um precipitado marrom tijolo que é indicativo de taninos condensados.

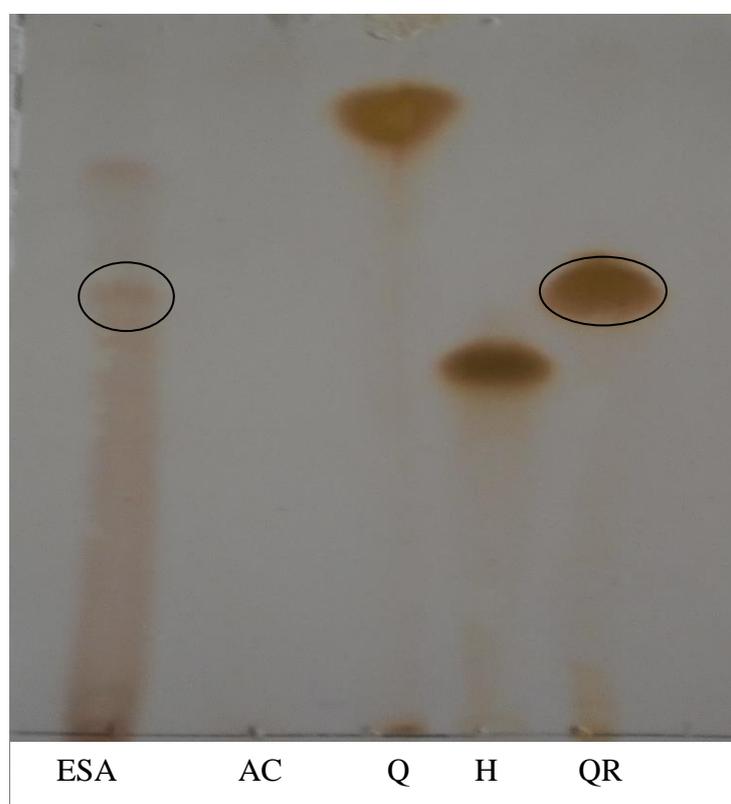


Figura 22: Perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (ESA - extrato seco por aspersão); (AC-ácido clorogênico); (Q-quercetina); (H-hiperosídeo) e (QR-quercetrina).

O perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do ESA pode ser visualizado na figura 23, onde são observados três picos principais. O espectro de varredura do pico 1, por detector UV, majoritário, é encontrado na figura 24.

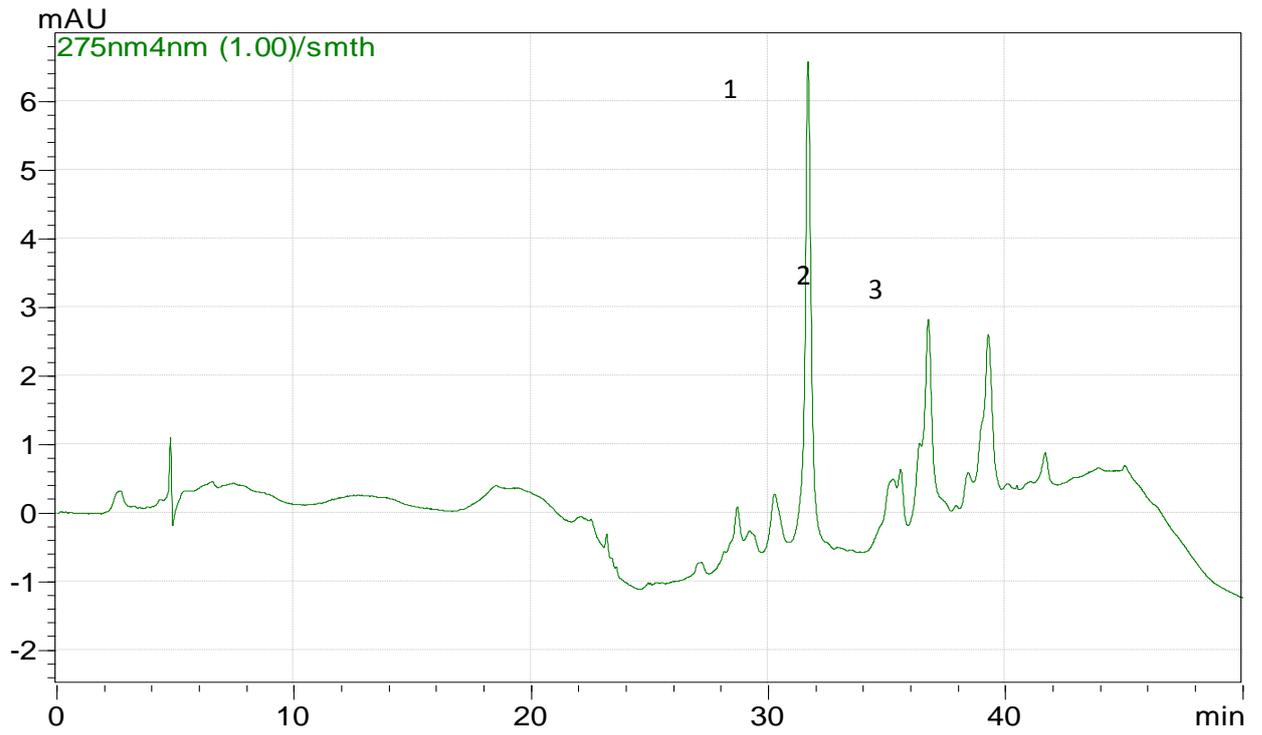


Figura 23: Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *V. guianensis*

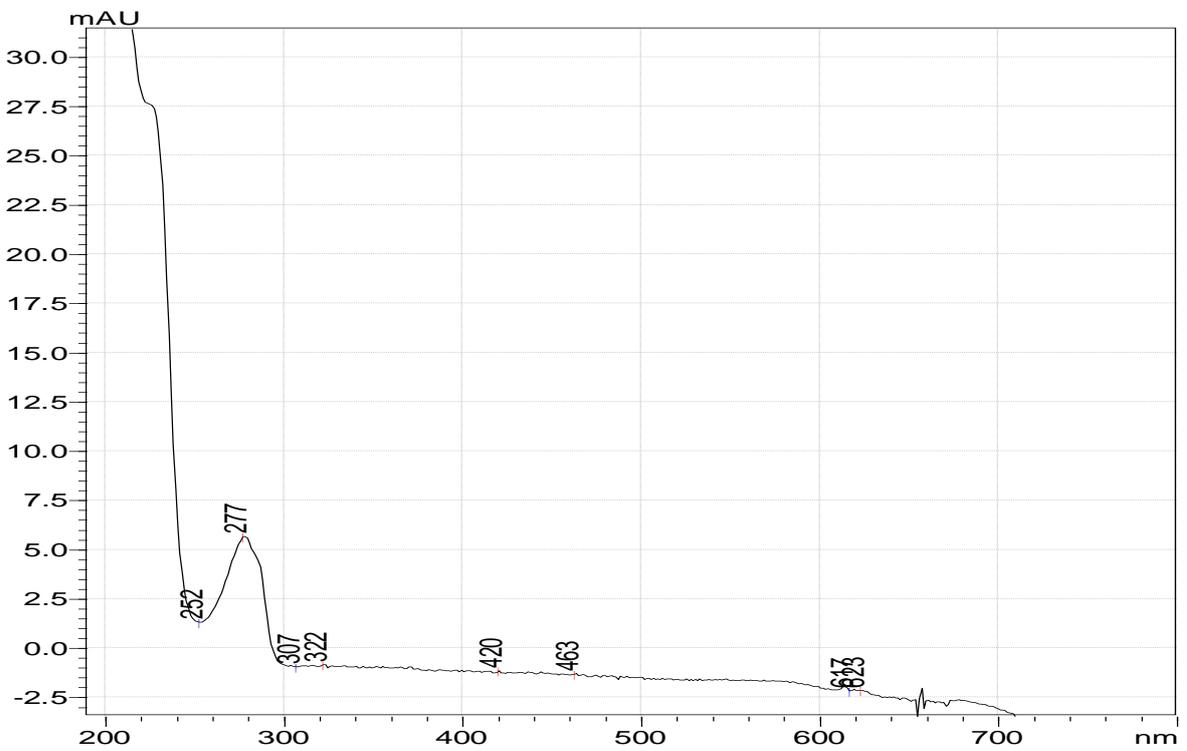


Figura 24: Espectro de varredura do pico 1 do ESA

A análise por CLAE foi realizada somente de forma qualitativa, pois através de várias corridas cromatográficas, foi verificado que a substância relacionada ao pico 1 ficava fortemente retida na coluna, sendo difícil sua retirada, mesmo utilizando diversos solventes, o que impossibilitou o desenvolvimento e validação de um método para quantificação das substâncias majoritárias presentes no extrato.

Na exposição a ambientes com atmosfera de umidade relativa controlada de 65% , no ensaio de avaliação da higroscopicidade (figura 25), o ESA apresentou um aumento de peso de mais que 10% e o PSA de mais de 6% nas primeiras 24 horas, variando pouco nos demais dias, e mantendo-se com esse índice de aumento até o fim do experimento. Como era de se esperar, o ESA apresenta uma maior higroscopicidade quando comparado ao PSA (com adjuvante).

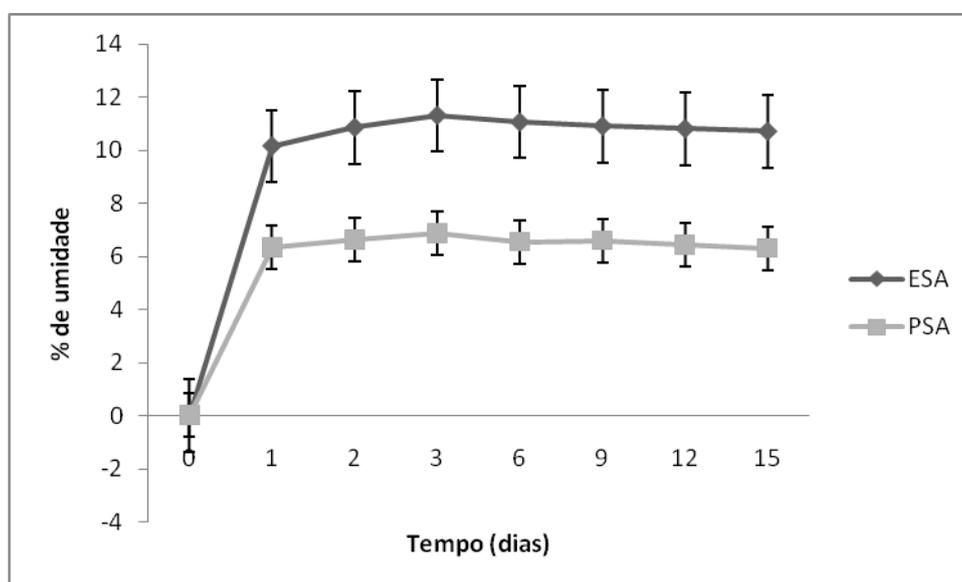


Figura 25: Isoterma de sorção de umidade do ESA e do PSA

Com relação às características sensoriais após exposição a ambiente com umidade relativa controlada de 65% (figura 26), o ESA apresentou alteração na sua coloração, observando escurecimento do extrato seco, podendo relacionar-se à formação de agregados

moleculares, devido ao aumento da proporção de água (SMITH et al., 2000). O PSA sofreu poucas alterações com relação às características sensoriais, caracterizada por um leve escurecimento e formação de leves aglomerados (figura 27).



Figura 26: Aspecto macroscópico do ESA antes da exposição a 65% de umidade relativa (A), e após 15 dias de exposição (B).



Figura 27: Aspecto macroscópico do PSA antes da exposição a 65% de umidade relativa (A), e após 15 dias de exposição (B).

Com relação ao doseamento de taninos com os extratos que passaram pelo ensaio de higroscopicidade (tabela 23), quando comparados com os extratos que não passaram pelo ensaio de higroscopicidade, é observado que para o ESA houve uma diminuição no teor de taninos totais, demonstrando que pode haver hidrólise destes constituintes pela presença de umidade absorvida pelo extrato durante o ensaio. Para o PSA, não houve diferença significativa, demonstrando que o adjuvante utilizado, por permitir uma menor absorção de umidade, pode proteger os constituintes químicos presentes no extrato seco da hidrólise.

Tabela 23: Teor de Taninos totais dos Extratos após exposição a ambiente com umidade relativa controlada de 65%

Ensaio	ESA	PSA
	$\bar{x} \pm s$ (CV%)	$\bar{x} \pm s$ (CV%)
Teor de taninos	4,16 ^a ± 0,29 (6,97)	1,07 ^b ± 0,1 (9,35)

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

5.6.1 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos secos por aspersão

O teste de microdiluição, também, foi realizado com os extratos secos para verificar se a adição do adjuvante Aerosil influencia na atividade antifúngica do extrato padronizado. Os resultados encontram-se na tabela 24, onde pode ser verificado que para o ESA a CIM variou de 1 a 2 mg/mL para as linhagens de *C. albicans* testadas, já para o extrato com adjuvante variou de 1 a 4 mg/mL. Para o micro-organismo *M. furfur*, o ESA apresentou CIM variando de 2 a 4 mg/mL e o PSA de 4 a 8 mg/mL. Para *T. rubrum* a CIM tanto do ESA quanto do PSA foi de 1mg/mL. Evidenciamos, portanto, que o PSA na maioria dos casos revelou uma concentração inibitória mínima superior quando comparado ao ESA, isso se deve ao fato de que a porcentagem em massa de extrato seco encontrado no PSA é reduzida devido ao percentual de 30 % de adjuvante encontrado no produto, o que teoricamente pode refletir em uma mesma atividade biológica para ambos os extratos, pois é evidenciado que o PSA foi eficaz até uma concentração inferior ao ESA. A CIM do cetoconazol apresentou variações entre as linhagens, demonstrando que algumas linhagens apresentam-se mais resistentes a este fármaco. O resultado do teste de microdiluição utilizando Alamar Blue também pode ser evidenciado nas figuras 25, 26 e 27 para as linhagens de *C. albicans* e nas figuras 28, 29, 30

para as linhagens de *M. furfur*. O teste para o *T. rubrum* foi evidenciado apenas pela visualização de turvação do meio de cultura.

Alguns resultados encontrados neste trabalho diferem de outros estudos já realizados anteriormente por Oliveira (2009), onde os extratos hidroalcoólicos liofilizados de *V. guianensis* não apresentaram nenhum efeito de inibição frente à *C. albicans*. A não semelhança dos resultados pode ser atribuída a diferentes padrões de resistência das cepas utilizadas nos trabalhos, bem como as condições edafoclimáticas da espécie vegetal, as quais podem variar sua composição química de acordo com as condições de plantio, coleta e época do ano (VALENTINI et al., 2010). Entretanto, a concentração inibitória mínima frente ao micro-organismo *T. rubrum* (cepas ATCC e clínicas) mostrou-se semelhante à encontrada neste trabalho (1mg/mL). Camelo (2010) avaliou a atividade antimicrobiana *V. guianensis* pelo método de difusão em disco em meio sólido, identificando a sensibilidade de *S. aureus* (ATCC 25923) ao extrato seco da tintura dissolvido em DMSO, nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL.

Considerando que as plantas são ricas em substâncias químicas, a atividade antimicrobiana demonstrada por *V. guianensis* pode ser devido à presença de constituintes polifenólicos como taninos, levando em conta que esses componentes já apresentam atividade antimicrobiana comprovada (SILVA et al., 2007). Outros estudos avaliando o potencial antimicrobiano revelam como promissoras, plantas que apresentaram CIM de 3,1 mg/mL (SILVA et al., 2007); 100, 120 e 180 mg/mL (MICHELIN et al., 2005); 100 mg/mL (ARAÚJO, 2010); 11,9 e 5,95 mg/mL (FIGUEIREDO et al., 2009), portanto *V. guianensis* com concentração inibitória mínima variando entre 0,5 a 4 mg/mL (ESA) também apresenta-se como espécie promissora com atividade antifúngica.

Tabela 24: Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos secos e do cetoconazol frente aos micro-organismos testados

Micro-organismo	Cetoconazol	ESA	PSA
<i>Candida albicans</i> ATCC 36232	1 µg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
<i>Candida albicans</i> Tp 415	4 µg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL
<i>Candida albicans</i> U 1101	4 µg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
<i>Malassezia furfur</i> 399	2 µg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
<i>Malassezia furfur</i> 401	16 µg/mL	4 mg/mL	8 mg/mL
<i>Malassezia furfur</i> 697	0,5 µg/mL	4 mg/mL	8 mg/mL
<i>Trichophyton rubrum</i> 136	0,25 µg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
<i>Trichophyton rubrum</i> 470	0,25 µg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28189	0,25 µg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL

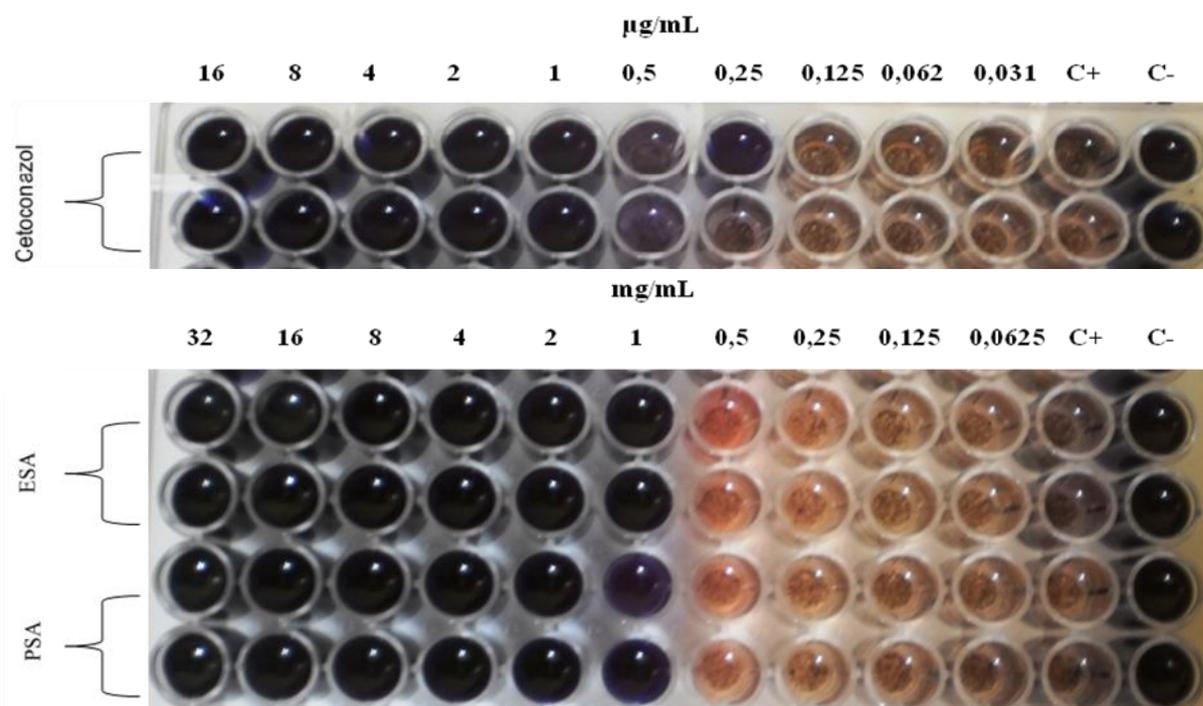


Figura 28: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* ATCC 36232.

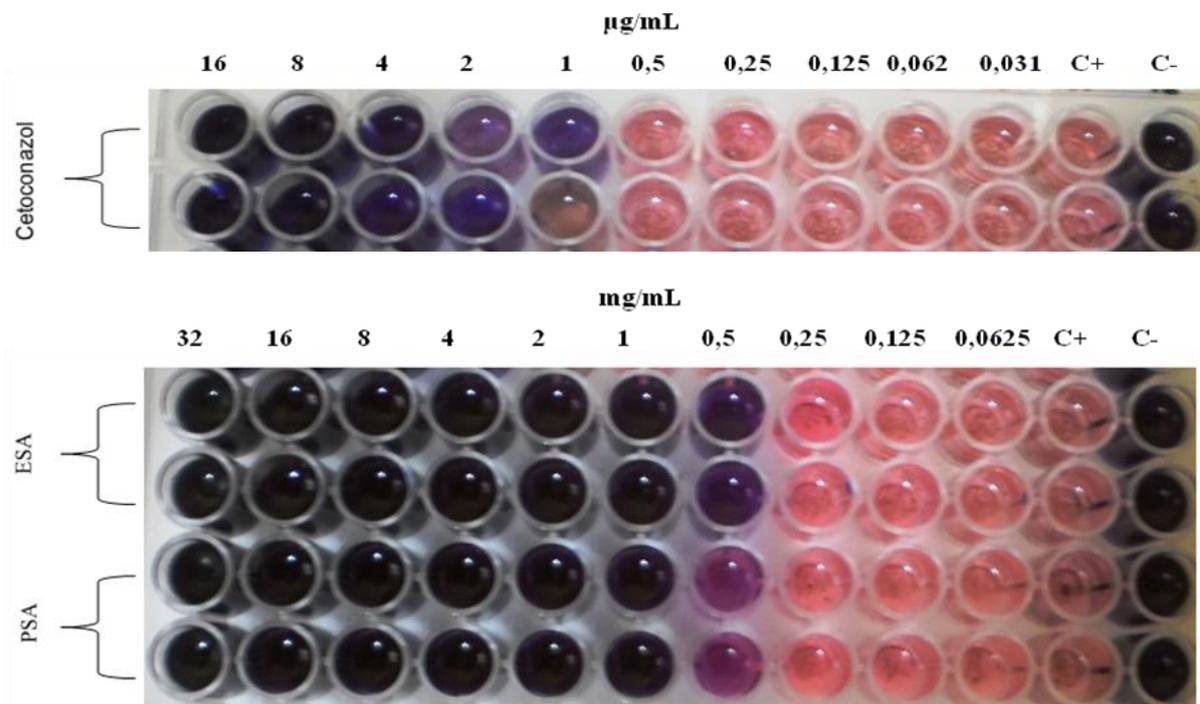


Figura 29: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* Tp 415.

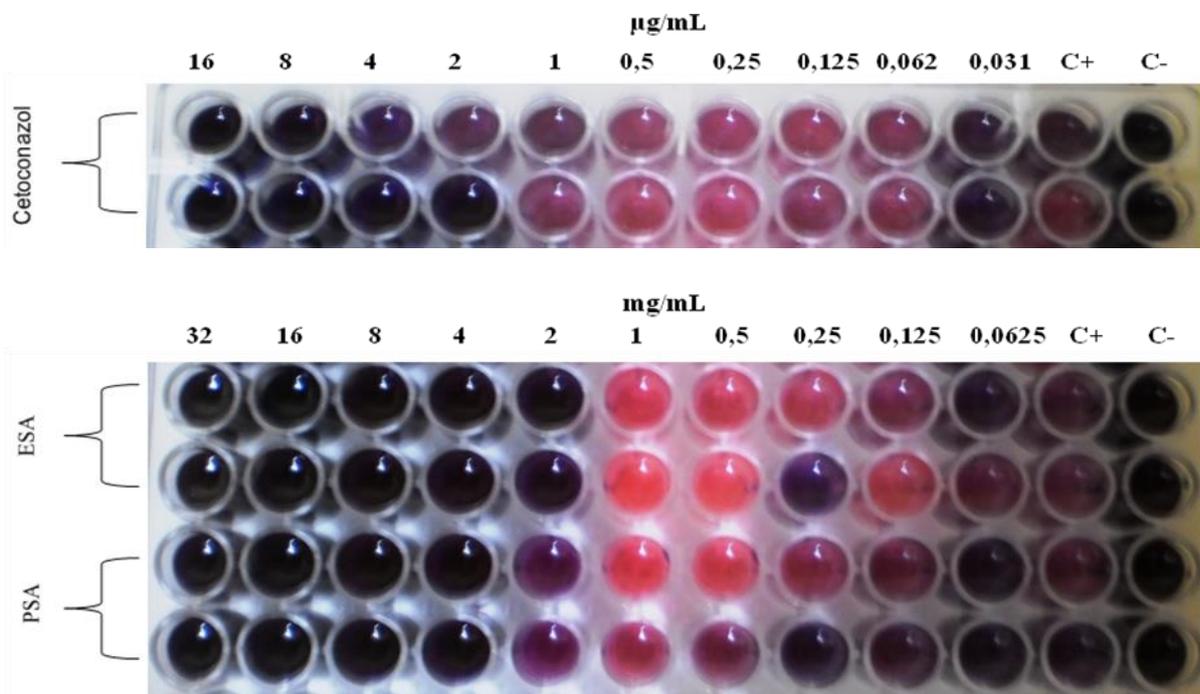


Figura 30: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* U1101.

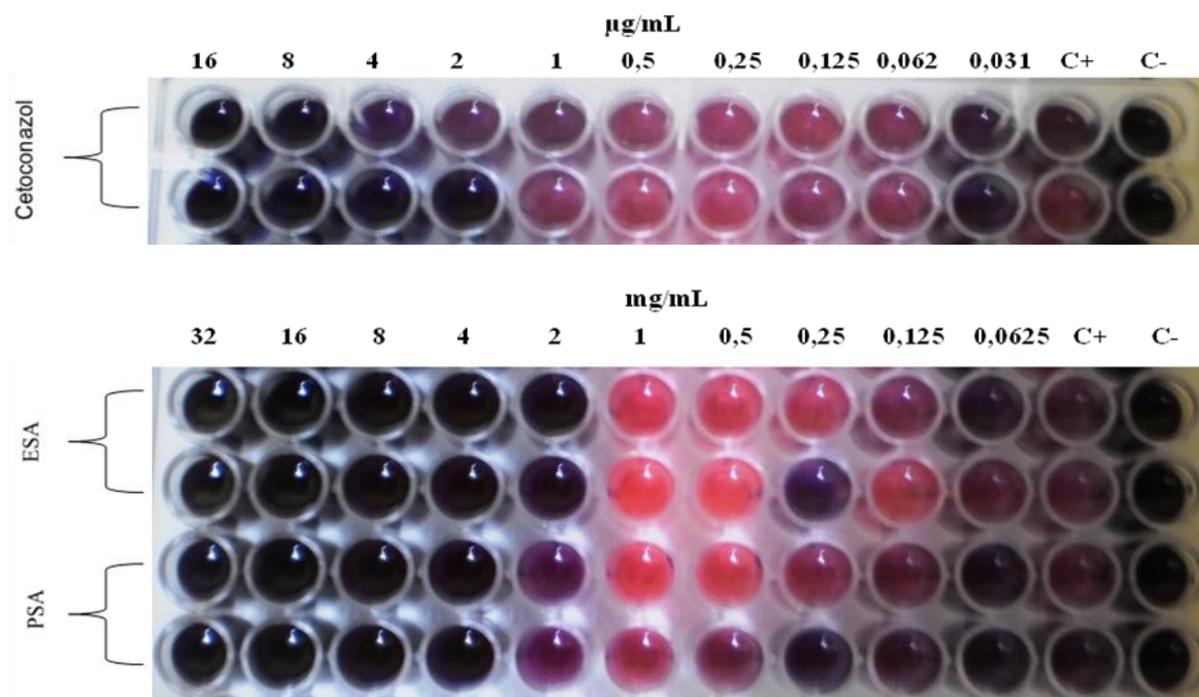


Figura 31: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *M. furfur* 399.

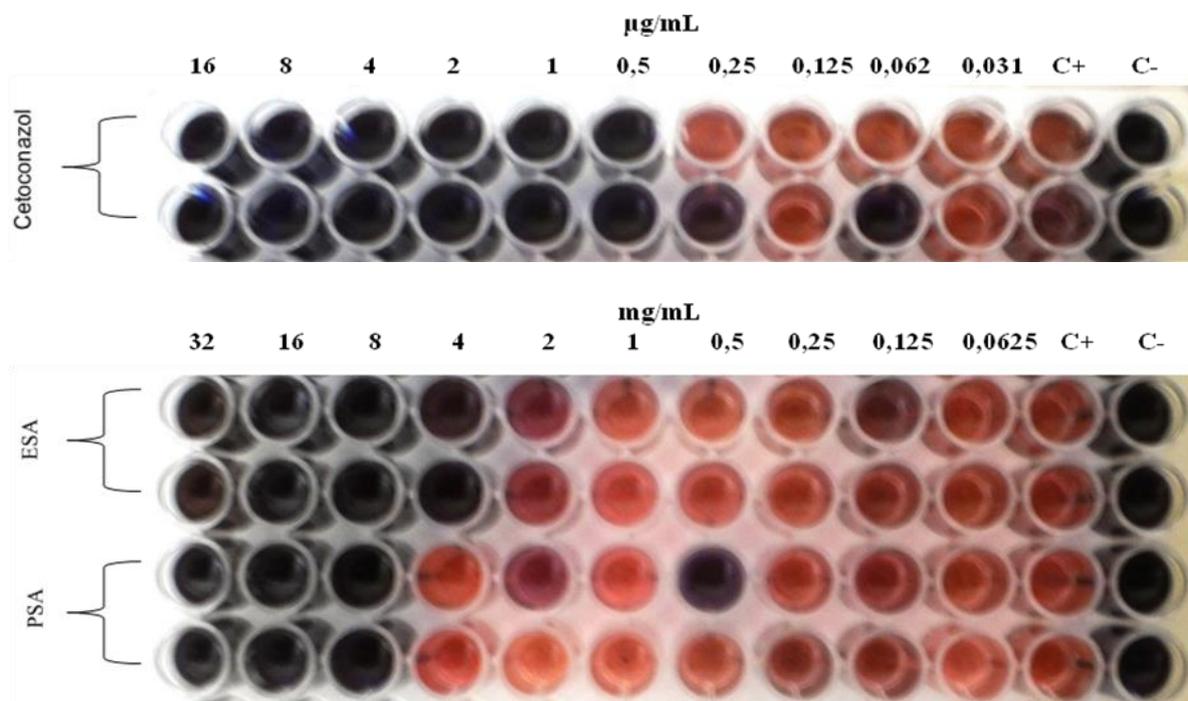


Figura 32: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *M. furfur* 697.

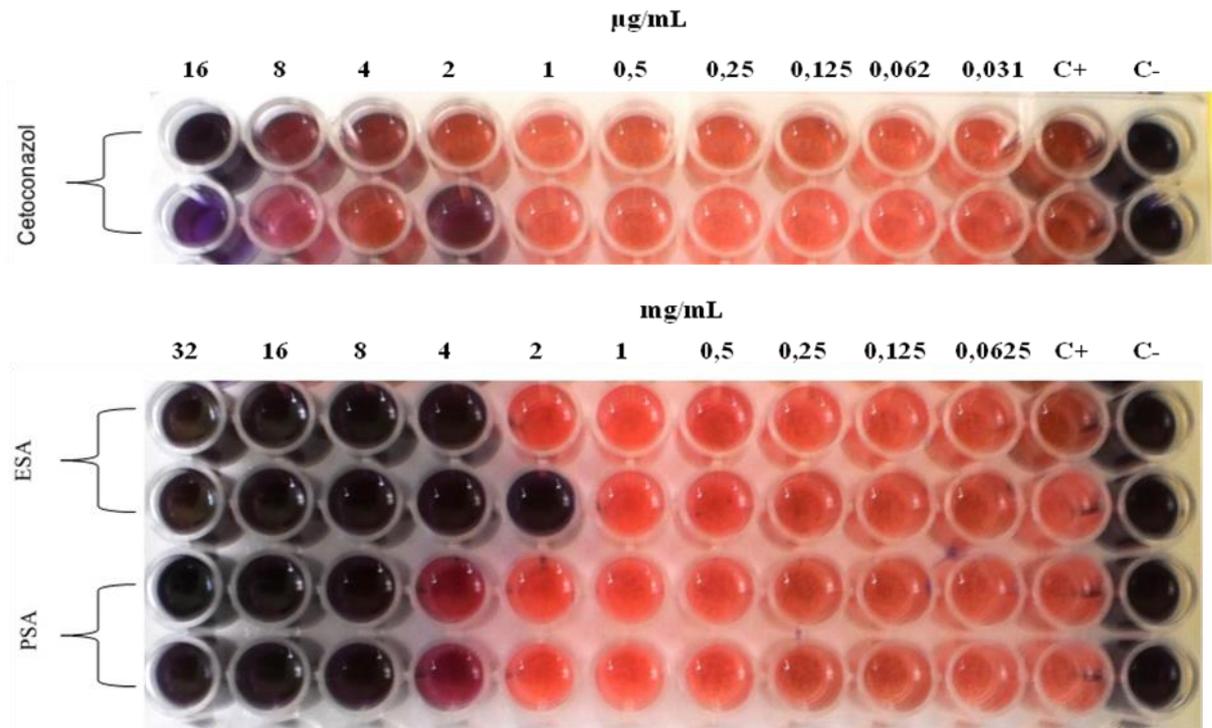


Figura 33: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *M. furfur* 401.

Durante os ensaios de microdiluição, através da observação das placas após 11 dias da realização do ensaio, foi verificado que os extratos secos continuavam a inibir o crescimento de todas as linhagens de *C. albicans* testadas, mesmo após o cetoconazol ter perdido completamente a sua ação na maioria dos casos (ATCC e Tp 415) (figuras 31 e 32) ou ter sua CIM aumentada de 4 para 8 µg/mL no caso da *C. albicans* U 1101 (figura 33).

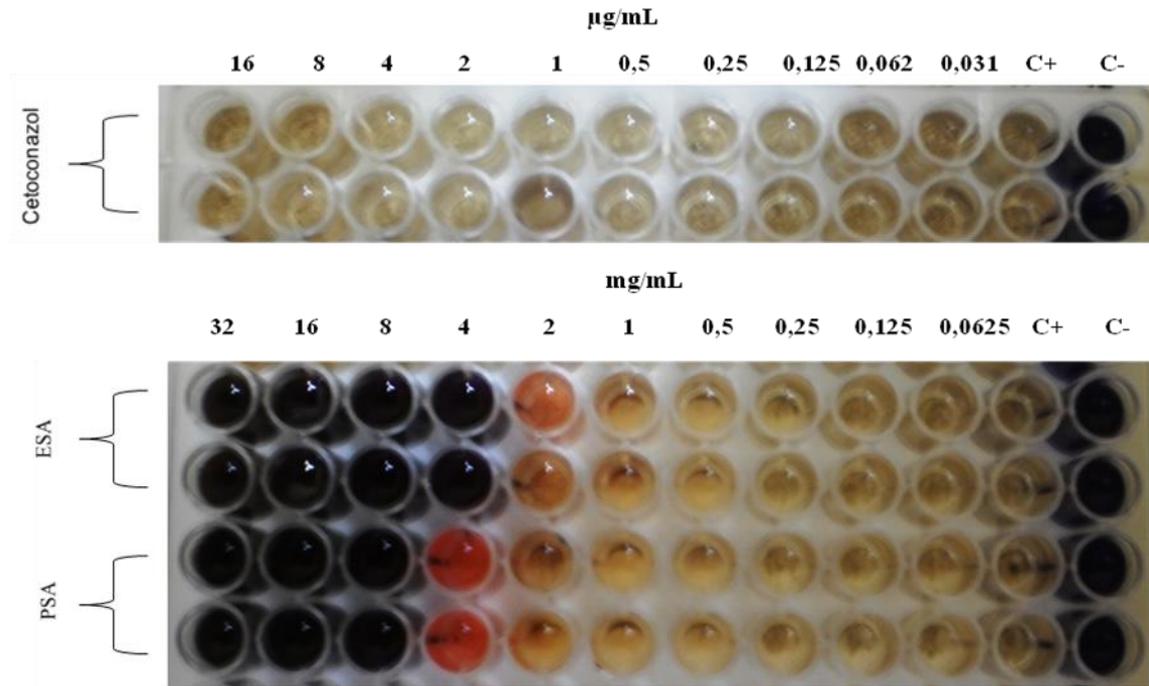


Figura 34: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* ATCC 36232 após 11 dias de sua realização.

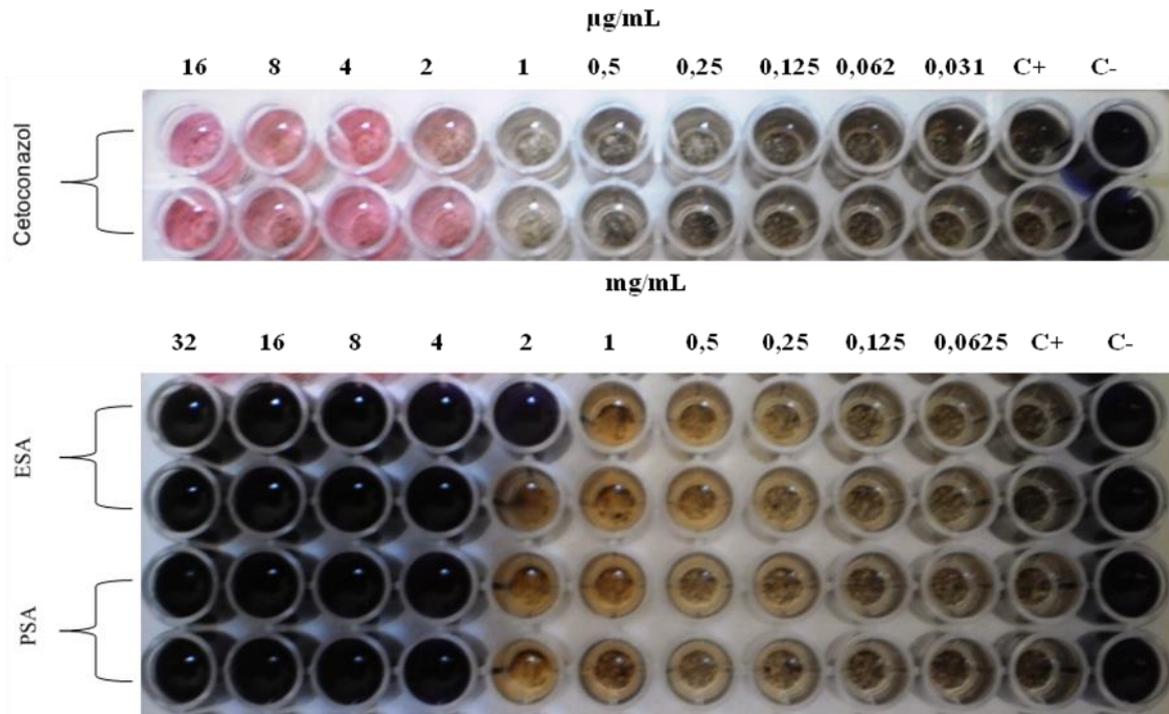


Figura 35: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* Tp 415, após 11 dias de sua realização.

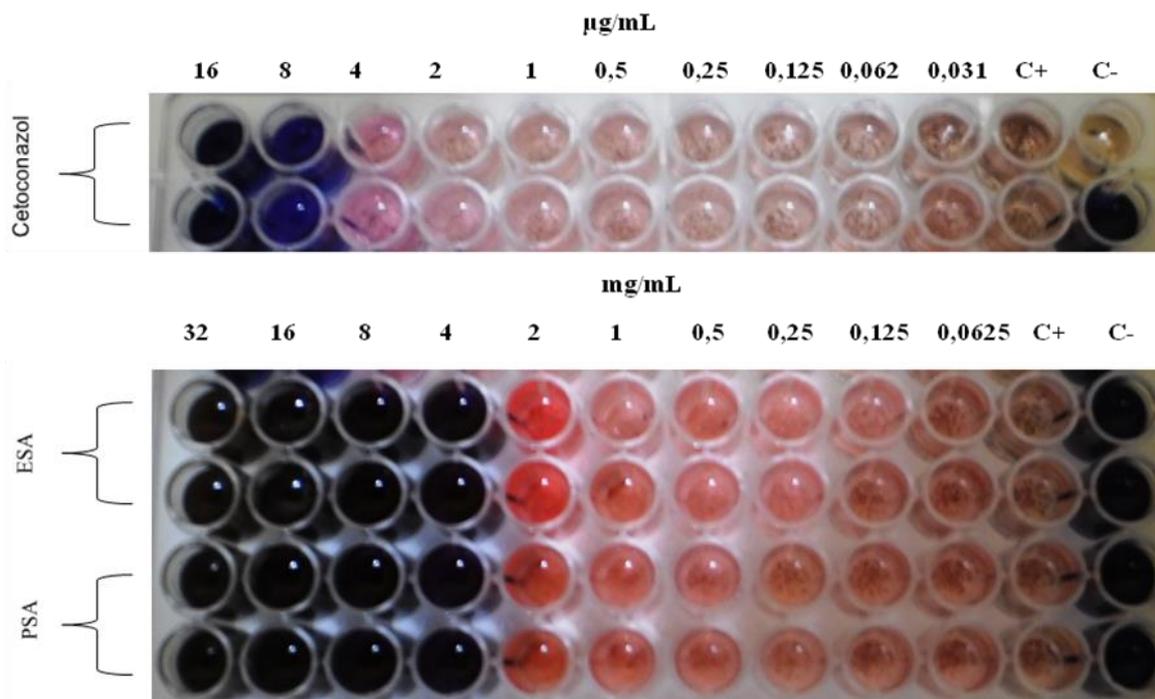


Figura 36: Bioensaio para determinar a CIM dos extratos secos (ESA e PSA) das folhas de *V. guianensis* frente à cepa de *C. albicans* U 1101, após 11 dias de sua realização.

6 CONCLUSÕES

Através da caracterização da matéria-prima vegetal dos quatro lotes analisados de *V. guianensis*, pode-se observar que houve diferenças significativas entre eles, deixando clara a influência que os fatores edafoclimáticos têm sobre as características físico-químicas da matéria-prima vegetal, ressaltando a importância em estabelecer parâmetros para o controle de qualidade. Estas diferenças podem ser utilizadas no estabelecimento de critérios químicos e tecnológicos no controle de qualidade para esta espécie vegetal, através do teor de umidade, teor extrativo, diâmetro médio das partículas e metabólitos secundários identificados através da prospecção fitoquímica.

Os parâmetros extrativos estudados (método de extração e tipo de solvente) revelaram-se bastante influentes na elaboração da solução extrativa padronizada, cujos valores de caracterização podem ser utilizados como critérios de referência para futuras análises.

Para a extração de taninos a partir das folhas de *Vismia guianensis*, o melhor método de extração é a maceração, utilizando como solvente etanol. Para obtenção de solução extrativa com elevado resíduo seco os melhores parâmetros extrativos são: decocção, utilizando como solvente uma solução de etanol:água (50:50 v/v). Entretanto, observa-se que os melhores parâmetros extrativos visando à atividade antifúngica foram: o método de maceração com solução etanol:água (50:50 v/v), que apresentaram resultados bastante satisfatórios inibindo o crescimento de *C. albicans*, *M. furfur* e *T. rubrum*.

A viabilidade da obtenção de extrato seco por aspersão, a partir da solução extrativa obtida através de maceração com etanol:água (50:50 v/v) e relação droga solvente de 5% (m/v) com adição de adjuvante (dióxido de silício coloidal), foi constatada pelo seu maior rendimento operacional, quando comparado ao rendimento do extrato seco obtido de solução

extrativa sem adição de adjuvante, levando em consideração também sua maior estabilidade física relacionada à menor higroscopicidade, proporcionada pela adição do adjuvante.

Com relação ao doseamento de polifenóis, o ensaio de validação para a substância de referência e ESA de *V. guianensis* demonstrou boa reprodutibilidade e exatidão do método para a análise dos polifenóis e taninos totais presentes nos produtos derivados dessa espécie.

Os extratos secos obtidos por aspensão (ESA e PSA) apresentaram boa atividade antifúngica, chegando em alguns casos, como no da *C. albicans* após 11 dias de realização do ensaio, a apresentar inibição quando o fármaco-padrão já não tinha mais atividade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S. M.; HERRON, J.; FALLON-FRIEDLANDER, S.; HAUFFE, S.; HOROWITZ, A.; RIVIERE, G. J. Pharmacokinetics of terbinafine in young children treated for *tinea capitis*. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, p. 886-91, 2005.

AGRA, M. de F.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, Jan./Mar. 2007.

ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas tóxicas no jardim e no campo**. Belém: Ministério da Agricultura – FCAP, Serviços de Documentação e Informação, 120 p., 1980.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, p.225-226, 1993.

ALMEIDA, L. M. de; SOUZA, E. A. de F.; BIANCHIN, D. B.; SVIDZINSKI, T. I. E. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **An. Bra.s Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 249-55, 2009.

ÁLVAREZ, E. R.; JIMENEZ, G.; ORFA, J.; POSADA, A.; ROGANO, M. C.; BENJAMIN, A.; GIL, G.; JESUS, H.; GARCIA, P.; CARLOS, M.; DURANGO, R.; DIEGO, L. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). **VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacêutica**, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, v. 15, n. 1, p. 165-172, 2008.

AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; HIGINO, J. S.; SILVA, L. R. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v. 15, n. 1-3, p. 66-69, 2003.

APG II. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 141, p. 399-436, 2003.

ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 100 f, 2010.

BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: BORRÁS, M. R. L.(Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

BARAKAT, L. **Avaliação da Viabilidade de Obtenção de Formas Farmacêuticas Plásticas Contendo Extrato Seco De *Caesalpinia Ferrea* Mart**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 90 f, 2011.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Ver. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, out./dez. 1999.

BITTRICH, V. 2012. *Hypericaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB025586>).

BOHME, H.; HARTKE, K. **Europaisches Arzneibuch, Band I und II, Kommentar**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1976.

BONATI, A. How and Why Should we Standardize Phytopharmaceutical Drugs for Clinical Validation? **Journal of Etnopharmacology**, v. 32, p. 195-197, 1991.

BOTTA, B.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE G.; MARINI-BETTOLO, G. B.,; MSONTHI, J. D. Prenylated bianthrone and vismione F from *Psorospermum febrifugum*. **Phytochemistry**, n. 24, p. 827-830, 1985.

BOTTA, B.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, M.; OGUAKWA, U. 3-geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone and Vismiones C, D and E from *Psorospermum febrifugum*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 539 – 542, 1983.

BOTTA, B.; MONACHE, D. G.; MONACHE, D. F.; BETTOLO, M.G.B.; MENICHINI, F. Vismione H and prenylated xanthenes from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 25. p.1217-1219, 1986.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos, 2003.

BUNDESVEREINIGUNG **Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.). Deutscher Arzneimittel – Codex**. 1986. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, v.1, Codex – Probe 4,9, 1986.

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

CAMELLE, G.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; MARTINI BETTOLO, B.; ALVES DE LIMA, R. 2- isoprenylemodin and 5,5'-dimethoxysesamin from *Vismia guaramirangae*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 417 – 419, 1982.

CAMELO, S. R. P. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 64 f, 2010.

CARDONA, L.; FERNÁNDEZ, I.; PEDRO, J.; SEOANE, E.; VIDAL, R. Additional new xanthenes and xanthonolignoids from *Hypericum canariensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 49, p. 95-100, 1986.

CARR, R. L. Evaluatin Flow Properties of solids. **Chemical engineering**, v. 72, m. 2, p. 163-168, 1965.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – Celastraceae (espinheira-santa)**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 133f, 1997.

CASADEIBAG, J.; JACOB, M.; CASSANAS, G.; GAUDY, D.; BAYLAC, G.; PUECH, A. Physicochemical and pharmacological properties of spray-dried powder from *Fraximus excelsior* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, p. 21-216, 1989.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos de plantas medicinais. Conceitos sobre Modificação estrutural para otimização de atividade. **Quim. Nova**. São Paulo. v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

ÇELIK, M.; WENDEL, S. C. Spray dring and pharmaceutical applications. In: PARICKH, D. M. **Handbook of pharmaceutical granulation technology**. 2 ed., Boca Raton: Taylor and Francis group, p. 129-158, 2005.

CERVELATTI, E. P.; FERREIRA-NOZAWA, M. S.; AQUINO-FERREIRA, A. L. MARTINEZ-ROSSI, N. M. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 1, p. 99-102, 2004.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997.

CORNEC, M. Aérosil: um adjuvant efficace pour lês formes sèches, liquids et pâteuses. **STP Pharma. Sci.**, v. 6, p. 110-112, 1990.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 1994.

COSTA, L. M. DA. **Desenvolvimento de Produto Seco Por Aspersão Obtido A Partir Das Cascas Do Caule De *Libidibia Ferrea* Martius Var. *Ferrea* (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 126 f, 2012.

COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R.; FREITAS, L. A. P. Development of a Phytopharmaceutical Intermediate Product Via *Spray Drying*. **Drying Technology**, v. 29, n. 6, 2011.

DA SILVA, D. M. **Desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida contendo extrato padronizado de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. Asteraceae**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DAVIS, C. C., WEBB, C. O.; WURDACK, K. J.; JARAMILLO, C. A.; DONOGHUE, M. J. Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rainforest. **Am. Nat.**, v. 156, n. E36-E65, 2005.

DE CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 149 f, 1996.

DE SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis forma flavicarpa***. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 141 f, 1997.

DE SOUZA, T. P.; LIONZO, M. I. Z.; PETROVICK, P. R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Rev. Bras Farmacogn.**, v. 16, p.94-98, 2006.

DELLE MONACHE, F.; BOTTA, B.; DELLE MONACHE, G.; BETTOLO, M. Prenilated antranoids from *Psorospermum* species. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1855-1856, 1985.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; MAC-QUHAIE, M.; BETTOLO, M.; LIMA, A. Xanthones, xantholignoids and others constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 227-232, 1983.

DELLE MONACHE, F.; MARQUINA, M.; FERRARI, F.; MARTINI-BETTOLO, G. Ferruginin A and B and Ferruanthrone, New triprenylated anthranoids from *Vismia baccifera* var. *ferruginea*. **Tetrahedron**, v. 35, p. 2143 – 2149, 1979.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2002.

DORN, M., ROHENERT, K. Dimorphism of *Pityrosporium orbiculare* in a defined culture medium. **J. Invest. Dermatol.**, St. Malden, v. 69, p. 244-248, 1977.

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; MENGHINI, L.; CURINI, M. Chemistry and Pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. **Phytochemistry**, v. 68, p. 939 – 953, 2007.

EWAN, J. Synopsis of the south american species of *Vismia* (Guttiferae). **Bull. of the Unit. States Nat. Mus.**, v. 35, p. 293-373, 1962.

FAERGEMANN, J.; FREDRIKSSON, T. Tinea vesicolor with regard to soborrhic dermatitis: an epidemiologic investigation. **Arch. Dermatol.**, Washington, v. 115, p. 966-968, 1979.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.

(Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, cap. 12. p. 263 – 288, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed., São Paulo: Atheneu, 2010.

FERREIRA, M. DA. S. **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 70 f, 2009.

FETROW, C. W.; ÁVILA, J. R. **Manual de Medicina Alternativa para o Profissional**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; PIMENTA, F. C.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.30, n. 2, p. 193-196, 2009.

FULLER, R. W., WESTERGAARD, C. K., COLLINS, J. W., CARDELLINA II, J.H., BOYD, M. R. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzo-phenones from *Vismia cayennensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 67-69, 1999.

GONÇALVES, M. L. S.; MORS, W. B. Fracionamento de extratos de *Vismia Reichardtiana* (O. Ktze), Ewan, remédio popular contra dermatofitoses. **Ciência e Cultura**. São Paulo. v. 30, p.75-6, 1978.

GONCALVES, M.; MORS, W. Vismiaquinone, A isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reirchartiana*. **Phytochemistry**,v. 20, p.1947-1950, 1981.

GONG, J. Q.; LIU, X. Q.; XU, X. S.; ZENG, X. S.; LI, X. F. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*: report of two cases. **Mycoses**, v. 50, n. 2, p. 102-8, 2007.

GONZALES, J.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; MARTINI, G. Prenylated benzophenones from *Vismia decipiens*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2025 – 2028, 1980.

GONZALES, J. G.; MONACHE, F. D.; MONACHE, G. D.; MARINI BETOLLO, G. B. Chemistry of the genus *Vismia*. Part VII. Vismione A from the leaves of *Vismia guianensis*. **Planta Médica**, v. 40, p. 347-350, 1980.

GUSTAFSSON, M. H. G.; BITTRICH, V.; STEVENS, P. F. Phylogeny of Clusiaceae based on rbcL sequences. **Int. J. Plant Sci**, v. 163, n. 6, p. 1045-1054. 2002.

GUYOT, J. C.; ARNAULD, P. BECOURT, P. CASSIERE, J. P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FERRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MALFROID, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R. SERGOT, S.; TORE, P. Commentaires reletifs aux generals d'analyses des forms orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et

européenne. Rapport d'une commission SFSTP. S. T. P. **Pharma Pratiques**, v. 5, n. 6, p. 482-494, 1995.

HAMMEL, E. B.; ROBSON, N. K. B. Clusiaceae. In: STEVENS, W.D.; ULLOA, C.; POOL, A. & MONTIEL, O.M. (eds.). Flora de Nicaragua. **Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.**, v. 85, n. 1, p. 616-631, 2001.

HAUSNER, H. H. Friction Conditions in a mass of metal powder. **International Journal of powder Metallurgy**, v. 3, n. 4, p. 7-13, 1967.

HUSSEIN, A.; BOZZI, B.; CORREA, N.; CAPSON, T.; KURSAR, T.; COLEY, P.; SOLIS, P.; GUPTA, M. Bioactive constituents from three *Vismia* species. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 858 – 860, 2003.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. Rockville: FDA, 1995.

LACAZ, C. S., NAGAO, M. T. Isolamento de *Malassezia furfur*. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 58, p. 241- 244, 1983.

LACAZ, C. S.; PETTINATI, A. S.; SALEBIAN, A. **Candidíases**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 190 p., 1980.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**, Sarvier: São Paulo, 2002.

LANTZ, R. J. Size reduction. In: LIEBERMAN, H. A.; LACHMAN, I.; SCHWARTZ, J. B. (Ed.). **Pharmaceutical Dosage Forms: tablets**. 2 ed., new York: Marcel Dekker, v. 2, p. 107-1999, 1989.

LEEMING, J. P., NOTMAN, F. H. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 25, n. 10, p. 2017-2019, 1987.

LINS, A. C. da S.; SANTOS, C. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; SANTOS, S. G; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S. Inibição de La ADN topoisomerasa II- α humana por γ -hidroxiferrugenina A, um antranoide prenilado aislado del látex de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **LabCiencia com notícias técnicas del laboratório**, v. 4, p. 22-24, 2007.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C.; **Phytopharmaceutical Technology**, Boca Raton: CRC Press, p. 320-334, 1989.

LONGHINI, R. **Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 176 f, 2006.

LOPES, J. B. L.; GONÇÁLVES, J. R. S. Abordagem fitoquímica preliminar dos frutos de *Vismia reichardtiana* (O. Ktze) Ewan. (Guttiferae). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4., São Luís. **Anais...** São Luís: UFMA, p.13, 1992.

LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; BENEVENGA, J. P.; ENCARNAÇÃO, C. S. Nodular infection of the hair caused by *Malassezia furfur*. **Mycopathologia**, The Hague, v. 125, p. 149-159, 1994.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa: São Paulo, p. 512, 2002.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 53, p. 931-51, 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. São Paulo: **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, P. M. *O caminho medicinal das plantas: aspectos sobre o cultivo*. São Paulo: CPQBA-UNICAMP, 1997.

MARSHALL, K. Compressão e consolidação de sólidos em pó. In: LACHMAN, I.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Ed.). **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v. 1, cap. 4, p. 113-170, 2001.

MARTINS, E. R. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 220 f, 1995.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: Editora UFV, 220 p., 1998.

MASTERS, K. (1985). Spray drying handbook. In: PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n.10, 2009.

MATA, E. R. M.; MEDEIROS, S. S. A.; DUARTE, M. E. M. Microencapsulamento do umbu em pó com diferentes formulações de maltodextrina: estudo do tamanho das partículas por microscopia eletrônica. **Rev. Bras. de Pro. Agroind.**, v. 7, n. 1, p. 59-70, Campina Grande, 2005.

MATOS, F. J. F. **Introdução à fitoquímica experimental**, EUFC, 1997.

MAURY, M.; MURPHY, K.; KUMAR, S.; SHI, L.; LEE, G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. **Eur. J. Pharmac. & Biopharma**, v. 59, p. 565–573, 2005.

MICHAEL, J. K. (1993) Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. In: PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n.10, 2009.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MIOTO, R. **País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. Jornal Folha de São Paulo**, 7 de junho de 2010.

MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; VAREJÃO, M. J. C.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. Anthraquinones from *vismia* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2041-2042, 1981.

MITSCHER, L. A.; LEV, L. P.; BATHOLA, M. S.; WU, W. N.; BEAL, J. L. Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale end methodology. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.

MONACHE, F. D.; TORRES, F.F.; MARINI-BETTOLO, G. B.; LIMA, R. A. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: γ -hidroxi and γ,γ' -dihidroxi-ferruginina A. **J. Nat. Prod.**, v.43, n.4, p.487-494, 1980.

MONTGOMERY, D. C. **Diseño y análisis de experimentos**. México: Iberoamérica, 1991.

MORETTI, A.; POSTERARO, B.; BONCIO, L.; MECHELLI, L.; GASPERIS, E.; AGNETTI, F.; RASPA, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnostic by PCR-REA. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 21 p. 139-142, 2004.

NAGEN, J.; FAUSTINO, F. Xanthones and Other Constituents of *Vismia parviflora*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, p. 505-508, 1997.

NAGEN, J.; FARIA DE JESÚS, T. Quinoids and other constituents of *Vismia martiana*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3362 – 3364, 1990.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. Approved Standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.

NGUEMEVING, J.; AZEBAZE, A.; KUETE, V.; CARLY, N.; BENG, P.; MEYER, M.; BLOND, A.; BODO, B.; NKENGFACK, A. Laurentixanthones A and B, antimicrobial xanthones from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1341 – 1346, 2006.

NOGUEIRA, M. C. M.; COSTA, R O.; SUDO, L.; PORTO, J. A. *Malassezia furfur* (na pitiríase versicolor em sadios). **An. Bras. Derm.**, Rio de Janeiro, v. 63 supl. 1, p. 229-234, 1988.

NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; FREITAS, P. C. D. DE; Silvia BARROS, B. DE M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, P. 262-269, 2005.

NOUNGOUE, D.; CHAABI, M.; NOUGUELA, S.; ANTHEAUME, C.; BOYOM, F.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.; LOBSTEIN, A.; TSAMO, E. Antimalarial Compounds from the Stem Bark of *Vismia laurentii*. **Zeitsch Naturfor**, v. 64, p. 210 – 214, 2009.

NYQVIST, H. Saturated salt solutions for maintaining specified relative humidities. **Intern. J. Pharm. Techn. Prod. Manufac.**, v. 4, p. 47-78, 1983.

O'BRIEN, J.; WILSON, L.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resaurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, A. H. de. **Atividade antimicrobiana e imunológica *in vitro* dos extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre).** Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho", 129 f, 2009a.

OLIVEIRA, J. A. A.; BARROS, J. A.; CORTEZ, A. C. A.; OLIVEIRA, J. S. R. L. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, p. 238-43, 2006.

OLIVEIRA, O. W. **Parâmetros de produção e caracterização de produto seco de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – celastraceae – em torre de secagem por aspersão.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90 f, 2009b.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, W. P.; BOTT, R. B.; SOUZA, C. R. F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 523-533, 2006.

PASQUA, G.; MONACELLI, B.; CUTERI, A.; SPUNTARELLI, F. RASCIO, N.; BOTTA, B. MONACHE, G. D.; SCURRIA, R. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis*. **Protoplasma**, v.189, p. 9-16, fev. 1995.

PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n.10, 2009.

PELOZO, M. I. G. **Desenvolvimento e caracterização tecnológica de extratos e do granulado de *Paullinia cupana* H. B. k. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná).** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM, Maringá, 2005.

PERÓN, M. L. D. F.; TEIXEIRA, J. J. V.; SVIDZINSKI, T. I. E. Epidemiologia e etiologia das dermatomicoses superficiais e cutâneas na Região de Paranavai- Parana, Brasil. **Rev. Bras. Ana.l Clin.**, v. 37, p. 77-81, 2005.

PETROVICK, G. F. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por *spray drying* de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. Asteraceae (marcela)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 200 f, 2006.

PINHEIRO, R.; MAC-QUHAE, M.; BETTOLO, M.; DELLE MONACHE, F. Prenylated antranoids from *Vismia* species. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1737-1740, 1984.

POLAK, A. Past, present and future of antimycotic combination therapy. **Mycoses**, v. 42, p. 335-370, 1999.

POLITI, M.; SONOGOGO, R.; NDJOKO, K.; GUILLET, D.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; MORELLI, L. HPLC-UV/PAD and HPLC-MS Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. **Phytochemical Analysis**, V.15, p. 355-364, 2004.

PONTES, Z. B.; LIMA, E. D. E. O.; OLIVEIRA, N. M.; DOS SANTOS, J. P.; RAMOS, A. L.; CARVALHO, M. F. Onychomycosis in João Pessoa City, Brazil. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 34, n. 2, p. 95-9, 2002.

RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, H. Á.; SCHIFFMAN, R. F. Secagem. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v. 1, p. 83-112. 2001.

ROBSON, N. K. B. 1978. Hypericaceae. In: WOODSON, Jr., R. E.; SCHERY, R.W. (eds.). *Flora of Panama*. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 65, n. 4, p. 9-26. 1978.

ROCHA, A. P. T. **Estudo do processo de recobrimento contínuo de extratos Fitoterápicos secos em leito de jorro**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 140 f, 2006.

RODRÍGUEZ, J.C. Guttiferae. In: Calderón de RZEDOWSKI, G.; RZEDOWSKI, J. (eds.). **Flora Fanerogâmica del Valle de México**. Instituto de Ecología, A.C., p. 410-414, 2001.

RONALD, C. D. Spray drying innovative use of an old process. **Design Elements**, v. 7, p. 97-113. 1997.

SALAS, F.; ROJAS, J.; MORALES, A.; RAMOS-NINO, M. In vitro Cytotoxic Activity of Sesamin Isolated from *Vismia baccifera* var. *dealbata* Triana & Planch (Guttiferae) Collected from Venezuela. 2008. **Nat. Prod. Comm.**, v. 3, p. 1705 – 1708, 2008.

SANTOS, A. L.; GRAEBNER, I. B.; MARQUES, D.; REGIANI, M. A.; MORAIS, L. C.; SARTORI, R. A.; FERNANDEZ, C.C; RIBEIRO, S. M. ; Ensaio microbiológico dos extratos

e frações da *Vismia guianensis*. Clusiaceae. (Aubl.) Pers. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

SANTOS, A. L.; SARTORI, R. A.; MARQUES, D; RIBEIRO, S. M.; GRAEBNER, I. B. Atividade antimicrobiológica de extratos e frações de *Vismia guianensis* (Clusiaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

SANTOS, J. I.; NEGRI, C. M.; WAGNER, D. C.; PHILIPI, R.; NAPPI, B. P.; COELHO, M. P. Some Aspects of Dermatophytoses Seen at University Hospital in Florianopolis, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 39, p.137-140, 1997.

SANTOS, M.; NAGEM, J.; SILVA, M.; SILVA, L. Xanthones from *Vismia latifolia*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, p. 537-539, 2000.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SEO, E. K.; WANI, M. C.; WAL, L. M. E.; NAVARRO, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, D. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 35-42, 2000.

SIGURGEIRSSON, B.; PAUL, C.; CURRAN, D.; EVANS.; E. G. V. Prognostics factors of mycological cure following treatment of onychomycosis with oral antifungal agents. **Br. J. Dermatol.**, v. 147, p. 1241-3, 2009.

SILVA, J. G. DA; SOUZA, I. A.; JANE, S.; HIGINO, SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SILVA, M. de D. S.; SILVESTRE, R. G.; NASCIMENTO, P. L. do; AGRA, M. DE F.; MOREIRA, K. A.; SILVA, T. M. S. Estudo químico, atividade antioxidante e antibacteriana da fração hexânica dos frutos verdes da espécie *Vismia guianensis*. In: X Jornada de ensino, pesquisa e extensão (JEPEX), Pernambuco – UFRPE, 2010.

SIMMONDS, M.; BLANEY, W.; DELLE MONACHE, M.; MAC-QUAE, M.; BETTOLO, M. Insect antifeedant propriertis of anthanoids from the genus *Vismia*. **J. Chem. Ecol.**, v. 11, p. 1593, 1985.

SIMÕES, D. E. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.^a ed. São Paulo: Atheneu:1999.

SMITH, G. J.; THOMSEN, S. J.; MARKHAM, K. R.; ANDARY, C.; CARDON, D. The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 136, p. 87-91, 2000.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final.** Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 279 f, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5. ed., Florianópolis, Porto Alegre. Editora da UFCS E UFRS, 2005. cap. 13, p. 289-326.

STANDLEY, P.C.; WILLIAMS, L.O. (eds.). Guttiferae. Flora of Guatemala. Fieldiana Bot., v. 24, n. 7, p. 36-61. 1961.

STEVENS, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb>.

SUFFREDINI, I.B.; SADER, H.S.; GONCALVES, A.G.; REIS, A.O.; GALES, A.C.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.379-384, 2004.

TADA, M. **Phloroglucinol derivatives as competitive inhibitors against thromboxane A and leukotriene D from *Hypericum erectum***, 1991. In: NÖR, C. Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 165 f, 2006.

TAMOKOU, J.; TALA, M.; WABO, H.; KUIATE, J.; TANE, P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, p. 571-575, 2009.

THOMAS, C. e POURCELOT, Y. Preformulation of five commercial celluloses in drug development: rheological and mechanical behaviour. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 15, p. 1947-1964, 1991.

TOKUOKA, T.; TOBE, H. Phylogenetic analysis of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of Euphorbiaceae sens. str. **J. Plant Res.**, v. 119, p. 599-616, 2006.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. de L. Popular phytotherapy: the instrumental search as a therapy fitoterapia popular: la busca instrumental para el acto de la

practica de la fitoterapia. **Texto Contexto Enferm.**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

USP25 - **The United State Pharmacopeia, 25**, ver. Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: USP, 25, 2002.

VALENTINI, C. M. A.; SILVA, L. E. DA; MACIEL, E. N.; Elton FRANCESCHINI, E.; SOUSA JR, P. T. DE; DALL'OGGIO, E. L. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* AUBLET. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1506-1509, 2010.

VASCONCELOS; E. A. F.; MEDEIROS; M. G. F.; RAFFIN; F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Rev. bras. farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VEGNIA, F. E., M. L. PANCERIB, M. L., BIFFIC, M. Three scenarios of clinical claim reimbursement for nosocomial infection: the good, the bad, and the ugly. **Journal of Hospital Infection**. v. 56, p. 150–155, 2004.

VEHRING, R. Pharmaceutical Particle Engineering via *Spray Drying*. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 5, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VICKERS, A.; ZOLLMAN, C. ABC of complementary medicine: herbal medicine. **Br. Med. Journal**, v. 319, p. 1050-1053, 1999.

VIZCAYA, M.; MORALES, A.; ROJAS, J.; NUÑEZ, R. Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 1, p. 12 – 34, 2012.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7. überarb., 2000.

WAGNER, J. D. A. A importância dos produtos de origem natural no atendimento à saúde. **Fórum de Debates – Fitomedicamentos e Produtos Naturais**. São Paulo Brasil. 2002.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval th February 2008. <http://delta-inkey.com>. v. 13, 1992.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermathophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240-259, 1995.

WELLS, J. I. **Pharmaceutical Preformulation: the Physicochemical Properties of drug Substances**. London: Ellis Horwood, 1988.

WORLD Health Organization. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneve: WHO, 1998.

YAMADA, H.; KOHNO, S.; MAESAKI, S.; KOGA, H. KAKU, M.; HARA, K.; TANAKA, H. Rapid and highly reproductible method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1009-1012, 1993.

YATES, F. Complex experiments. **Journal Royal Statistical Society**, p. 181-247, 1935.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 435-479, 2001.

