



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

SHELLYGTON LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO INFUSO
DE *CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE
DERMATÓFITOS**

Cuité-PB

2015

SHELLYGTON LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO INFUSO
DE *CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE
DERMATÓFITOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande do Centro Educação e Saúde, como requisito legal para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Santos Carmo

Cuité-PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586a Silva, Shellygton Lima.

Avaliação físico - química e do potencial antifúngico do infuso de camellia sinensis (L.) kuntze contra isolados clínicos de dermatófitos. / Shellygton Lima Silva. – Cuité: CES, 2015.

60 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Egberto Santos Carmo.

1. Dermatofitoses . 2. Camellia sinensis. 3. Chá preto. I.
Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 616.992

SHELLYGTON LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO INFUSO
DE *CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE
DERMATÓFITOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Farmácia da
Universidade Federal de Campina Grande do Centro Educação e Saúde, como requisito legal
para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Egberto Santos Carmo UFCG/CES
Orientador

Prof^a. Dr^a. Júlia Beatriz Pereira de Souza UFCG/CES
Examinadora

Prof^a. Dr^a. Igara Oliveira Lima UFCG/CES
Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe e à minha noiva, pessoas que não mediram esforços em me ajudar nessa e em todas as batalhas da minha vida. Em especial, dedico esse trabalho ao pequeno Lucas Vinícius, pois muito do tempo destinado a esse trabalho era por direito seu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu refúgio e minha fortaleza pelo dom supremo da vida e por sua imensurável fidelidade que excede todo entendimento.

À minha mãe Maria do Carmo, meu porto seguro, exemplo de determinação, força, honestidade, dedicação, preocupação excessiva e formação moral. Sou eternamente grato por tudo o que sou hoje, por todas as minhas conquistas e sonhos realizados. Essa conquista não é só minha, e sim nossa. Sem a senhora jamais teria sido possível.

À minha noiva Ana Flávia Balbino, pela cumplicidade, paciência, compreensão nos momentos em que estive ausente. Sem você tudo seria mais difícil.

Ao pequeno Lucas Vinicius, que só veio a agradecer minha existência, que mesmo apesar da pouca idade, muito compreendeu minha ausência, fonte de inspiração que me fez superar todos os desafios, meu melhor amigo e maior motivador.

Aos meus irmãos Lucas Patchelly e Yonara Bezerra, que nos momentos de minha ausência, sempre com muita compreensão e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Egberto Santos Carmo, pela paciência e sabedoria com que transmitiu o conhecimento, conduzindo um modesto aluno a atingir suas metas de forma digna e honesta. Exemplo de ética, seriedade e profissionalismo.

A nobre colega, que me apoiou e que sempre esteve ao meu lado durante esta longa caminhada, em especial a Geoclecia Ferreira, que muitas das vezes compartilhei momentos de êxitos e dificuldades.

Aos amigos Fernando Amâncio, Edvalcília Santos, Manoel Marcelino, João Crispim, pelas batalhas que travamos juntos na vivência acadêmica.

Ao Prof. Dr. Fernando de Sousa Oliveira, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade, por acreditar no meu trabalho, por abrir às portas da iniciação à docência por meio da monitoria, onde pude vivenciar experiência gratificante para minha vida acadêmica e profissional.

As professoras Dr.^a Júlia Beatriz Pereira de Souza e Dr.^a Igara Oliveira Lima, por aceitarem avaliar meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira que colaborou com os ensaios microbiológicos, acreditando em meu trabalho.

Ao Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pela disponibilização dos laboratórios, bem como toda a estrutura cedida, durante a graduação, que forem imprescindíveis na minha formação profissional.

E a todos que, contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação pessoal e profissional, que neste momento, eu possa ter deixado de mencionar.

Meus sinceros agradecimentos.

Na vida é preciso ter muito cuidado com o que ouvimos. Há mentiras cativantes e verdades "sem graça", isso costuma confundir a razão.

Carlos Hilsdorf

RESUMO

As dermatofitoses são infecções cutâneas causadas por fungos, que se limitam às porções queratinizadas da pele, pelos ou unhas. Sabendo-se do limitado arsenal terapêutico e do aumento da resistência fúngica, percebe-se nos produtos naturais alternativas importantes a serem investigadas. O objetivo desse trabalho foi verificar os parâmetros físico-químicos dos pós e infusos de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze bem como seu potencial antifúngico contra dermatófitos. As análises do teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, resíduo seco e susceptibilidade antifúngica do infuso foram realizadas nas diferentes formas de apresentação da droga vegetal. Os dados obtidos do teor de umidade foram de 11,33% e 11,19%, para a droga, a granel e sachê, respectivamente. O teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, também se enquadraram nos parâmetros das literaturas, excetuando-se o teor de cinzas insolúveis em ácido para a droga a granel com valor maior que 1,5%. O teor de sólidos solúveis em líquido extrator (resíduo seco) demonstrou que os infusos quando submetidos a processos de extração com agitação, proporcionaram os maiores rendimentos. Na avaliação da susceptibilidade antifúngica, através da técnica de microdiluição, não se verificou inibição do crescimento das cepas de *Trichophyton rubrum*, quando expostas aos infusos de *C. sinensis*. Portanto, percebeu-se com os testes físico-químicos, a exceção do teor de cinzas insolúveis em ácido para a droga vegetal a granel, que ambas as formas de obtenção (a granel e sachê) encontram-se dentro dos limites especificados na literatura e que os infusos testados não foram capazes de inibir às cepas de *Trichophyton rubrum*, porém para futuros estudos, sugere-se isolar e identificar o(s) composto(s) presente(s) nessa droga vegetal responsável(eis) por uma possível atividade antifúngica contra esse dermatófito.

Palavras-chave: Dermatofitoses, *Camellia sinensis*, chá preto.

ABSTRACT

Dermatophytoses are skin infections caused by fungi, which are limited to keratinized portions of the skin, hair or nails. Knowing the limited therapeutic tools and increased fungal resistance, it is perceived in the natural products important alternatives to be investigated. The aim of this study was to determine the physical and chemical parameters of powders and infusions of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and their potential antifungal against dermatophytes. The analysis of the moisture content, total ash and acid insoluble ash, dry and antifungal susceptibility of infusion were carried out in different forms of the vegetable drug. The data of moisture content were 11.33% and 11.19%, for the drug, bulk and sachet respectively. The content of total ash and acid insoluble ash, also fulfilled the parameters of literature, except for the content of acid insoluble ash for bulk drug with value greater than 1.5%. The soluble solids content in liquid extractor (dry) demonstrated that infused when subjected to extraction processes with agitation provided higher yields. In the evaluation of the antifungal susceptibility by microdilution technique, there was no inhibition of growth of the strains *Trichophyton rubrum*, when exposed to infusions from *C. sinensis*. Therefore realized with the physical and chemical tests, except for the insoluble ash content in acid for bulk vegetable drug, both ways of obtaining (bulk and sachet) are within the limits specified in the literature and that the tested infusions were not able to inhibit the strains *Trichophyton rubrum*, but for future studies it is suggested to isolate and identify the compound (s) present (s) that responsible plant drug (lo) by a potential antifungal activity against this dermatophyte.

Keywords: Dermatophytosis, *Camellia sinensis*, black tea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de fungos filamentosos (A) e leveduriformes (B).....	19
Figura 2: Macroconídio e alguns microconídios, seguidos de hifas septadas de <i>Trichophyton rubrum</i> var. <i>rodhaini</i>	21
Figura 3: Dermatofitose, apresentando lesão circular eritematosa com borda papulovesicular, ligeiramente elevada (A). Lesão superficial ocasionada por dermatófitos (B).....	24
Figura 4: Ação de fármacos antifúngicos sobre a síntese de ergosterol na membrana celular fúngica.....	27
Figura 5: Mecanismo de ação de antifúngicos que interferem na separação dos cromossomos.....	27
Figura 6: Fotografia do arbusto florido da <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.....	30
Figura 7: Dímeros das catequinas monoméricas.....	30
Figura 8: Etapas do processamento da <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze, para obtenção do chá preto.....	31
Figura 9: Colônias de <i>Trichophyton rubrum</i> , com textura algodona e relevo apicado e radiado. Colônias de <i>T. rubrum</i> com textura furfurácea.....	34
Figura 10: Fluxograma de obtenção de resíduo seco.....	37
Figura 11: Esquema da montagem de microplaca para teste antimicrobiano.....	40

Figura 12: Teste de susceptibilidade antifúngica dos infusos do chá preto. *T. rubrum* -305, com droga vegetal a granel (A) e com droga vegetal em sachê (B).....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação do teor de umidade de amostras de <i>Camellia sinensis</i> (chá preto). Resultados expressos em média \pm Dp (n=3).....	41
Tabela 2: Determinação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido de amostras de <i>Camellia sinensis</i> (chá preto). Resultados expressos em média \pm Dp (n=3).....	42
Tabela 3: Determinação do teor de resíduo seco de amostras de <i>Camellia sinensis</i> (chá preto). Resultados expressos em média \pm Dp (n=3).....	43
Tabela 4: Determinação da concentração inibitória mínima dos infusos da droga vegetal em sachê.....	44
Tabela 5: Determinação da concentração inibitória mínima dos infusos da droga vegetal a granel.....	45
Tabela 6: Determinação da concentração inibitória mínima do Cetoconazol.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

(m/m) - Concentração massa/massa

$\mu\text{g/mL}$ - Micrograma por mililitro

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASD - gar Sabouraud Dextrose

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CSD - Caldo Sabouraud Dextrose

mg/mL - Microgramas por mililitros

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

(v/v) - Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específico.....	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 Fungos.....	19
3.2 Micoses.....	20
3.3 Dermatófitos/Dermatofitoses.....	20
3.4 Características clínicas.....	22
3.5 Epidemiologia.....	22
3.6 Patogenia.....	24
3.7 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	25
3.8 Tratamento.....	26
3.9 Resistências aos antifúngicos.....	28
3.10 Plantas medicinais com atividade antimicrobiana.....	28
3.10.1 <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze/ chá preto.....	29
3.11 Controle da Qualidade de Drogas Vegetais.....	31
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Materiais.....	33
4.1.1 Obtenção das amostras vegetais.....	33
4.1.2 Obtenção das amostras biológicas.....	33
4.1.3 Substância teste de referência.....	34
4.1.4 Meios de Cultura.....	34
4.2 Métodos.....	35
4.2.1 Análises físico-químicas.....	35
4.2.1.1 Determinação dos teores de umidade.....	35
4.2.1.2 Determinação dos teores de cinzas totais.....	35
4.2.1.3 Determinação dos teores de cinzas insolúveis em ácido.....	36
4.2.1.4 Determinação teor de resíduo seco.....	36
4.2.1.5 Obtenção das soluções extrativas (Infusos).....	37
4.2.1.6 Testes de susceptibilidade ao Cetoconazol.....	38
4.2.1.7 Determinação da atividade antifúngica.....	38
4.2.1.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

5.1 Determinações do Teor de Umidade	41
5.2 Determinação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido.....	42
5.3 Determinação do resíduo seco	43
5.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	44
5.5 Testes de susceptibilidade de <i>Trichophyton rubrum</i> frente ao Cetoconazol.....	46
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

As micoses superficiais ou dermatofitoses são infecções cutâneas causadas por fungos, denominados dermatófitos, que se limitam às porções queratinizadas e semiqueratinizadas da pele ou à sua superfície, aos pelos e as unhas, não acometendo a derme e o tecido celular subcutâneo, ossos, articulações e órgãos internos (MILENNI; NEME, 2004). Os dermatófitos compreendem um grupo de fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas no estrato córneo de homens e animais (SIDRIM et al., 2010).

De maneira geral, o controle das infecções fúngicas depende inicialmente da resposta imune do hospedeiro. A doença se instala quando ocorre uma falha nas defesas ou o patógeno se evade das respostas, o que leva à necessidade de se utilizarem fármacos de ações fungicidas ou fungistáticas que atuem o mais especificamente possível contra o agente agressor, de modo a evitar danos ao hospedeiro. Entretanto, essa especificidade é limitada devido ao pouco conhecimento em várias áreas da biologia dos patógenos, como os fatores responsáveis pela virulência e patogenicidade dos fungos e os mecanismos de resistência aos medicamentos disponíveis no mercado (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008).

As dermatofitoses são geralmente associadas a recidivas que se seguem à interrupção da terapia antifúngica (PERES et al., 2010). O tratamento é geralmente longo e oneroso, envolvendo formulações de medicamentos de uso tópico e orais empregados na tentativa de aumentar a taxa de cura dessas infecções cutâneas (GUPTA; COOPER, 2008).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993).

No Brasil, as drogas vegetais inteiras, rasuradas ou pulverizadas são empregadas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por ditos populares. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

As diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais e implantando a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS). Para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde

conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condição socioeconômica da população (VEIGA JUNIOR, 2008).

A *Camellia sinensis* (L.) Kuntze é um arbusto ou árvore de pequeno porte, de origem asiática, pertencente à família Theaceae. Apresenta folhas simples, alternas, inteiras, com margem serrada e textura coriácea (LORENZE; MATOS, 2002). Esta, através de processos fermentativos, origina o chá preto apresentando em sua composição, além dos polifenóis, outros compostos orgânicos como aminoácidos, metil xantinas, carboidratos, proteínas, compostos voláteis e elementos minerais. A oxidação enzimática das catequinas gera uma mistura complexa de dímeros e polímeros das catequinas monoméricas, fenômeno esse conhecido como “escurecimento enzimático” atribuindo sabor e cor característica da droga vegetal (PAGANINI-COSTA; CARVALHO, 2011).

Quanto à atividade antimicrobiana do chá preto, estudos demonstraram inibição do crescimento de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, atividade antifúngica sobre diferentes espécies de *Candida*, além de apresentar um efeito sinérgico com diversos antibióticos (TIWARI et al., 2005). Testes *in vitro*, certificaram que o chá preto foi capaz de suprimir alguns genes específicos relacionados a fatores de virulência (XU; ZHOU; WU, 2012).

Fundamentando-se na importância da atividade antimicrobiana é que se desenvolveu este trabalho, devido a grande incidência das infecções causadas por fungos dermatófitos, associadas às resistências desses microrganismos. Esse fato é exacerbado pelo limitado arsenal antifúngico disponível, aos efeitos colaterais e alto preço desses medicamentos, utilizados no tratamento alternativo e/ou coadjuvante de várias doenças humanas. Dentro dessa perspectiva, a utilização da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze/ chá preto é, sem dúvida, muito importante, particularmente no que tange ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e à identificação de novas moléculas ou protótipos básicos para geração de novos produtos farmacêuticos. Contribuindo de modo significativo na busca por substâncias mais eficazes, menos tóxicas, e de maior acesso pela maioria da população. Determinando novas fontes naturais de compostos que contenham essas propriedades, por meios que sejam financeiramente e ecologicamente viáveis e por tecnologias limpas (GHENOV, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar os parâmetros físico-químicos do infuso de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze bem como seu potencial antifúngico contra dermatófitos.

2.2 Específico

Determinar os parâmetros físico-químicos quanto aos teores de umidade e cinzas totais, determinação de cinzas insolúveis em ácido e resíduo seco para *Camellia sinensis* (L.) Kuntze/ Chá preto.

Analisar qual o modo de extração do chá preto possui a mais eficiente atividade antifúngica e se a forma de apresentação (sachê e a granel) interfere nessa atividade

Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de infusões do chá preto, proveniente da droga em sachê e a granel frente às cepas de dermatófitos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Fungos

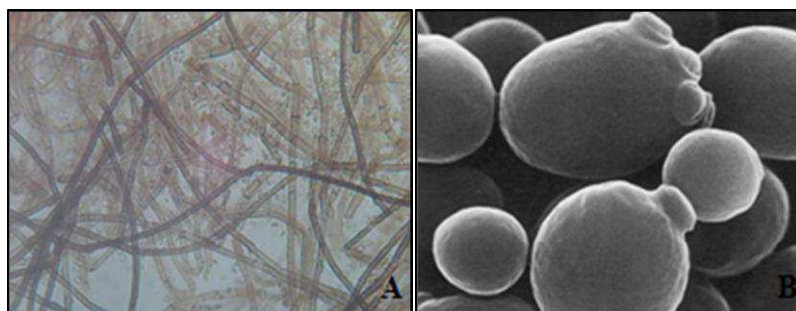
Os fungos em épocas remotas foram considerados como vegetais, porém, por apresentar características que permitissem sua diferenciação das plantas, como o fato de não sintetizarem clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; possuírem parede celular composta de quitina ao invés de celulose (com algumas exceções); capacidade de armazenar glicogênio, e dentre outras, permitiu a sua classificação em um reino à parte denominado *Fungi*. Esta divisão está delimitada atualmente com base em características peculiares, que incluem aspectos morfológicos (macroscópico, microscópico e ultramicroscópico), bem como fisiológicos (Figura 1). Apesar de muitas estruturas fúngicas serem similares às dos animais, com os quais o reino está mais relacionado filogeneticamente, outras apresentam variações e outras ainda, são exclusivas dos fungos (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

Os fungos são organismos eucarióticos, com núcleo bem definido circundado por uma membrana nuclear, uma membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis; parede celular, mitocôndrias, complexo de Golgi, ribossomos ligados ao retículo endoplasmático e um citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários (SCHAECHTER et al., 2002).

Por não possuírem pigmentos fotossintéticos, não são capazes de absorver energia luminosa e utilizá-la para a síntese de compostos orgânicos, classificando-se como seres heterotróficos, pois aproveitam a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes (SIDRIM et al., 2010).

Essas descrições demonstram que esses microrganismos possuem células tão semelhantes às hospedeiras que é difícil elaborar estratégias terapêuticas específicas dirigidas contra o parasita e atóxica para o hospedeiro (SCHAECHTER et al., 2002).

Figura 1: Representação de fungos filamentosos (A) e leveduriformes (B).



Fonte: UFPA, 2007; UNICAMP, 2015.

3.2 Micoses

As micoses podem ser classificadas, segundo os tecidos e órgãos atingidos, em: micoses superficiais, de localização nas camadas mais superficiais da pele ou dos pelos; micoses cutâneas ou dermatomicoses, localizadas na pele, no pelo ou nas unhas; micoses subcutâneas; micoses sistêmicas ou profundas atingindo principalmente, órgãos internos e vísceras, e as micoses oportunistas que atingem os pacientes imunocomprometidos por doenças de bases, como câncer, diabetes, ou aqueles que são submetidos a tratamentos com uso de corticoidoterapia, imunossupressores e antibioticoterapia (SIDRIM et al., 2010).

As micoses superficiais são infecções ocasionadas por microrganismos da microbiota normal ou adquiridas através do meio ambiente, promovendo infecções leves agudas ou crônicas, com resposta inflamatória mínima ou ausente. A infecção é geralmente cutânea e restrita às camadas cornificadas não vivas, e os locais mais acometidos são os pés, unhas, virilha, pele e couro cabeludo (COSTA et al., 1991).

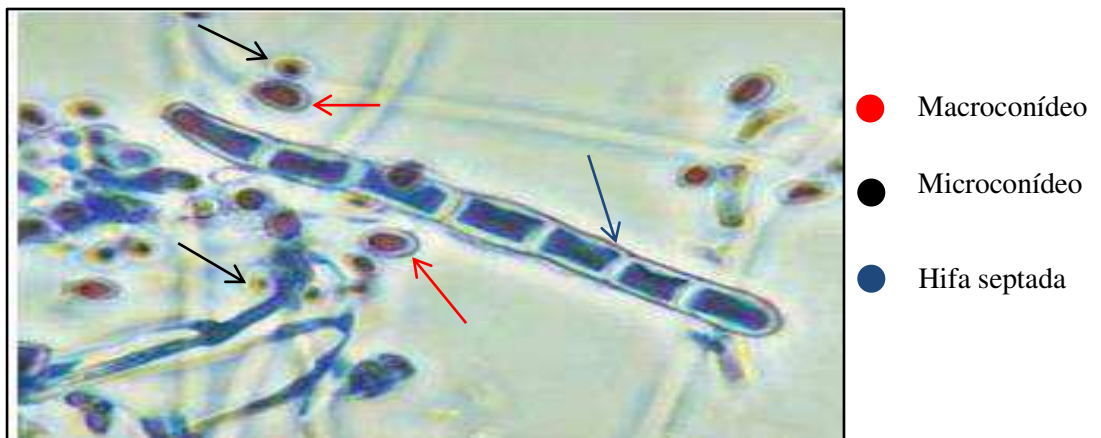
A transferência de organismos infectados do solo para animais ou seres humanos se dá por meio de artrósporos, escamas de pele ou pelos, não sendo absolutamente, necessário o contato direto (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

3.3 Dermatófitos/Dermatofitoses

As infecções que afetam à humanidade, particularmente, as que atingem os tecidos queratinizados são prevalentes em todo o mundo, geralmente ocasionadas por dermatófitos e restritas à camada córnea. A existência de fungos queratinofílicos saprófitas teve início no período mesozóico, onde podem ser referidas em espécies zoofílicas e com posterior adaptação, passando a ser antropofílicas.

Os dermatófitos são fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pelos e/ou estrato córneo de homens e animais (COELHO et al., 2008). Suas estruturas podem ser demonstradas na figura 2.

Figura 2: Macroconídio e alguns microconídios, seguidos de hifas septadas de *Trichophyton rubrum* var. *rodhaini*



Fonte: ARAÚJO et al., 2003.

De acordo com a predileção ecológica quanto à adaptação ao meio ambiente, podem ser divididos em três grandes grupos, sendo classificados como: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (SIDRIM et al., 2010)

Os dermatófitos compreendem cerca de 45 espécies enquadradas em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. O gênero *Epidermophyton* apresenta uma única espécie de importância: *E. floccosum*. O gênero *Microsporum* compreende espécies de importância clínica, como *M. canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. cookei* e *M. nanum*. O gênero *Trichophyton* tem por espécies de maior importância clínica o *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum* e *T. verrucosum* (SANTOS et al., 2002).

As Dermatofitoses (tinea ou micose) do couro cabeludo, pele glabra, e unhas são causadas por um grupo estreitamente relacionado de fungos, conhecidos como dermatófitos que têm a capacidade de utilizar queratina como uma fonte de nutrientes, isto é, têm uma capacidade enzimática (por meio de queratinase) de degradar a queratina (ELLIS, 2015). Ao contrário das micoses superficiais as micoses cutâneas, representadas pelas dermatofitoses, afetam as camadas epidérmicas mais profundas, destruindo mais os tecidos e produzindo sintomas (ARAÚJO, 2008).

3.4 Características clínicas

A gravidade das manifestações clínicas pode variar de moderada a severa e depende mais do estado imunitário, da sensibilidade do hospedeiro a esses infectantes, do que da virulência da espécie ou linhagem do dermatófito em si, além do sítio anatômico da infecção e de outros fatores ambientais locais (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; MORAES et al., 2002). A doença é uma consequência da reação do hospedeiro aos produtos metabólicos do fungo, mesmo no nível da derme, e, em geral, não apresenta invasão dos tecidos subepidérmicos por parte do parasito. Tal reação manifesta-se, primeiramente, com um aspecto eczematiforme das lesões, e seguida uma reação alérgica e inflamatória (ARAÚJO, 2008).

Em raras ocasiões, os dermatófitos invadem as camadas mais profundas, não queratinizadas, da pele ou, mesmo, a hipoderme, onde despertam uma resposta aguda, com formação de abscessos, que pode dar lugar a uma inflamação granulomatosa de tipo corpo estranho (MORAES et al., 2002).

Há duas formas de classificação clínica das dermatofitoses: uma que segue a corrente inglesa e que denomina todas as infecções de *tinea* (em latim), associada à outra palavra (também em latim), que aponta o sítio anatômico da lesão. Já a outra classificação clínica segue a corrente francesa e classifica as dermatofitoses em tinhas ou *tinea* (qualquer lesão dermatofítica que acomete o couro cabeludo e/ou região de barba e bigode); epidermofitíase (lesão dermatofíticas encontradas em região de pele glabra); e onicomicose dermatofíticas (lesões em unhas); e por último, as dermatofitoses subcutâneas e profundas (lesões que acometem o espaço celular subcutâneo ou outros órgãos profundos, correlacionadas geralmente com pacientes acometidos por doenças de bases (SIDRIM et al., 2010).

3.5 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos indicam que as dermatofitoses estão entre as doenças de maior incidência no mundo, sendo considerado o terceiro distúrbio de pele mais comum em crianças menores de 12 anos e o segundo em população adulta (BRILHANTE et al., 2000; RUIZ; ZAITZ, 2001; PERON et al., 2005).

Vários motivos são apontados para explicar o aumento da incidência destas infecções nas últimas décadas, entre eles: o uso abusivo de antibióticos, drogas imunossupressoras e

citostáticas, bem como o aparecimento de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), os quais constituem alvo para o desenvolvimento das dermatofitoses. Desse modo, os dermatófitos, como patógenos clássicos das camadas superficiais da pele, têm tido maior possibilidade de causar processos infecciosos, tornando-se o grupamento de fungos mais isolados em patologias humanas. Acredita-se, com base em uma prevalência estimada, que 10-15% da população mundial pode ser infectada no decorrer de sua vida (SIDRIM et al., 2010).

As condições climáticas favoráveis à implantação das dermatofitoses são observadas em diversas regiões do mundo. A maioria dessas infecções encontra-se primariamente concentrada em regiões tropicais, onde persiste um clima tropical úmido, causando relevante problema de saúde pública (CHIMELLI et al., 2003).

São infecções de variações regionais marcantes, no que diz respeito a tipos e frequência das espécies isoladas. A literatura mundial aponta o *T. rubrum*, *T. violacium* e o *T. mentagrophytes* como as espécies de dermatófito mais comumente isoladas. Estudos de incidência de dermatofitoses na região Sul e Sudeste do Brasil aponta o *T. rubrum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, respectivamente, como as três espécies mais prevalentes. Na região nordeste foi apontado o *T. tonsurans*, seguido de *T. rubrum* e *M. canis*. (SIDRIM et al, 2010). Na capital paraibana, as espécies mais envolvidas em dermatofitoses são os *T. rubrum*, seguido pelo *T. tonsurans*, *M. canis*, e *T. mentagrophytes* (AQUINO et al., 2003; JAWETZ et al., 2005).

Desta forma, a distribuição geográfica dos dermatófitos se mostra bastante variável; são ubiqüitários, não havendo área ou grupo de pessoas que se encontrem isoladas desses fungos, enquanto alguns são cosmopolitas, sua distribuição depende dos seguintes fatores: adaptação ao meio ambiente, deslocamentos humanos, convívio com animais domésticos, aspectos sócio econômicos, sexo, idade, e imunidade dos hospedeiros, promovendo assim, variações no espectro desses fungos, de região para região, fazendo-se inquestionável a necessidade e desenvolvimento de pesquisas epidemiológicas, clínicas e laboratoriais que confirmem dados atuais, no tocante a incidência das dermatofitoses (DIAZ et al., 1984; LIMA et al., 1999).

3.6 Patogenia

As dermatofitoses são micoses cutâneas, caracterizadas por lesões pruriginosas, descamativas, vesiculosas ou supurativas. Apresentam-se como lesões únicas ou múltiplas e, caso negligenciadas evoluem de forma lenta e progressiva, podendo ocorrer disseminação para outras localidades do corpo em virtude da auto inoculação ou pode aparecer novas lesões por reinfecções devido a continuidade do foco infeccioso (PEREIRA, 2012) (Figura 3). A remissão total das dermatofitoses é rara, por isso é necessário instaurar tratamento adequado com o desenvolvimento de fármacos de aplicação tópica.

Para que ocorra o estabelecimento de uma infecção, os esporos viáveis ou os conídios penetram a pele favorecido por uma lesão cutânea ou escoriação preexistente e, através de estímulos químicos, germinam e produzem hifas artrospóricas, que proliferam através do estrato córneo e invadem a queratina. Este processo pode desencadear-se relativamente rápido (6 horas) e os esporos podem encontrar-se viáveis no ambiente entre seis e doze meses. Existem casos em que, consoante às condições, permanecem mais tempo.

Quando um fungo estabelece residência podem ocorrer duas situações: ou não produz lesões detectáveis (portadores assintomáticos), ou causa lesões clinicamente compatíveis (SPARKES et al., 1994; MORIELLO, 2001). Mas nem sempre ocorre infecção. Os fungos podem ser eliminados por via mecânica, ou simplesmente não estabelecer qualquer resistência, por incapacidade de competir com a flora residente (CONNOLE, 1999; MORIELLO, 2001).

Figura 3: Dermatofitose, apresentando lesão circular eritematosa com borda papulovesicular, ligeiramente elevada (A). Lesão superficial ocasionada por dermatófitos (B).



Fonte: Maciel, 2005; Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2015.

3.7 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico das dermatofitoses, assim como de outras infecções fúngicas, passa por três fases distintas: a pré-analítica, quando é feita a indicação e a coleta do material clínico; a analítica, na qual o exame é realizado no laboratório e o resultado final é emitido e a pós-analítica, na qual se estoca o patógeno em questão para estudos futuros. Uma coleta bem feita é imprescindível para um diagnóstico correto (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al, 2010).

As manifestações clínicas desse grupo de micoses dependem da hipersensibilidade retardada, mediada por linfócitos CD4, que pode ser avaliada pelo teste intradérmico de tricofitina. É importante ressaltar que existe um fator fungistático natural; fator esse que impede a penetração no organismo para áreas mais profundas da pele e para outros órgãos. Desta forma, as mucosas raramente são atingidas pelos dermatófitos (RAMOS-SILVA, 1995). Resultando em uma lesão cutânea de contorno arredondado em qualquer parte do tegumento cutâneo em combinação da destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória, mais ou menos intensa, na dependência do binômio parasito/hospedeiro (SIDRIM et al., 2010).

O diagnóstico das dermatofitoses pode ser executado pela inspeção indireta do estrato córneo da pele ou das lesões cutâneas utilizando-se da radiação UV (Lâmpada de Wood); exame microscópico direto do material coletado de crostas clarificadas pelo KOH (10%); e preferencial e eletivamente, pelo cultivo em meios específicos (Saboraud, Mycosel), acrescidos de impedientes de crescimento de contaminantes e suplementados com niacina (T-5), tiamina e inositol (T-3), e em distintas temperaturas na dependência da espécie fúngica em suspeita (GHENOV, 2014).

Os diagnósticos das dermatófitos, por auxílio do exame com lâmpada de Wood (luz ultravioleta filtrada através de um vidro que contém cobalto ou óxido de níquel, com $\lambda=396$ nm), devem ser usados apenas como um teste de triagem, por gerar falsos negativos, uma vez que o único dermatófito que produz o triptofano é *M. canis* e destes apenas 50% apresentam fluorescência, assim este teste apresenta baixo índice de positividade. A ocorrência de falsos positivos também é possível, havendo fluorescência em resquícios de substâncias como álcool, éter e xampus contendo derivados de iodo e mercúrio (CARLOTTI; BENSIGNOR, 1999).

Segundo Ferreira et al. (2006), as amostras para pesquisa de dermatófitos devem ser obtidas por raspagem superficial da possível região anatômica infectada com bisturi

esterilizado, após antissepsia local com gaze embebida em álcool 70%. O exame micológico direto de todos os materiais coletados deve ser realizado com hidróxido de potássio (KOH) 30% acrescido de tinta Parker Quink, de cor negra, na proporção de três partes de KOH e uma de tinta (3:1) (PRADO et al., 2007).

O isolamento de dermatófitos das amostras é executada em Ágar Sabouraud Dextrose, contendo 50 mg/mL de cloranfenicol (0,05 g da droga na solução total), e em Ágar Mycosel, sob a incubação há 30°C, por um período de 5 dias a 6 semanas a uma temperatura de 25°C a 37°C, proporcionando as características de crescimento morfofuncionais do microrganismo (SIDRIM et al., 2010).

A identificação dos gêneros e espécies é realizada de acordo com as características macro e microscópicas das colônias, tais como: base do relevo da colônia, textura, presença ou ausência de pigmentos, dentre outros (PEREIRA, 2012). A taxonomia dos dermatófitos e sua identificação rotineira em laboratórios de micologia clínica baseiam-se fundamentalmente em critérios morfológicos, macroscópicos e microscópicos, relacionados com a fase assexuada (anamórfica, imperfeita) (SAENZ, 2001).

Portanto, a identificação final é feita através de provas bioquímicas e fisiológicas, adequadas para cada espécie fúngica, tais como: a prova de requerimentos vitamínicos (tiamina, ácido nicotínico, histidina, inositol), o teste da urease, o microcultivo em ágar batata e o teste de perfuração de pelo *in vitro* (BRILHANTE et al., 2005).

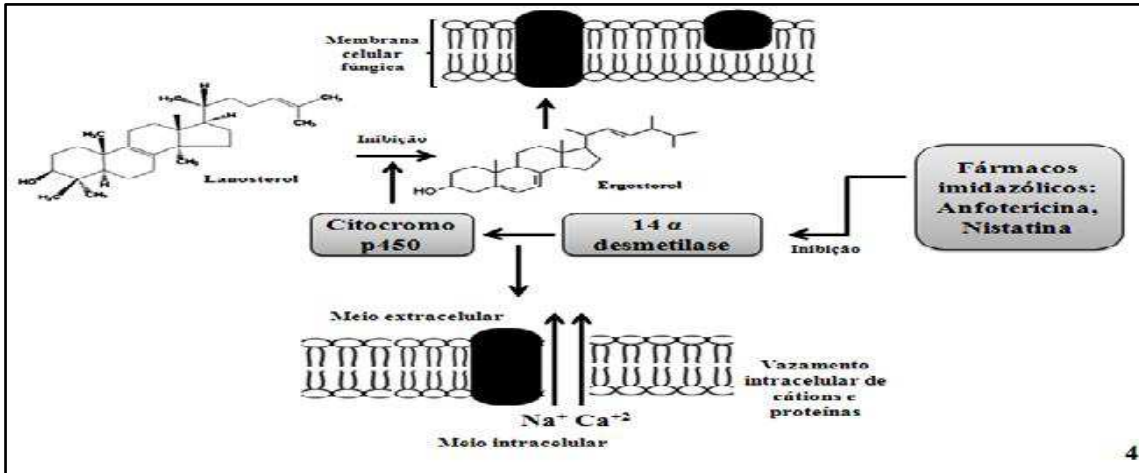
3.8 Tratamento

O tratamento para as infecções fúngicas superficiais, nem sempre é simples, devido a dificuldades na escolha dos esquemas terapêuticos disponíveis na literatura, assim como, suas possíveis interações medicamentosas e efeitos colaterais (DIAS et al., 2013). Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina).

Esses fármacos inibem, de forma não competitiva e reversível, enzimas que participam das etapas finais da biossíntese do ergosterol, resultando em modificações na permeabilidade da membrana fúngica, exercendo um efeito fungistático. Já em relação à fluocitosina e a griseofulvina, estes afetam o sistema microtubular dos fungos, o fuso mitótico e os

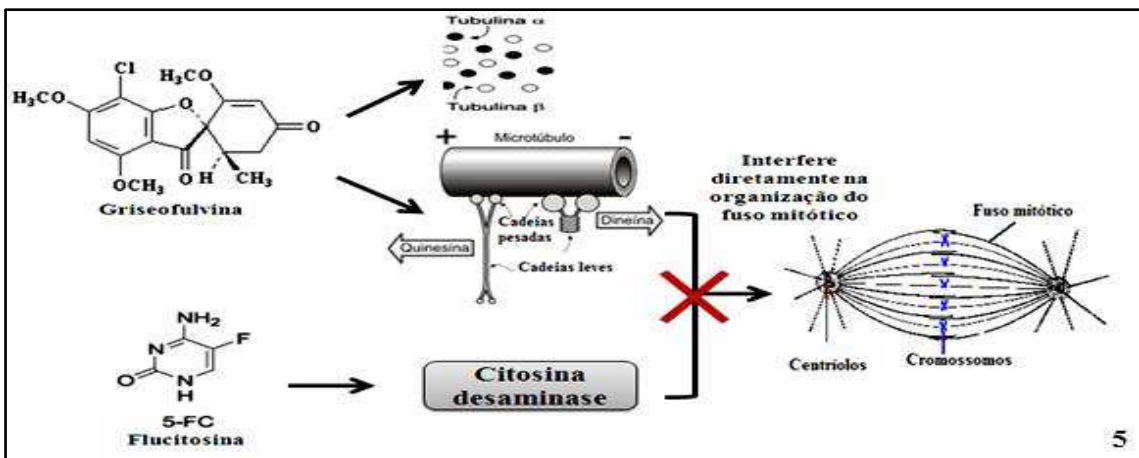
microtúbulos citoplasmático, exercendo ação fungicida, devido sua ação na síntese do ácido nucleico (LACAZ; NEGRO, 1991), estes estão representados nas figuras 4 e 5.

Figura 4: Ação de fármacos antifúngicos sobre a síntese de ergosterol na membrana celular fúngica.



Fonte: Pesquisador, 2015.

Figura 5: Mecanismo de ação de antifúngicos que interferem na separação dos cromossomos.



Fonte: Pesquisador, 2015.

No final das décadas de sessenta e setenta, a descoberta de derivados imidazólicos com atividade antifúngica foi um marco importante no tratamento de micoses superficiais, devido à sua elevada eficácia e relativa toxicidade, bem como atividade imunomoduladora. A eficácia dos agentes tópicos de ação superficial depende não só do tipo de lesão, mas de vários aspectos, a citar: mecanismo de ação do fármaco, a viscosidade, hidrofobicidade e a acidez da formulação (SILVA, 2002).

O tratamento das dermatofitoses tem sido aprimorado acentuadamente nos últimos anos com o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos de aplicação tópica exercendo ações fungistáticas ou fungicidas, direta ou indiretamente (PEREIRA, 2012). A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de medicamentos antibacterianos disponíveis (NOBRE et al., 2002). Como consequência das infecções por fungos representarem o parasitismo de um organismo eucariótico sobre outro eucariótico (homem e animal), com diferenças fisiológicas muito pequenas, quando comparado a infecções bacterianas, é necessário que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais importantes (LACAZ; NEGRO, 1991).

3.9 Resistências aos antifúngicos

Nas últimas décadas tem se observado um aumento mundial na incidência de infecções fúngicas, bem como um aumento na resistência de algumas espécies de fungos, frente à ação de alguns medicamentos disponíveis na prática clínica (AMARAL; BARA, 2005; ZANARDI et al., 2008).

Diante da problemática anteriormente apresentada, uma estratégia mais racional de tratamento poderia ser a redução de dose dos compostos atuais por combinação com novos compostos com atividade antifúngica. O desafio tem sido o de desenvolver estratégias eficazes para o tratamento de infecções fúngicas, considerando o aumento do número de pacientes imunocomprometidos e o uso indiscriminado de antimicrobianos.

A maioria dos antifúngicos clinicamente utilizados tem vários inconvenientes em termos de toxicidade, eficácia e custo, e sua utilização frequentemente leva ao aparecimento de espécies resistentes. Assim, existe uma grande demanda por novas estratégias terapêuticas de diferentes classes estruturais, agindo seletivamente sobre novas metas, com menos efeitos colaterais (ABAD, 2007).

3.10 Plantas medicinais com atividade antimicrobiana

As plantas medicinais são as mais antigas fontes de compostos farmacologicamente ativos e praticamente a única fonte de compostos medicinais por séculos (SOUSA et al.,

2007). A humanidade utiliza as plantas desde antes de cristo, primeiro em uma relação de consumidor e mais tarde para a cura de suas diversas enfermidades. Iniciada antes da medicina moderna, a medicina tradicional é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como sendo a soma de todos os conhecimentos teóricos e práticos, explicáveis ou não, utilizados para diagnóstico, prevenção e tratamentos físicos, mentais ou sociais, baseados exclusivamente na experiência e observação e transmitidos verbalmente ou por escrito de uma geração a outra, perpetuando os ensinamentos (PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2004).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO; SILVA, 2006). Simões et al. (2004), relatam que apenas 8% desse percentual biológico foi estudado em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Dessas 590 plantas forma registradas no Ministério da Saúde para comercialização. Os produtos naturais são protótipos atraentes para fins terapêuticos, devido ao seu amplo espectro de atividade biológica (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Muitas plantas são geralmente usadas na medicina popular como agentes antimicrobianos e antifúngicos, além disso, o descobrimento e síntese de novos fármacos de origem natural com alto efeito antifúngico e baixa toxicidade tornaram-se foco de pesquisas farmacêuticas (JIANHUA; HAI, 2009). Estratégias como essas podem contribuir na redução dos índices de morbidades, promovendo uma melhor adesão ao tratamento e no estado de saúde dos pacientes que sofrem com o uso da terapêutica atual.

3.10.1 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze/ chá preto

A planta *Camellia sinensis* pertence à família Theaceae, se apresenta na forma de arbusto ou árvore. As folhas são oblongas, lustrosas, escuras, com nervuras nas superfícies, margens serradas e texturas coriáceas, sendo as folhas mais novas coberta de tricomas brancos. Suas flores são pequenas e surgem nas axilas das folhas com pétalas brancas (FERRARA et al., 2001), como evidenciado na figura 6. A planta é originária da China e Índia, difundida para o Japão e, sem seguida, para Europa e Rússia, chegando às Américas no século XVII, sendo atualmente cultivadas em mais de 45 países, sobre tudo em áreas tropicais e subtropicais, onde apresenta seu melhor desenvolvimento (ANDENBERGUE; VLIETINCK, 1991; WEISBURGER, 1997).

Figura 6: Fotografia do arbusto florido da *C. sinensis* (L.) Kuntze

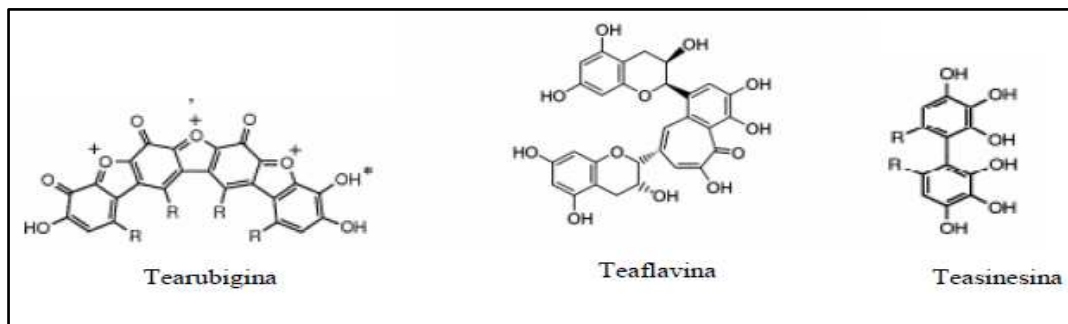


Fonte: Universidade Estadual do Mississippi, 2015.

As três variedades da planta são a *Camellia sinensis*. Var. *sinensis*, *Camellia sinensis*. Var. *assamica* e *Camellia sinensis* Var. *cambodiensis*. A primeira tem seu predomínio na China, Tailândia e Japão, a segunda predomina no sul e sudeste da Ásia, bem como, na Austrália e a última não é usada comercialmente para preparação do chá (WEISBURGER, 1997). Os componentes químicos das folhas da *C. sinensis* são bem variados, entre os quais destacamos: polifênois (catequinas e flavonóides), alcaloides (cafeína, teofilina e teobromina), óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lipídeos, vitaminas (vitamina C), elementos inorgânicos (alumínio, flúor e manganês), dentre outros, sendo que muitos dos efeitos benéficos dos chás são atribuídos aos compostos fenólicos (PAGANINI-COSTA.; CARVALHO DA SILVA, 2011).

O chá preto é obtido pela fermentação completa das catequinas pela enzima polifenoloxidase, que resulta em dímeros e polímeros, das catequinas monoméricas constituídas de teoflavinas, teasinesinas e tearubiginas (Figura 7), processo conhecido como escurecimento enzimático (PEREIRA et al.,2014).

Figura 7: Dímeros das catequinas monoméricas

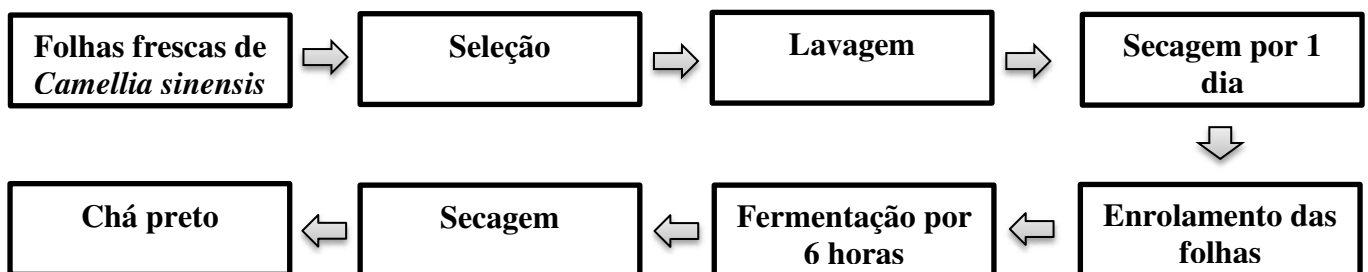


Fonte: HASLAM, 2003

As etapas, conforme representado na figura 8, consiste em deixar as folhas espalhadas em prateleiras durante um dia, para reduzir sua umidade. Ao final desse processo, as folhas apresentam-se macias o suficiente para serem enroladas no formato de pequenas bolas (PEREIRA et al., 2014).

Portanto, o rompimento das estruturas celulares das folhas permite a liberação das enzimas, contribuindo assim para as reações químicas existentes na erva (PAGANINI-COSTA.; CARVALHO DA SILVA, 2011).

Figura 8: Etapas do processamento da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, para obtenção do chá preto.



Fonte: PAGANINI-COSTA; CARVALHO DA-SILVA, 2011.

3.11 Controle da Qualidade de Drogas Vegetais

O aumento do consumo de plantas medicinais pela população mundial tem se resultado em preocupação com a qualidade de tais produtos, devido aos problemas comumente encontrados, o que contribui para um produto de má qualidade (CARVALHO et al., 2008.; SILVEIRA et al., 2008).

O controle de qualidade das drogas vegetais é imprescindível, pois muitas espécies vegetais são vendidas sem nenhuma garantia de qualidade, o que favorece desde a venda de espécies falsificadas até o armazenamento inadequado da planta medicinal durante a sua comercialização (MOUCO et al., 2003). O cultivo, a coleta e os métodos de secagem das plantas raramente são padronizados. A difusão de espécies medicinais realizada por pessoas pouco especializadas, os “mateiros” ou “raizeiros”, é livre e promove muitas vezes, trocas ou até substituições de plantas (DELAPORTE et al., 2002; HOFFMAN et al., 2011).

Diante disso, a crescente necessidade de inspeção desses produtos, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) reunir procedimentos no documento *Quality control methods for medicinal plant materials*, que podem ser tomados como base para que auxiliem as nações, a partir de sua legislação, formar padrões de controle de qualidade de drogas vegetais e produtos (WHO, 1992). Já em 2005, houve revisão do guia com adequação para a detecção e quantificação de alguns contaminantes e resíduos em plantas medicinais (WHO, 2005).

No Brasil, a quinta edição da Farmacopéia (2010), junto com outras literaturas não oficiais, como o livro organizado por Simões et al (2010), contêm parâmetros semelhantes aos da OMS para verificação da identidade e controle de qualidade de drogas vegetais (PIETRO et al., 2010).

Portanto, torna-se, então, necessária a realização do controle de qualidade das matérias-primas vegetais, visando à obtenção de produtos padronizados, eficientes e seguros, segundo as normas estabelecidas por legislações específicas.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 Obtenção das amostras vegetais

A droga vegetal em sachê foi adquirida em comércio local em Cuité-PB/Brasil, localizado na microrregião do Curimataú Ocidental paraibano, com latitude de 06° 29' 01", longitude -36° 09' 13" e altitude de 649 metros. Os chás foram comprados embalados, de uma determinada marca como referência. Foram obtidas quatro embalagens de determinada marca como referência pronta para o consumo, onde cada uma possuía 10 unidades, todas foram adquiridas no mês de Novembro de 2014. No momento da aquisição foram observados alguns aspectos como prazo de validade, integridade da embalagem e condições de armazenamento desses produtos.

A amostra vegetal a granel foi obtida em um estabelecimento hortifruti na cidade de Nova Floresta-PB/Brasil, também situada na microrregião do Curimataú Ocidental Paraibano. Situado a 660 metros de altitude, com coordenadas geográficas: latitude: 6° 27' 17" ao Sul e longitude: 36° 12' 11" ao Oeste. Neste estabelecimento foi adquirido cerca de 800 gramas da droga vegetal, onde após aquisição foi cuidadosamente armazenada e protegida contra umidade e luminosidade.

4.1.2 Obtenção das amostras biológicas

As amostras de microrganismos utilizadas foram obtidas do laboratório de microbiologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade de Campina Grande- *Campus Cuité*. Foram utilizadas duas cepas de dermatófitos, *Trichophyton rubrum* - 305 e *Trichophyton rubrum* - 498, como demonstrados na figura 9.

Figura 9: Colônias de *Trichophyton rubrum*, com textura algodona e relevo apicado e radiado. Colônias de *T. rubrum* com textura furfurácea.



Fonte: Pesquisador, 2015.

4.1.3 Substância teste de referência

Foi utilizado o Cetoconazol, como substância química de referência, com teor de pureza estimado em 99,56%, identificado pelo número de lote KE10014, ponto de fusão 149 °C e perda por secagem de 0,11%, cedido gentilmente pela Farmácia Escola Manuel Casado da Universidade Federal de Campina Grande, *Campus Cuité-Paraíba/ Brasil*.

4.1.4 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram o meio Ágar Sabouraud dextrose (ASD) e o meio líquido caldo sabouraud dextrose (CSD), ambos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

4.2 Métodos

4.2.1 Análises físico-químicas

4.2.1.1 Determinação dos teores de umidade.

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira (2010). As amostras foram trituradas até a formação de um pó fino. Em seguida, suas massas (~2 g) foram pesadas em papel de filtro quantitativo, utilizando balança analítica modelo: EDUTECH®-EEQ9003F-B. Em seguida, as amostras foram transferidas para cadinhos previamente tarados e dessecados por 60 minutos e resfriados em dessecador por 30 minutos.

Esse procedimento foi realizado distribuindo o material de maneira uniforme sobre o cadinho. Após a pesagem, as amostras foram colocadas em estufa à temperatura de 100°C por 5 horas. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador foram submetidas à nova pesagem até a obtenção de massa constante. A porcentagem da perda por dessecação foi obtida pela média de três determinações, conforme a equação 1.

$$\frac{(P1 - P2)}{P3} \times 100 \quad (1)$$

Onde: P1= peso do pesa filtro, contendo a amostra antes da dessecação; P2= peso do pesa filtro, contendo a amostra após a dessecação; P3= peso da amostra x 100%.

4.2.1.2 Determinação dos teores de cinzas totais

A determinação quantitativa das cinzas totais foi realizada também de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira (2010). Para isso foram pesados, (~ 2 g) do pó do chá preto pulverizado (a granel e sachê) e em seguida, transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram submetidas ao processo de incineração através de um gradiente de temperatura (30 minutos a 200°C , 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C).

Após esta etapa procederam-se as porcentagens de cinzas em relação ao pó que foi submetido ao processo de secagem. Essas medidas, também foram realizadas pela média de

três determinações para à amostra. Os resultados numéricos obtidos são determinados utilizando-se a fórmula descrita na Equação 2.

$$\frac{100 \times N}{P} \quad (2)$$

Onde: N= número de gramas de cinzas da amostra/ Peso inicial da amostra x 100%.

4.2.1.3 Determinação dos teores de cinzas insolúveis em ácido

A determinação de cinzas insolúveis em ácido foi realizada de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira (2010). Inicialmente foi realizada a fervura do resíduo obtido na determinação de cinzas totais durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (v/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. Em seguida, o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. Logo após foi recolhido o resíduo, insolúvel em ácido, sobre papel de filtro quantitativo, isento de cinzas, lavando-o com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro.

Imediatamente, foi realizada a transferência do papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, seco sobre chapa quente e incinerado a cerca de 500°C até obtenção de massa constante. Posteriormente foi calculado a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar, pela média de 3 determinações. Conforme equação 3.

$$\frac{100 \times N}{P} \quad (3)$$

Onde: N= cadinho cheio de cinzas-cadinho vazio e P= peso inicial da amostra x 100 %.

4.2.1.4 Determinação teor de resíduo seco

A determinação do teor de resíduo seco foi realizada, com uma alíquota de 2,0 mL da solução extrativa, as quais foram exatamente pesadas em pesa-filtro, previamente arrefecidos e tarados. Posteriormente, estes foram submetidos à estufa por 1 hora à temperatura de aproximadamente 100°C, resfriados em dessecador e pesados. O processo foi repetido entre

intervalos de 30 minutos, até obtenção de massa constante (DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1994).

Os resultados foram expressos partir da equação 4, em relação a 2,0 mL do infuso, pela média de três determinações.

$$\frac{100 \times N}{A} \quad (4)$$

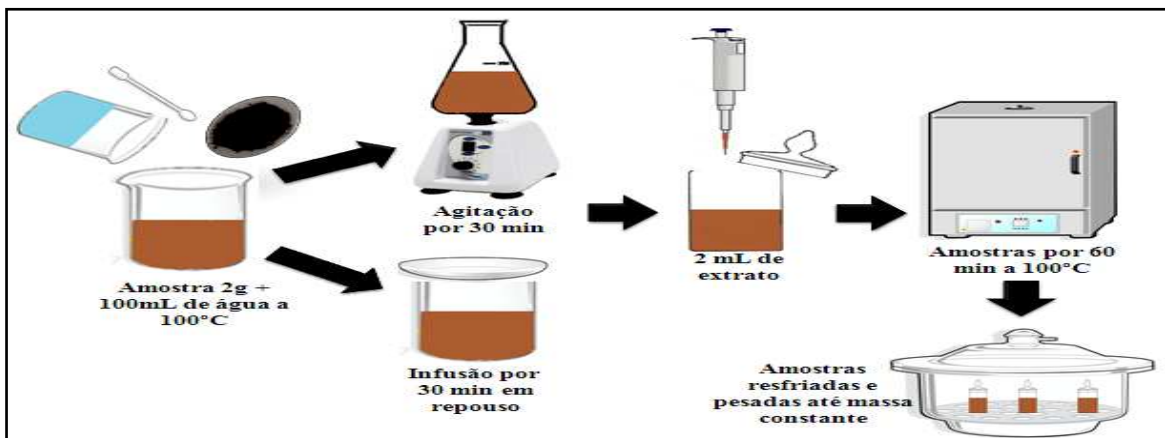
Onde: N= número de gramas do resíduo seco e A= número de mililitros (mL) das amostras x 100%.

4.2.1.5 Obtenção das soluções extrativas (Infusos)

Desde sua obtenção até o final dos experimentos propostos foram utilizados chás de mesmo lote, ficando os sachês armazenados em suas respectivas embalagens originais ao abrigo da luz e umidade, assim como a amostra a granel.

Cada amostra de aproximadamente 2,0 g foi preparada separadamente, realizados em triplicata sob a forma de infusão, sem agitação e com agitação, onde foram adicionados 100 mL de água destilada em ebulição, em béqueres e posteriormente abafados com auxílio de vidro de relógio e em erlenmeyer com 100 mL, respectivamente, que teve sua “abertura” tampada por papel alumínio, permanecendo em infusão por 30 minutos, no escuro, com auxílio de agitador vórtex, como esquematizado na figura 10.

Figura 10: Fluxograma de obtenção de resíduo seco



Fonte: Pesquisador, 2015.

4.2.1.6 Testes de susceptibilidade ao Cetoconazol

Os testes descritos na Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002), indica que as CIMs do cetoconazol contra fungos dermatófitos variam na concentração de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$.

Desta forma, para preparar uma série de microdiluições em caldo para os testes, contendo um fármaco insolúvel em água, mas que pode ser dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO), pesou-se primeiro 4,8 mg (assumindo uma potência de 100%) do pó de agente antifúngico, o qual foi dissolvido em 3,0 mL de DMSO. Isso resultou em uma solução padrão de 1.600 $\mu\text{g/mL}$.

Em seguida, procedeu-se uma diluição dessa solução padrão, onde foram adicionados 100 μl em meio Caldo Sabouraud Dextrose, equivalente a um volume de 4,9 mL, diluída na razão de 1:50 obtendo assim uma concentração final de 32 $\mu\text{g/mL}$. Logo, quando inoculados, no primeiro poço da microplaca a uma razão 1:2 foi obtida uma concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, foram realizadas as diluições de 16 $\mu\text{g/mL}$ até 0,03 $\mu\text{g/mL}$, assim como, preconizado pela Clinical Laboratory Standards Institute, 2002 (CLSI, 2002).

4.2.1.7 Determinação da atividade antifúngica

Todas as cepas foram previamente inoculadas em ágar Sabouraud dextrose e incubados a $27^{\circ}\text{C}\pm 2$ por sete dias antes da realização dos ensaios. As suspensões dos microrganismos foram preparadas, cobrindo as colônias de *Trichophyton rubrum* com aproximadamente 1 mL de solução fisiológica estéril a 0,85%. A suspensão resultante foi submetida à agitação, em agitador vórtex durante 15 segundos e a densidade celular foi padronizada em solução salina visualizado à turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland e então confirmado espectrofotometricamente com comprimento de onda de 530 nm até uma turbidez de 70% de transmitância.

Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de dermatófitos contendo 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL). A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se inicialmente uma diluição 1:10, onde 100 μL do inóculo foram diluídos em 1 mL de solução salina estéril, obtendo uma concentração de 1×10^5 . Portanto, dessa última suspensão padrão retirou-se 10 μL , procedendo-se a uma diluição 1:10 com meio líquido Caldo Sabouraud dextrose (CSD). A concentração final após inoculação no teste é esperada

na proporção de $4,7 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/mL, conforme preconizado pela norma M27-A3 do CLSI, para testes realizados com fungos dermatófitos (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002).

4.2.1.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

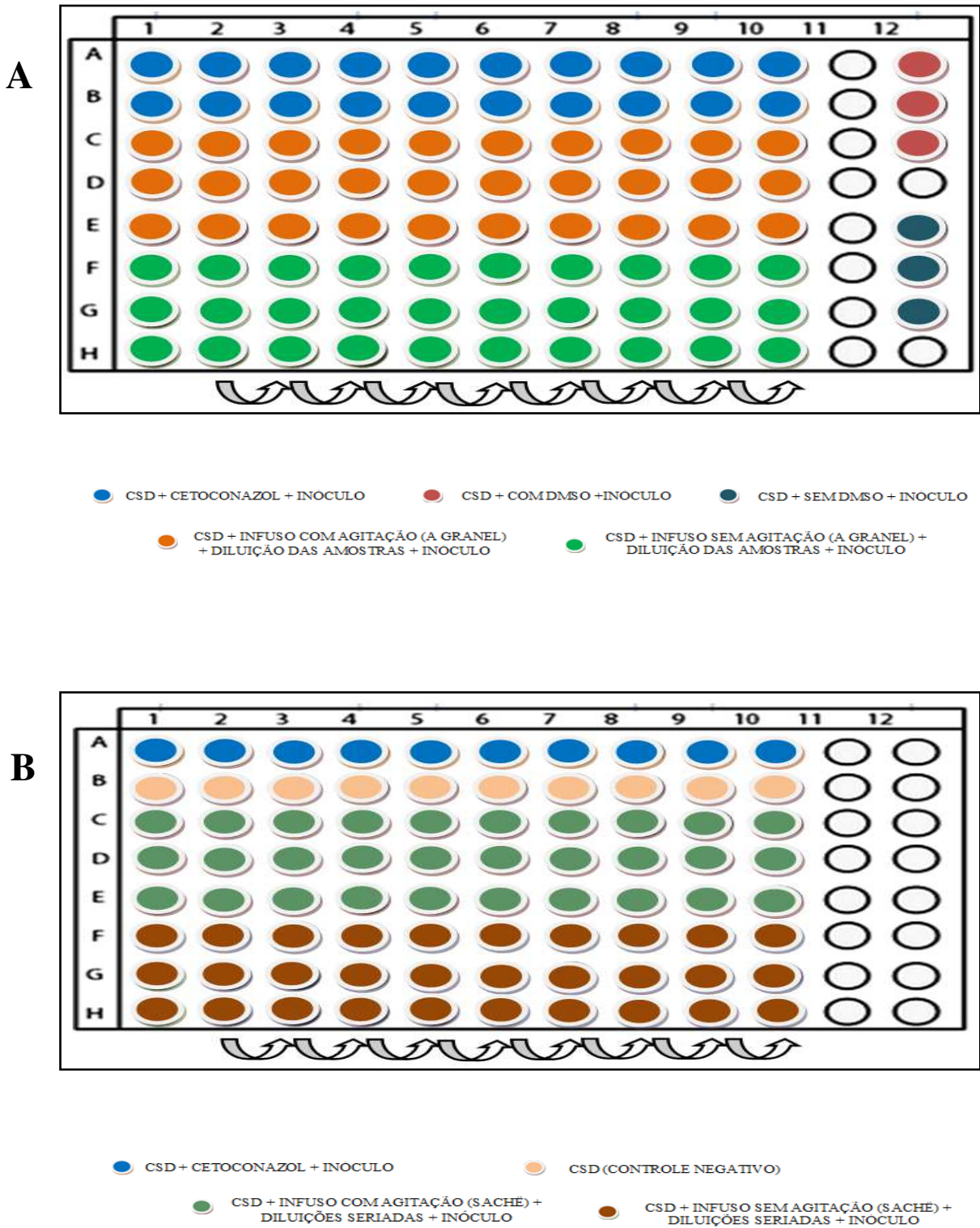
A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação, contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U”, onde todos os procedimentos foram realizados em triplicata (SOUZA et al., 2007; MOREIRA et al., 2010).

Em cada orifício da placa, excetuando-se a coluna 11 na microplaca A e na coluna 11 e 12 na microplaca B foram adicionados 100 μ L do meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), duplamente concentrado. Posteriormente, 100 μ L da solução do produto teste, foram dispensados nas cavidades das primeiras colunas das placas. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 μ g/mL até 1 μ g/mL, de modo que na primeira coluna da placa obteve a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 μ L do inóculo das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma forma de obtenção do infuso, assim, como demonstrado na figura 11.

A verificação da ausência de interferência nos resultados pelo solvente utilizado na preparação das soluções de cetoconazol, no caso o Dimetilsulfóxido (DMSO), foi realizado colocando-se nas três primeiras cavidades da coluna 12, da microplaca A, 100 μ L do caldo duplamente concentrado, 100 μ L do DMSO (concentração usada na solubilização dos produtos), e 10 μ L do inóculo, correspondente às cepas de *T. rubrum* 305 e 498. Na mesma coluna foram realizados os mesmos procedimentos, exceto os 100 μ L do DMSO.

Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foram colocados 100 μ L do CSD sem a suspensão dos fungos, na segunda linha da microplaca B. As mesmas foram seladas e incubadas 28°C para os filamentosos por até 15 dias, armazenadas em estufas bacteriológicas. Paralelamente foram procedidos experimento com o antifúngico cetoconazol.

Figura 11: Esquema da montagem de microplaca para teste antimicrobiano



Fonte: Pesquisador, 2015.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinações do Teor de Umidade

A determinação da perda por dessecação ou teor de umidade do pó de *Camellia sinensis* (sachê e a granel) demonstrou valores em torno de 11%, quando ocorreu estabilização do processo, como descritos na tabela 1. Este método está fundamentado na determinação quantitativa de substância(s) volátil(eis) de qualquer natureza eliminada(s) nas condições especificadas na monografia.

Tabela 1: Determinação do teor de umidade de amostras de *Camellia sinensis* (chá preto). Resultados expressos em média \pm Dp (n=3).

Amostras Vegetais	Teor de Umidade % (m/m)
Droga vegetal a granel	11,33 \pm 0,319
Droga vegetal em sachê	11,19 \pm 0,087

Dados determinados por triplicata

Os resultados encontrados estão de acordo com as especificações, uma vez que a Farmacopéia Brasileira (2010), preconiza um valor na faixa de 8% - 14% (m/m) para drogas vegetais. Assim como, todas as amostras avaliadas encontram-se dentro do limite de percentual de umidade permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que admite um teor máximo de 12% (m/m). Portanto, segundo essas entidades, os percentuais de água encontrados nos vegetais não seriam suficientes para promover a propagação e desenvolvimento de microrganismos (o que ocorreria somente com índice de umidade acima de 12%-14%) ou acarretaria a ação de enzimas, ocasionando possível degradação dos constituintes químicos das amostras (BELTRAME et al., 2009).

Na literatura científica, são escassos os trabalhos que avaliam este parâmetro físico-químico do chá preto (*Camellia sinensis* (L.) kuntze). Entretanto, os resultados encontrados de 11,33% (m/m) e 11,19% (m/m) para droga vegetal a granel e em sachê, respectivamente, não se enquadraram na faixa encontrada por Egan et al. (1988) que obtiveram, valores na faixa de 3,9% a 9,5% (m/m). Os índices superiores ao permitido, com relação ao teor de umidade nos produtos avaliados, se devem possivelmente ao limite da vida-de-prateleira desses produtos desidratados que pode ser estabelecido em função do teor de umidade. O uso de um material de embalagem com baixa taxa de permeabilidade ao vapor d'água mantém o

nível de umidade aceitável e conseqüentemente não modifica significativamente o valor de atividade de água do produto (BERTÉ et al., 2006).

Desta forma, a água residual encontrada na droga vegetal seca, pode sugerir como são suas condições do local de cultivo, adubação, período de colheita, idade da planta, secagem, processo fermentativo, armazenamento e transporte, quando excede o limite preconizado pode acarretar na perda dos parâmetros de qualidade da droga vegetal (GIL, 2007).

5.2 Determinação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido

Pode-se observar na Tabela 2, que os resultados obtidos na determinação do teor de cinzas totais e insolúveis em ácido, estão de acordo com os valores máximos permitidos de 8,0% (m/m) e 1,5% (m/m), respectivamente, preconizados pela portaria 519/98 para todas as amostras analisadas, excetuando-se o parâmetro da determinação de cinzas insolúveis em ácido para a droga vegetal à granel que apresentou um valor acima do especificado na monografia (BRASIL, 1988). Estes parâmetros de qualidade são importantes por indicar adulterações, pois avalia a presença de resíduos inorgânicos não voláteis como areia, pedra e terra (SONAGLIO et al., 2003; CARDOSO, 2009).

Tabela 2: Determinação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido de amostras de *Camellia sinensis* (chá preto). Resultados expressos em média \pm Dp (n=3).

Teor de cinzas totais	Valores expressos em % (m/m)	Teor de cinzas Insolúveis em ácido	Valores expressos em % (m/m)
Droga vegetal a granel	5,71 \pm 0,642	Droga vegetal a granel	1,73 \pm 0,543
Droga vegetal sachê	5,30 \pm 0,029	Droga vegetal sachê	0,85 \pm 0,122

Dados determinados por triplicata

A droga vegetal (chá preto), também demonstrou resultados semelhantes quanto a esse parâmetro avaliado, aos de Egan et al. (1998), onde os limites para o teor de cinzas totais foram de no mínimo 4,9 % (m/m) e no máximo 6,5% (m/m). A *camellia sinensis*, contém uma quantidade considerável de cinzas totais, e isso pode ser explicado, pelo elevado índice de sais inorgânicos presente no material vegetal (HANSEL et al., 1999), como condiz com os resultados obtidos.

O Instituto de Normalização e Qualidade de Moçambique determinou parâmetros aceitáveis na faixa de 4,0% (m/m) a 8,0% (m/m). Logo, os resultados obtidos para análise do

teor de cinzas totais do chá preto foram satisfatórios, o que revela pequena quantidade de substância residual não volátil para as amostras avaliadas. Entretanto, em relação ao teor de cinzas insolúveis em ácido a 7%, comparando-se com seus valores descritos de 0,1% (m/m) a 0,4% (m/m), mínimo e máximo, respectivamente, ambas as amostras analisadas (ver tabela 2), não estão em conformidades à faixa de parâmetros de 1,5% aceitáveis para o chá preto, estabelecidos pela ANVISA.

A determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico destina-se à detecção de sílica e constituintes silicosos, que em quantidade acima da estabelecida para a matéria-prima vegetal influencia negativamente na qualidade do chá, indicando uma possível adulteração do produto, mascarando a qualidade real da droga vegetal (SIMÕES, 2004; CARDOSO, 2009).

Portanto, os índices superiores ao permitido, com relação às sujidades e/ou materiais não adequados nos produtos avaliados, se devem possivelmente ao manejo, limpeza, separação inadequada e processos de adulterações (AMARAL et al., 2003; TATIANA et al., 2010). A presença desses elementos estranhos nos produtos analisados prejudica a qualidade da matéria-prima e compromete a confiabilidade do consumidor em relação a esses produtos.

5.3 Determinação do resíduo seco

O teste para determinação do teor de resíduo seco permite identificar o potencial de extração do líquido extrator, pois o que se determina na análise é a quantidade de substâncias tornadas solúveis pelo líquido extrator utilizado (BORRELA; CARVALHO., 2011). Os parâmetros da forma de preparo na extração dos sólidos totais dos infusos estão apresentados na Tabela 3.

Nesta, dentre os parâmetros avaliados, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se a erva a granel sob agitação, seguida da erva em sachê, com valores de 1,064% e 0,718% (m/m), respectivamente, quando submetida às mesmas condições.

Tabela 3: Determinação do teor de resíduo seco de amostras de *Camellia sinensis* (chá preto). Resultados expressos em média \pm Dp (n=3).

Teor de resíduo seco	Sem agitação % (m/m)	Com agitação % (m/m)
Droga vegetal a granel	0,543 \pm 0,007	1,064 \pm 0,043
Droga vegetal sachê	0,575 \pm 0,026	0,718 \pm 0,198

Dados determinados por triplicata

Resultados semelhantes foram obtidos em estudo utilizando chá verde de procedência chinesa (ASTILL et al., 2001). De acordo com Peralta et al. (2010), os melhores resultados de obtenção de sólidos solúveis de *Camellia sinensis* foram demonstrados quando essa droga vegetal a granel foi submetida a condições de extração com agitação.

Esse mesmo parâmetro de avaliação, foi apresentado por Messias et al. (2014), onde as análises de resíduo seco do chá verde evidenciaram diferenças percentuais entre os dois métodos, de modo que os processos de extração, quando submetidos a agitação apresentaram dados de 2,80%, comparando-se com o processo de repouso que foi de 2,12%, sendo assim, demonstrando diferenças nos processos difusionais dos compostos presentes na droga vegetal. Entretanto, além disso, dentre as condições de extração, pode-se ressaltar que há numerosos fatores que possam vir a influenciar na extração, tais como: grau de divisão de droga, temperatura, tempo, pH, tensão superficial, natureza do líquido extrator e volume do líquido extrator (SHARAPIN, 2000).

5.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As tabelas 4 e 5 mostram os resultados obtidos para as diferentes formas de preparo (sem e com agitação) das drogas vegetais a granel e em sachê, com suas respectivas concentrações dos infusos da *Camellia sinensis* (Chá preto), frente às cepas de *Trichophyton rubrum*. Pode-se observar que todos os chás, com suas diferentes formas de apresentação, não mostraram atividade antifúngica sobre as cepas testadas. Vale ressaltar a ausência de estudos anteriores sobre a atividade antifúngica do chá preto, contra cepas de *Trichophyton rubrum*.

Tabela 4: Determinação da concentração inibitória mínima dos infusos da droga vegetal em sachê

Concentração dos Infusos de <i>Camellia sinensis</i> – Chá preto			
Droga vegetal- Sachê			
Sem agitação		Com agitação	
Infuso (µg/mL)	<i>T. rubrum</i>-305 E 498	Infuso (µg/mL)	<i>T. rubrum</i>-305 E 498
2.887,17	R	3.592,26	R
1.438,57	R	1.796,13	R
719,28	R	898,06	R
359,14	R	449,03	R
179,82	R	224,51	R
89,91	R	112,25	R
44,95	R	56,12	R
22,47	R	28,06	R
11,23	R	14,03	R
5,615	R	7,015	R
R- resistente		S – sensível	

Dados determinados por triplicata

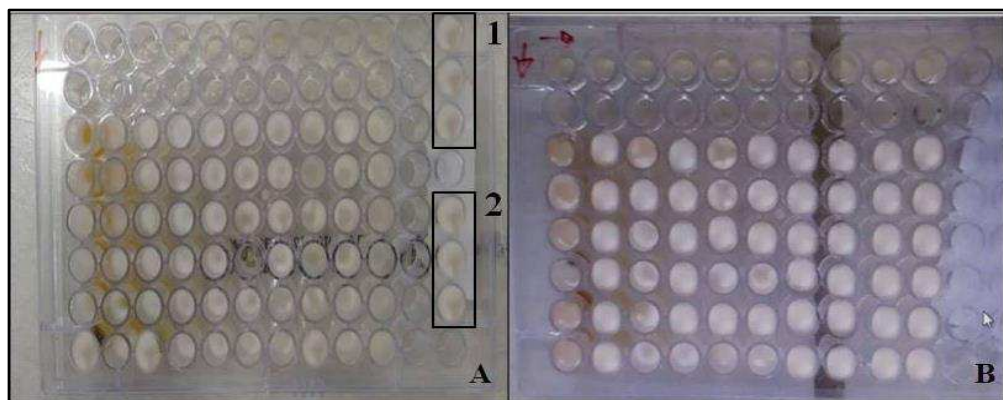
Tabela 5: Determinação da concentração inibitória mínima dos infusos da droga vegetal a granel

Concentração dos Infusos de <i>Camellia sinensis</i> – Chá preto			
Droga vegetal - A granel			
Sem agitação		Com agitação	
Infuso (µg/mL)	<i>T. rubrum</i> 305 E 498	Infuso (µg/mL)	<i>T. rubrum</i> 305 E 498
2.718,06	R	5.325,17	R
1.359,03	R	2.662,58	R
679,51	R	1.331,29	R
339,75	R	665,64	R
169,87	R	332,82	R
84,93	R	166,41	R
42,46	R	83,20	R
21,23	R	41,60	R
10,61	R	20,80	R
5,305	R	10,40	R
	R- resistente	S- Sensível	

Dados determinados por triplicata

Houve crescimento fúngico nos poços selecionados para controle de viabilidade (com e sem DMSO), descartando a possibilidade de o DMSO ter causado interferência nos testes de atividade, como demonstrado na figura 12. Além disso, observou-se ausência de crescimento nos poços que não receberam o inóculo. Logo, o meio utilizado nos testes não apresentou contaminantes. Vale salientar que as diferentes concentrações (ver tabelas 4 e 5, respectivamente) foram calculadas através das determinações do resíduo seco.

Figura 12: Teste de susceptibilidade antifúngica dos infusos do chá preto. *T. rubrum* -305, com droga vegetal a granel (A) e com droga vegetal em sachê (B).



Fonte: Pesquisador, 2015. Em destaque controle de viabilidade com DMSO (1) e sem DMSO (2).

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados, extraídos de plantas medicinais, que atuam como fungicidas naturais, dentre os quais, um número significativo

destes constituintes se mostrou eficaz (CHANG et al., 2008; KORDALI et al., 2008, CARMO et al., 2013). Desta forma, possivelmente, constituintes majoritários isolados do chá preto (Cafeína, Tearubigina, Teaflavina e Teasinesina), poderiam desempenhar uma atividade antifúngica, *in vitro*, sobre as cepas de *T. rubrum*. A resistência observada pode ser em função das substâncias potencialmente ativas estarem presentes em concentrações muito baixas, ou mesmo que estes infusos não apresentem nenhum metabólito ativo sobre esses dermatófitos.

Poucos estudos são disponíveis relatando atividade antifúngica ao chá preto. De acordo com Camargo (2011), os infusos de *C. sinensis* (chá verde, chá branco, chá preto), demonstraram atividade antifúngica sobre isolados clínicos de cepas diferentes de *Candida ssp*, sendo o chá preto o que melhor atribuiu resultados, de acordo com o processo de produção dos diferentes chás (sem e com agitação).

No estudo de Park et al. (2006) foi observado a atividade de compostos isolados, presentes nos infusos do chá preto, sobre 21 isolados clínicos de 7 cepas diferentes de *Candida* com variação na susceptibilidade. Hamilton-Miller (2001) fez uma revisão de trabalhos que avaliaram o potencial antimicrobiano de *C. sinensis* (chá preto) com atividade inibitória e bactericida sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Em estudos realizados por Ghenov (2014), os extratos mais promissores frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foram obtidos quando utilizados os extratos de chá preto, o qual foi capaz de inibir o crescimento microbiano.

As variações referentes à determinação da CIM de fitocomplexos à base de plantas medicinais podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles, podemos citar a técnica aplicada, a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada (FENNELL et al., 2004 ; OSTROSKY et al., 2008).

5.5 Testes de susceptibilidade de *Trichophyton rubrum* frente ao Cetoconazol

A Tabela 6 apresenta os resultados do teste de sensibilidade desses dermatófitos frente às diversas concentrações de cetoconazol, quando utilizado o método de microdiluição em caldo. No presente teste, observou-se um CIM igual a 0,0625 µg/mL, mostrando que este agente antifúngico é eficaz para as dermatofitoses, principalmente para *T. rubrum* que se mostrou com elevada suscetibilidade a este medicamento.

Tabela 6: Determinação da concentração inibitória mínima do cetoconazol

Concentração da Substância Teste de Referência		
Cetoconazol		
Cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$)	<i>T. rubrum</i> -305	<i>T. rubrum</i> -498
16	S	S
8	S	S
4	S	S
2	S	S
1	S	S
0,5	S	S
0,25	S	S
0,125	S	S
0,0625	S	S
0,0312	R	R
R- resistente S – sensível		

Similar resultado encontrado em nosso trabalho foi verificado por Alves et al. (2008), que avaliando a atividade antifúngica para 15 isolados clínicos de dermatófitos, verificaram que o cetoconazol apresentou variações de CIM semelhantes às encontradas em nosso estudo, que foi de 0,0312 $\mu\text{g/mL}$ a 0,125 $\mu\text{g/mL}$.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, as metodologias empregadas foram adequadas para avaliar a qualidade da droga vegetal em estudo. Todas as análises realizadas são importantes e devem ser recomendadas como parâmetros seguros para o controle de qualidade de *Camellia sinensis* (L.) kunzte.

Em relação ao teor de umidade analisado, as amostras estão em conformidade com as legislações vigentes, apresentando assim um risco menor de crescimento microbiano e degradação dos constituintes químicos. Os resultados obtidos na determinação do teor de cinzas totais e insolúveis em ácido apresentaram-se também em conformidades para todas as amostras analisadas, excetuando-se o parâmetro da determinação de cinzas insolúveis em ácido para a droga a granel que apresentou um valor acima do especificado na monografia.

Os melhores resultados, para obtenção dos teores de resíduo seco foram obtidos utilizando-se a erva a granel sob agitação, seguida da erva em sachê, quando submetida às mesmas condições. Entretanto, utilizando o processo de extração com agitação, os valores atribuídos nessas condições mostraram-se menos favoráveis para extração dos sólidos solúveis existentes na droga vegetal.

Na avaliação da susceptibilidade antifúngica o chá preto não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento das cepas de *Trichophyton rubrum*, pelas diferentes formas de obtenção do infuso da droga vegetal, demonstrando uma possível limitação para o tratamento de dermatofitoses ocasionadas por *T. rubrum*.

Os resultados do teste de sensibilidade das cepas dermatófitos frente às diversas concentrações de cetoconazol quando utilizado o método de microdiluição em caldo, apresentaram resultados relevantes, onde os isolados clínicos foram susceptíveis ao cetoconazol, demonstrando que este agente antifúngico ainda representa uma importante opção terapêutica contra *Trichophyton*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc Online**, Madrid, v. 7, p. 116-145, 2007.
- AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. **World Health Organization**, Geneva, v. 14, n. 4, p. 390-395, 1993.
- ALVES, R. A. et al. ATIVIDADE DE ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS E ALILAMINAS SOBRE DERMATÓFITOS, **Anais Jornada Acadêmica Integrada**, Santa Maria, v. 73, n.1, p. 45-50, Mai. 2008.
- AMARAL, F. M. M. et al. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Luís, v. 13, n.1, p.27-30, Nov. 2003.
- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5- 8, 2005.
- ANDENBERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J. B. **Methods Plant Biochemistry**, London: Academic Press, 1991. P. 4769 – 4779.
- AQUINO, P. M. L. P.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P. *Tinea capitis* em João Pessoa: visão socioeconômica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, João Pessoa, v. 78, n. 6, p. 713-717, Nov/ Dez. 2003.
- ARAÚJO, A. J. G. et al. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão, **Anais brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 445-455, Jul/Ago. 2003.
- ARAUJO, S. M. **Aspectos Demográficos, Clínicos e Laboratoriais de Pacientes Acometidos Por Micoses Superficiais e Cutâneas da Demanda da Rede Básica de Saúde De Cuiabá – MT, 2006-2007**. 2008. 155 f. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado em Ciências da Saúde)- Coordenação de Programas de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, 2008.

ASTILL, C. et al. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5340-5347, 2001.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Seropédica, v. 20, n. 1, p. 185-194, Ago. 2006.

BELTRAME, F.L. et al. Avaliação da qualidade das amostras comerciais de *Baccharis trimera* (L.) (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 30, n. 3, p. 45-50, Mai. 2009.

BERTÉ, K.A.S. et al. Vida-De-Prateleira: Microbiologia da Erva-Mate Chimarrão. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n.1, p.95-98, 2006.

BORRELA, J. C.; CARVALHO, D. M. A. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. **Revista Brasileira de Farmácia**, Ribeirão Preto, n. 92, n. 1, p. 13-18, Mar. 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, volume 1**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. 546 p.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 519/98 de 26/06/1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções. Diário Oficial da União. Brasília, 1998.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Fortaleza, v. 33, n. 5, p. 417-425, Set/Out. 2000.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Onychomycosis in Ceará (Northerast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Fortaleza, v.100, n.2, p. 131-135. Abr. 2005.

CAMARGO, L. E.A. **Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção.** 2011. 70 f. Monografia (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2011.

CARDOSO, C. M. Z. **Manual de Controle de Qualidade de Matérias-Primas Vegetais para Farmácia Magistral.** São Paulo: Pharmabooks, 2009. 496 p. Disponível em: <http://www.pharmabooks.com.br/livros/details.aspx/fitomedicina-curso-para-profissionais-da-area-da-saude/?isbn=8589731170#sthash.kI8UnLLV.dpbs>. Acesso em: 12 de Maio de 2015.

CARLOTTI, D.N.; BENSIGNOR, E. Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* (13 cases) or *Microsporum gypseum* (20 cases) in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 10, n. 1, p. 17-27. 1999.

CARMO, E.S. et al. Treatment of pityriasis versicolor with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf - therapeutic pilot study. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 381-385, 2013.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 314-319, Jun. 2008.

CHANG, H. T. et al. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6266-6270, 2008.

CHIMELLI, P. A. V. et al. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 259-263, Set/Out. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI/ NCCLS). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada; Approved Guideline-Second Edition.** CLSI/NCCLS document M38-A v. 22 N. 16 (Replaces M38-P, v. 18, n. 3). Wayne, PA USA: NCCLS, 2002.

COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p.1017-1020, Ago. 2008.

CONNOLE, M. D. Review of animal mycosis in Australia. **Mycopathologia**, Queensland, v. 111, n. 3, p. 133-164, Sep. 1999.

COSTA, E. M.; WANKE, B.; SOARES, E.C. Micoses superficiais e cutâneas: Estudo comparativo entre duas populações: Rio de Janeiro (RJ) e Aracaju (SE). **Anais Brasileiro de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 66, n. 3, p. 199-122, Mai/Jun. 1991.

COUTO, A. G. et al. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João pessoa, v. 19, n. 4, p. 865-870, Out. 2008.

DELAPORTE, R. H. et al. Estudo farmacognóstico das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae), **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21. n. 3, p. 169-74, Mai. 2002.

DEUTSCHES; ARZNEIBUCH. _____. Medicinal and Aromatic Plants XI. Frankfurt: **Curr Opin Biotechnol**, 1994. 173 p.

DIAS, M. F. R. G. et al. Atualização terapêutica das micoses superficiais: artigo de revisão parte I. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 5, p. 764-774. 2013.

DIAZ, M. C.; SALAMANCA, L.; PIONTELLI, E. Dermatofitosis: un problema del pasado, un desafio del presente. **Adelantos en Microbiologia e Enfermedades Infecciosas**, n. 3, p. 212-273, 1984.

EGAN, H. et al. **Pearson's Chemical Analysis of Food**. 18^a Ed. New York: Churchill **Livingston**, 1998. 546 p.

ELLIS, D. Mycology online. **The University of Adelaide**. Disponível em: <
<http://www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/Cutaneous/Dermatophytosis/>>. Acesso em:
22 de mar. 2015.

FENNELL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2, p. 113-121. 2004.

FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). **II Fármaco**, Naples, v.56, n. 5, p. 397-401, Jul. 2001. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X01011041>>. Acesso em: 25 de Março de 2015.

FERREIRA, C. J.; SIQUEIRA, R. E.; MAFFEI, M. C.; CANDIDO, C. R. Ocorrência de dermatofitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 3, p. 269-271, Mai/Jun. 2006.

GHENOV, F. **Avaliação *In Vitro* das Atividades Antioxidante e Antimicrobiana de Extratos Hidroalcoólicos de Chá Preto (*Camellia Sinensis*) e dos Cogumelos Shiitake (*Pleurotus Ostreatus*) e Shimeji (*Lentinula Edodes*)**. 2014. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)- Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GIL, E.S. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2ª ed. São Paulo: **Pharmabooks**, 2007.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, Toronto, v. 166, n. 6, p. 353-367, Dez. 2008.

HAMILTON-MILLER, J. M. Anticariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 299- 300, Apr. 2001.

HANSEL, R. et al. **Pharmakognosie – phytopharmazie**. 6ª Ed. Berlim: Springer, 1999.

HASLAM, E. Thoughts on thearubigins. **Phytochemistry**, v. 64, p.61-73, 2003.

HOFFMAN, A. et al. Comportamento de forrageamento e dieta de *Polystictus superciliaris* (Aves, Tyrannidae) no sudeste do Brasil. **Iheringia**, v. 97, n. 3, p. 296-300. Set. 2011.

INNOQ. Instituto de Normalização e Qualidade, Moçambique. **Chá preto-definições e requisitos básicos**. Moçambique, v. 45, 2007.

JAWETZ, E.; MELNICK, L. J.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**, 7ª Ed. Desarrollo Santa Fe: Artmed, 2005. 568 p.

JIANHUA, W.; HAI, W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. **Journal of Medical Colleges of PLA**. Shanghai, v. 24, n. 3, p. 142-147, Mar. 2009.

KORDALI, S. et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and ρ -cymene. **Bioresource Technology**, v. 10, p. 48- 55, 2008

LACAZ, C.S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**, São Paulo : Savier, 1991. Cap.38. p.616-651. Disponível em:
<http://www1.hu.usp.br/biblioteca/Novidades_Acervo/Dezembro%2009/Livro%20135de%20-%20Tratado%20de%20micologia%20m%C3%A9dica%20Lacaz.pdf>. Acesso em: 24 de Março de 2015.

LIMA, E. O. et al. Frequência de dermatofitoses em João Pessoa- Paraíba- Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, João Pessoa, v. 74, p.127-132, 1999.

LOGUERCIO-LEITE, C. et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 17-27, Jun. 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2^a ed. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544 p.

MACIEL, A. S. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão – segunda parte. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, V. 57, n. 1, p.77-80, Jul. 2005.

MARTINEZ-ROSSI, N. M. et al. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, Ribeirão Preto, v.166, n. 6, p. 369-383, Mai. 2008.

MESSIAS, A. D. et al. Caracterização físico-química do drogas vegetais comercializadas no município de Guarulhos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Guarulhos, v. 17, n. 1, p. 143-151, Abr/Jun. 2014.

MILENNI, L.; NEME, L. Atualização em micoses superficiais. **Revista Brasileira de Medicina**, Londrina, v. 61, n. 5, p. 28-34, Mai. 2004.

- MORAES, L. A. S.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 1, p. 183-186, Mar. 2002.
- MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O; WANDERLEY, P. A.; CARMO, E. S.; SOUZA, E. S. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 28-33. Jan/Mar. 2010.
- MORIELLO, K. A. Diagnostic techniques for dermatophytosis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Madison, v. 16, n. 4, p. 219-224, Nov. 2001.
- MOUCO, G. et al. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, Dez. 2003.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, C. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. Maryland, v.70, n. 3, p. 461-477, Feb. 2007.
- NOBRE, M. O. N. et al. Drogas Antifúngicas para Pequenos e Grandes Animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.1, p. 175-184. 2002.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr./jun. 2008.
- PAGANINI-COSTA, P.; CARVALHO, D.M. A. Uma xícara (chá) da química. **Revista Virtual de Química**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 27-36, Mar. 2011.
- PARK, B.J. et al. Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) on clinical isolates of pathogenic yeasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 34, n. 2, p. 401-405, 2006.
- PERALTA, R. M. et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Maringá, v. 30, n.1, p. 191-196, Jun. 2010.

PEREIRA, A.V. et al. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chá verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 490- 498. Mar. 2014.

PEREIRA, C. Q. M. **Identificação de espécies de fungos causadores de onicomicose em idosos institucionalizados no município de São Bernardo de Campo**. 2012. 87 f. Monografia (Dissertação de Mestrado). Programa de Dermatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Goytacazes, v. 14, n. 1, p. 37-40, 2004.

PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 85, n. 5, p. 657-667, Set/Out. 2010.

PERON, M. L. D. F. et al. Epidemiologia e etiologia das dermatomicoses superficiais e cutâneas na região de Paranavaí-Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Curitiba, v. 37, n. 2, p. 77-81, 2005.

PIETRO, R.C.R.L. et al. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Araraquara, v. 20, n.3, p. 435-440, Jun/Jul. 2010.

PRADO, M. R. et al. *Malassezia spp.* Em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Fortaleza, v. 102, p. 207-214, 2007.

RAMOS-SILVA, M. Infecções Cutâneas Por Fungos - Micoses Superficiais. **Faculdade de Medicina - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho**, Rio de Janeiro, RJ, v. 1, n. 1, p. 5-10, 1995. Disponível em:<
<http://www.dermato.med.br/publicacoes/artigos/1995infeccoes.htm>>. Acesso em 24 de março de 2015.

RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Dermatofitos e dermatofitoses na cidade de São Paulo no período de agosto de 1996 a julho de 1998. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 391-401, 2001.

SAENZ, F. J. Identificación de hongos dermatofitos. **Revista Iberoamericana de Micología**, Española, p.1-11, 2001.

SANTOS, J. I. et al. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, Santa Catarina, v. 34, n. 1, p. 3-6, 2002.

SCHAECHTER, M. E, et al. **Microbiologia**: mecanismos das doenças infecciosas. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 664 p. 3 v.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá - Colômbia: Cytel. 2000. 248p.

SIDRIM, J. J.C. et al. Aspectos clínicos - laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J, J, C.; ROCHA, M, F, G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap 14, p. 135-161.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1179 p.

SILVEIRA, P. F. et al. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 618-626, Dez. 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004. 1102 p.

Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Doenças de pele**. 2015. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/informacoes/doencas/>. Acesso em: 07 de Maio de 2015.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. p. 289-326.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, Teresina, v. 30, n. 2, p. 351-355, Jan. 2007.

SOUZA, E. L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18 n. 5, p. 409–413. May. 2007.

SPARKES, A. H. et al. *Microsporum canis*: inapparent carriage by cats and the viability of arthrospores. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 8, p. 397-401, Jun. 1994.

TATIANA, M. O. et al. Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p 435-440, Jul. 2010.

TIWARI, R.P. et al. Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. **Indian Journal of Medical Research**, v. 122, v. 1, p. 80-84, Jul. 2005.

Universidade Estadual de Campinas. **Bioetanol a partir de produtos agrícolas: grandes novidades na produção**. 2015. Disponível em:

http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/lqes_news/lqes_news_cit/lqes_news_2009/lqes_news_novidades_1376.html. Acesso em: 02 de Maio de 2015.

Universidade Estadual do Mississippi. **Camellia sinensis**. 2015. Disponível em:

<http://www.msstate.edu/org/arboretum/camsin.htm>. Acesso em: 08 de Maio de 2015.

Universidade Federal do Pará. **Fungos filamentosos com hifas septadas escuras**. 2007.

Disponível em:

http://www.4shared.com/photo/Hk60Dbvw/fungos_filamentosos_hifa_septa.html. Acesso em: 02 de Maio de 2015.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 308-313, Abr/Jun. 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: Cura segura?. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, Mai/Jun. 2005.

WEISBURGER, J. Tea and health: a historical perspective. **Cancer letters**, Valhalla, v. 114, n. 2, p. 315-317, Mar. 1997. Disponível em:<

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103320>>. Acesso em: 25 de Março de 2015.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 8, p. 240-259. 1995.

WHO-World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**.

Geneva: WHO, 1992. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/](http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf)

[publications/1998/9241545100.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf). Acesso em 11 de Maio de 2015

WHO-World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant 440 materials**. Geneva: Revised Draft Update, 2005. Disponível em: http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS05_131Rev1_QCMethods_Med_PlantMaterialsUpdateSept05.pdf. Acesso em 11 de Maio de 2015.

XU, R. et al. Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2473-2480, Jul. 2012.

ZANARDI, D. et al. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 83, n. 2, p. 119-124, Mar/Abr. 2008.