

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO
Centro de Ciências da Saúde

ANDREZZA BECKER FIORETTO
LARISSA BECKER FIORETTO

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA ENTRE O EXTRATO FLUÍDO
ETANÓLICO DE *Calendula officinalis* L. E O
FLUCONAZOL**

BAURU
2007

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO
Centro de Ciências da Saúde

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
ENTRE O EXTRATO FLUÍDO ETANÓLICO DE *Calendula*
officinalis L. E O FLUCONAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
da Saúde da Universidade do
Sagrado Coração como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Farmacêutico, sob orientação da
Prof^a Ms. Rute M. X. de Moura.

BAURU
2007

Fioretto, Andrezza Becker

F518e

Estudo comparativo da atividade antifúngica entre o extrato fluido etanólico de *Calendula officinalis* L. e o fluconazol / Andrezza Becker Fioretto, Larissa Becker Fioretto – 2007.

52f.

Orientadora: Prof^a. Ms. Rute M. X. de Moura

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) - Universidade do Sagrado Coração – Bauru - São Paulo.

1. *Calendula officinalis* L. 2. Atividade antifúngica
3. *Candida albicans* 4. Fluconazol I. Fioretto, Larissa
Becker II. Moura, Rute M.X. de III. Título

**ANDREZZA BECKER FIORETTO
LARISSA BECKER FIORETTO**

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA ENTRE O
EXTRATO FLUÍDO ETANÓLICO DE *Calendula officinalis* L. E O
FLUCONAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico, sob orientação da Prof^a Ms. Rute M. X. de Moura.

Banca Examinadora:

Prof^a. Ms. Rute Mendonça Xavier Moura

Prof. Especialista Fernando Tozze Alves Neves

Prof^a. Ms. Silvana Torossian Coradi

Bauru, 28 de Novembro de 2007.



“... dedicar algo significa muito mais que oferecer, é o reconhecimento profundo...”.

Dedicamos este trabalho aos nossos pais Ana Luiza e Luciano, que participaram de todas as nossas realizações.

Com amor, carinho, compreensão e incentivo.

Mais do que dedicar compartilhamos com eles este trabalho.

Andrezza Becker Fioretto

Larissa Becker Fioretto



Um trabalho deste não poderia ser realizado sem ajuda. Os mais sinceros agradecimentos à Universidade do Sagrado Coração (USC - Bauru), aos funcionários dos laboratórios de Química e Biologia. A Prof^ª. Ms. Silvana Torossian Coradi, pela orientação, desenvolvimento, apoio e companheirismo para que juntos realizássemos a conclusão deste trabalho. Ao Prof^º. Fernando Tozze Alves Neves pela amizade, companheirismo, dedicação e sinceridade nas palavras. Ao nosso tio José Roberto Fioretto “tio Beto” muito obrigada por seu incentivo, seu carinho e, principalmente, sua amizade. Ao nosso irmão Edurado Becker Fioretto agradecemos por suas palavras, amizade e dedicação. A Prof^ª. Ms. Rute Mendonça Xavier de Moura, pela inestimável participação e ajuda que tornou este trabalho possível. Enfim, todos aqueles que participaram de uma maneira ou outra com seu apoio e atenção, transmitindo energia, confiança e segurança sem os quais a realização deste trabalho seria mais difícil.



*“Uma jornada de duzentos quilômetros
começa com um simples passo”.*

(Provérbio Chinês)

RESUMO

A utilização de espécies vegetais para tratamento e cura de doenças é um tema atual e relevante, com a participação de um número cada vez maior de profissionais. Atualmente, cerca de 37% dos pacientes utilizam produtos de origem natural. Boa parte dos medicamentos antifúngicos de origem sintética empregados atualmente produzem reações adversas, além de apresentar grande toxicidade, por esta razão há uma crescente busca por fármacos mais potentes, resistentes e seguros. As drogas de origem natural são de baixo custo e sua utilização responde as necessidades sociais, econômicas, culturais e política da população. A finalidade dos fitoterápicos na medicina, não é substituir medicamentos já existentes no mercado farmacêutico, mas sim, aumentar a opção terapêutica. Neste trabalho foi investigado a possível ação antifúngica do extrato etanólico da *Calendula officinalis* L. sobre leveduras do gênero *Candida*. Não se observou diminuição significativa no número de leveduras, mas ausência de múltiplos brotamentos nos tubos tratados com o extrato, nos tempos 24, 48 e 72 horas, quando comparado com a droga padrão, o fluconazol.

Palavras-chave: *Calendula officinalis* L.; atividade antifúngica; *Candida albicans*; fluconazol.

ABSTRACT

Use of vegetal species for treating and healing diseases is a very relevant topic which has involved a growing number of professionals. Currently, it is described a 37% use of natural products for therapeutic purposes. A great number of synthetic-antifungal drugs currently in use cause adverse reactions with great toxicity. Hence, search for more powerful and safer medicines has been increasing. Natural drugs have low cost, fulfilling the social, economical, cultural, and political necessities of the population. Phytotherapy is not used to substitute regular-commercial medicines. On the contrary, it serves as an alternative therapeutic option. In this study it was investigated a possible antifungal property of the *Calendula officinalis* L. on the genre yeast *Candida*. It was not observed significant decrease of the number of yeast. However, it was observed a lack of multiple sproutness in the tubes treated with extract over 24, 48 and 72 hours when compared with fluconazole.

Uniterms: *Calendula officinalis* L.; Antifungal activity; *Candida albicans*; fluconazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Calendula officinalis</i>	17
Figura 2 – <i>Calendula officinalis</i> – Capítulos Florais.....	18
Figura 3 – Estrutura química do Flavonóide.....	20
Gráfico 1- Porcentagem das espécies apontadas como agentes causadores da patologia candidíase	22
Figura 4 – Células do Gênero <i>Candida</i>	23
Figura 5 – Células do gênero <i>Candida</i> (blastocónídeos)	24
Figura 6 - Tubo germinativo e clamidósporo terminal – <i>Candida albicans</i>	24
Figura 7 - Estrutura química do fungicida fluconazol.....	27
Tabela 1- Análise comparativa do número de leveduras em meio RPMI, meio RPMI acrescido de fluconazol, álcool e extrato fluído de calendula nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas.....	38

Lista de Abreviações

RPMI – É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Destina-se à cultura de células humanas e de outros animais.

ATCC 10231 – Cepas de *Candida albicans*

EtOH – Etanol

IMS Health – Órgão Mundial Especialista em Soluções Farmacêuticas

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

°Gl – Medida concentração alcoólica – Gay Lussac

mL – mililitro

mg- miligrama

µl – microlitro

nm – nanômetro

Sumário

1 Introdução	12
2 <i>Calendula officinalis</i> L	16
3 Glicosídeos Flavônicos	19
4 Gênero <i>Candida</i>	21
5 Fluconazol.....	26
6 Objetivos	28
6.1 Objetivo Geral	29
6.2 Objetivos Específicos	29
7 Material e Métodos.....	30
7.1 Especificação dos materiais e dos métodos utilizados.....	31
7.2 Obtenção do vegetal e Preparo Fluido Alcoólico	31
7.3 Atividade Biológica	32
7.3.1 Avaliação da Atividade Antifúngica.....	32
8 Resultados	33
9 Discussões	36
10 Considerações Finais.....	39
11 Referências	41

Anexos



INTRODUÇÃO

1 Introdução

A utilização das espécies vegetais para tratamento e cura de doenças e sintomas remetem ao início da civilização, desde o momento em que o homem desperta, livra-se de obstáculos e começa um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para o seu próprio benefício. Esta prática milenar ultrapassou todos os obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo utilizada por grande parte da população (Di STASI, 1996).

Relatos mostram que os chineses utilizam os efeitos benéficos das plantas há mais de quatro mil anos. A evolução natural do conhecimento levou o homem ao aprendizado da melhor forma de administração desses produtos, ou seja, por meio de infusão, extratos, alimentação sólida, etc. Além disso, a evolução analítica das últimas décadas buscou conhecimento da correlação entre a espécie química presente na planta e sua ação no organismo (LEITE, 2005). Entretanto, com o advento da Revolução Industrial e o aperfeiçoamento da química orgânica, os produtos sintéticos tornaram-se superiores aos produtos naturais. Isso ocorreu pela facilidade na obtenção de compostos puros, pelo desenvolvimento de processos de modificações estruturais, e crescente poder econômico das companhias farmacêuticas (CORDEIRO; CHING; SACRAMENTO, 2006).

Mesmo com todo esse avanço tecnológico, os produtos naturais não perderam seu lugar, sendo considerados medicamentos seguros e amplamente utilizados pela população (CORDEIRO; CHING; SACRAMENTO, 2006).

Estudos recentes com plantas medicinais têm sido responsáveis por inúmeras e importantes descobertas, o aprimoramento desses deve-se a vários fatores, dos quais destaca a participação de um número cada vez maior de profissionais, onde os resultados dependem de uma inter-relação entre esses. Esse caráter inter e multidisciplinar que por um lado representa obstáculos, por outro, permite aos pesquisadores trocar conhecimentos mais amplos e ricos que aqueles obtidos em linhas específicas de pesquisa (Di STASI, 1996).

Nesse contexto, apresentamos dados de estudos realizados pela *IMS Health* (Órgão Mundial Especialista em Soluções Farmacêuticas), que demonstram que o mercado mundial de fitoterápicos é da ordem de R\$ 21,7 bilhões anuais, com cerca

de R\$ 400 milhões no Brasil e taxa de crescimento de 15%, contra 4% dos medicamentos sintéticos. Além disso, o custo da pesquisa de fitoterápicos é menor, estando entre U\$ três milhões a sete milhões. Isto ocorre porque a pesquisa a partir da etnofarmacologia reduz o tempo de produção com redução de custos, comparada à produção dos compostos sintéticos (cerca de U\$ 250 milhões a 880 milhões) (RODRIGUES, 2005).

Várias empresas nacionais empregam matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de seus medicamentos. No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, os demais encontram nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais (Di STASI, 1996).

Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos (SIMÕES et al., 2003).

Os fitoterápicos têm sido no caso do Brasil e de muitos países, o suporte da indústria farmacêutica genuinamente nacional de pequeno e médio porte (SIMÕES et al., 2003).

Embora muitos compostos derivados de plantas medicinais possam ser sintetizados em laboratório, tal síntese é freqüentemente tão complexa que os rendimentos são baixos e a produção economicamente inviável. Por outro lado, alguns compostos também originados de plantas não podem ser ou nunca foram quimicamente sintetizados (SIMÕES et al., 2003).

Neste contexto, a idéia primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim, aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde, ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com espectros de ações mais adequados e, até mesmo, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes, mas sempre em estrita obediência aos preceitos éticos, conforme a RDC Nº 48, de 16 de março de 2004, que rege os medicamentos fitoterápicos (SIMÕES et al., 2003).

Objetivos secundários, mas não menos importante serão a valorização das tradições populares e o fornecimento de novos princípios ativos para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local (SIMÕES et al., 2003).

Recentemente nota-se que, a busca de novos compostos antifúngicos a partir da flora latino-americana, baseada no uso etnofarmacológico, tem crescido consideravelmente (FENNER et al., 2006).

Desta forma, considerando a crescente aceitação, ao longo dos anos da fitoterapia e de outras práticas terapêuticas naturais, por parte dos pacientes em todo mundo, o que tem constituído numa tendência cada vez mais expressiva e que tem influenciado todo segmento farmacêutico (MARQUES, 2002), estamos propondo o estudo da atividade antifúngica do extrato fluído etanólico da espécie *Calendula officinalis* L., empregada empiricamente, especialmente para afecções de pele, entre elas, micose, popularmente conhecida como “frieira”, causada pelos Dermatófitos, conforme relata Fenner et al., (2006) (Anexo A).



C. officinalis

2 *Calendula officinalis* L.

Calendula officinalis L. pertence à Família *Asteraceae*, é uma planta originária do Egito, cultivada na Europa desde o século XII e que rapidamente se expandiu para o resto do mundo (LA LUZ; FERRADÁ; GOVÍN, 2001).

C. officinalis é uma das plantas mais versáteis, cresce facilmente durante os meses de verão e tem notoriedade como planta ornamental (SIMÕES et al., 2003).

É uma planta herbácea, anual, de cor amarelada com nuances alaranjada, (Figura 1 e 2). Suas folhas são oblongas lanceoladas ou espatuladas e apresentam fitotaxia alternata. A planta mede aproximadamente 13 cm de altura. Nos extremos dos talos encontram-se capítulos florais cujo diâmetro oscila entre três e seis cm (LA LUZ; FERRADÁ; GOVÍN, 2001).

De acordo com Carvalho (2005), entre os principais marcadores identificados na *C. officinalis* encontram-se: kampferol; quercetina; ácido clorogênico; ácido málico; campesterol; cariofileno; luteína; luteína-epóxido; rutina; carotenóides (responsáveis pela coloração das flores) e flavonóides (sendo este considerado um constituinte majoritário na espécie). Estes marcadores farmacológicos estão representados no anexo B, e as respectivas partes encontradas.



Figura 1 - *Calendula officinalis*

Fonte: Disponível em: <livingwilderness.com/seasons/calendula.html>. Acesso em 19 maio 2007.



Figura 2 – *Calendula officinalis* – Capítulos Florais

Fonte: Disponível em:< <http://www.ojaigarden.com/images/calendula.jpg>>. Acesso em 19 maio 2007.

Calêndula é uma planta utilizada para fins medicinais e muito popular pelo seu uso em cosmética (SIMÕES et al., 2003). Seus princípios ativos têm demonstrado uma ação antiinflamatória, cicatrizante, antimicótica e antioxidante. Entretanto, há possibilidade de que os mesmos tenham uma ação antifúngica, atividade esta proposta como principal objetivo deste trabalho.



Glicosídeos Flavônicos

3 Glicosídeos Flavônicos

Glicosídeos Flavônicos, caracterizado como um dos constituintes químicos majoritários da espécie *Calendula officinalis* L., constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Destacam-se por algumas de suas funções nas plantas, dentre elas: a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível; antioxidantes além de participarem da pigmentação das diferentes partes vegetais, especialmente nas flores e cascas de frutos, entre eles os frutos cítricos (SIMÕES et al., 2003).

Quimicamente, são formados por um núcleo fundamental “Benzopirano” ou “Cromano” ao qual encontra-se ligado um anel aromático, isto é, 2-fenil-benzopirano (Figura 3). O núcleo benzopirano conferem-lhes espectros de absorção característicos no ultravioleta, com duas bandas características, uma nos comprimentos de onda menores entre 220 e 250 nm e a outra próximo dos 300 nm (Costa, 1977). Finalmente, os Glicosídeos Flavônicos destacam-se pela sua importância farmacológica, resultado de algumas propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras (SIMÕES et al., 2003).

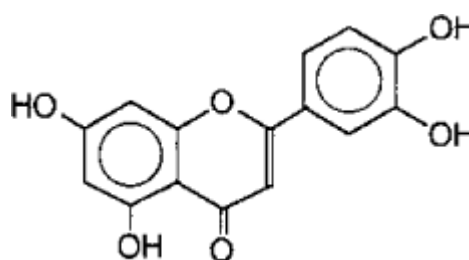


Figura 3 - Estrutura química do Flavonóide: 5,7,3',4' tetrahidroxi-flavona

Fonte: Disponível em: < www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext...>. Acesso em: 05 nov. 2007.

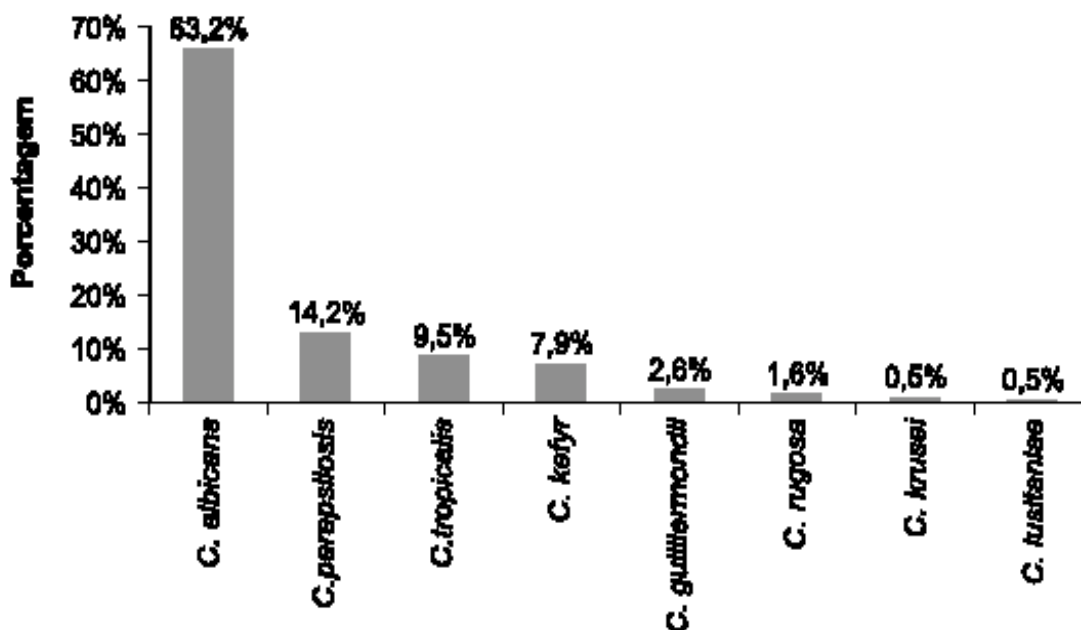


Gênero Candida

4 Gênero *Candida*

A ocorrência de infecções fúngicas humanas tem apresentado aumento significativo nos últimos anos, sendo a candidíase a infecção oportunista mais freqüente, apresentando um quadro extenso de manifestações clínicas. Produz lesões que variam de cutâneas a sistêmicas. *Candida albicans* é o agente etiológico mais freqüentemente relatado como agente da candidíase. Outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, embora em menor escala, também têm sido apontados como agentes causadores de candidíase, conforme ilustra o gráfico 1 (FENNER et al., 2006; SIDRIM; MOREIRA, 1999; MIRANDA et al; 2003).

Gráfico 1– Porcentagem das espécies apontadas como agentes causadores da patologia candidíase.



Adaptado por: Fioretto, 2007. Fonte: Disponível em: <[http://www.iptsp.ufg.br/download/2005_34\(2\)123_128.pdf](http://www.iptsp.ufg.br/download/2005_34(2)123_128.pdf)>. Acesso em 01 set. 2007.

Grandes quantidades de drogas antifúngicas podem ser utilizadas no tratamento das candidíases cutâneo – mucosas. A forma de administração deve ser variável na dependência da severidade das manifestações clínicas. Boa parte das drogas antifúngicas disponíveis produzem reações adversas, além de apresentar

grande toxicidade. Por essa razão, há uma persistente busca de novos fármacos mais potentes, resistentes e seguros (SIDRIM; MOREIRA, 1999; NOBRE et al., 2002).

Neste contexto, embora a maioria dos antifúngicos existentes no mercado seja de origem sintética, o estudo de produtos naturais volta a receber a atenção dos cientistas (YUNES FILHO, 2001). Os fungicidas naturais são de baixo custo e sua utilização responde as necessidades sociais, econômicas, culturais e políticas da população; sua aplicação é feita com conhecimentos tradicionais sobre as plantas medicinais (AMITA et al., 2004).

se formar (MELO; SERAFIM; BRIONES, 2002).

O gênero *Candida* foi criado durante o 9º Congresso Internacional de Botânica, realizado no Canadá em 1959, substituindo o termo monília, utilizado até então (LACAZ et al., 1980). As leveduras desse gênero possuem células globosas, ovóide, cilíndrica ou alongada e algumas vezes irregular (Figura 4 e 5). Pseudomicélio forma-se em todas as espécies, diferenciam-se em pseudo-hifas e blastóporos. Clamidósporos podem

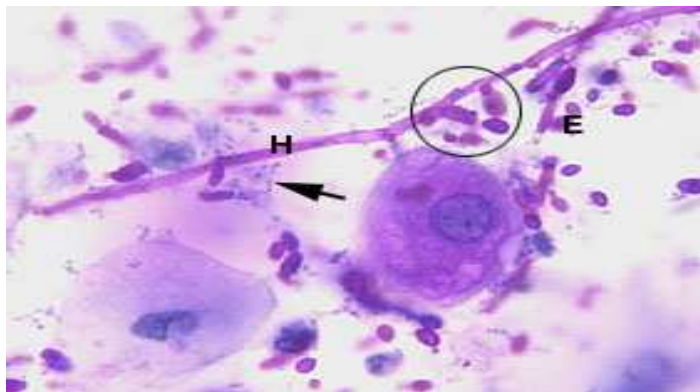


Figura 4 - Células do gênero *Cândida*

Fonte: Disponível em : <<http://www.fo.usp.br/lido/patoartergeral/images/candid5.jpg>>. Acesso em 19 maio 2007.



Figura 5 – Células do gênero *Cândida* (blastocónídeos)

Fonte: Disponível em: <www.agro.uba.ar/investigacion/ibyfi/inv004.jpg>. Acesso em 26 maio 2007.

A identificação de *C. albicans* e *C. não albicans* é realizada de duas maneiras: provas morfológicas e teste bioquímico (SADVEN, 1990).

O aparecimento de tubo germinativo e a formação de clamidósporo terminal são confirmatório para *C. albicans* (Figura 6), já para *C. não - albicans* são realizados testes bioquímicos complementares que permitem a identificação pelo aparecimento de coloração diferente na colônia (SADVEN, 1990).



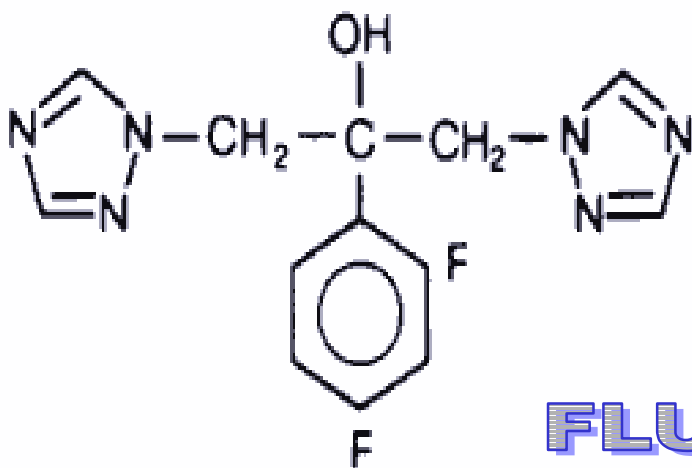
Figura 6 - Tubo germinativo e clamidósporo terminal – *Candida albicans*

Fonte: Disponível em:

<<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/images/candida.jpg>> Acesso em 26 maio 2007.

A candidíase intertriginosa é observada nas regiões interdigitais palmares e plantares, sendo o principal fator predisponente a atividade ocupacional, na qual à

exposição à água favorece a maceração. Nessas lesões são observadas fissuras centrais, circundadas por uma pele macerada, desprendida e esbranquiçada; o prurido pode ser discreto ou intenso (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

**FLUCONAZOL**

5 Fluconazol

O Fluconazol (Figura 7) é um dos fármacos sintéticos mais utilizados na terapia das leveduras, entre as quais a levedura *Candida albicans*. É um fármaco derivado do triazol, utilizado no tratamento de infecções fúngicas cutânea e sistêmica, inibindo um dos passos da síntese do ergosterol, um dos constituintes mais importantes das membranas celulares de várias leveduras, entre elas a *Candida albicans*. Essa é uma levedura patogênica oportunista que provoca várias infecções em humanos, com especial incidência em doentes com o sistema imunológico debilitado.

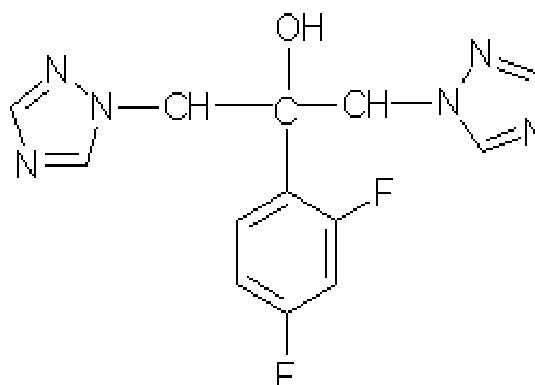
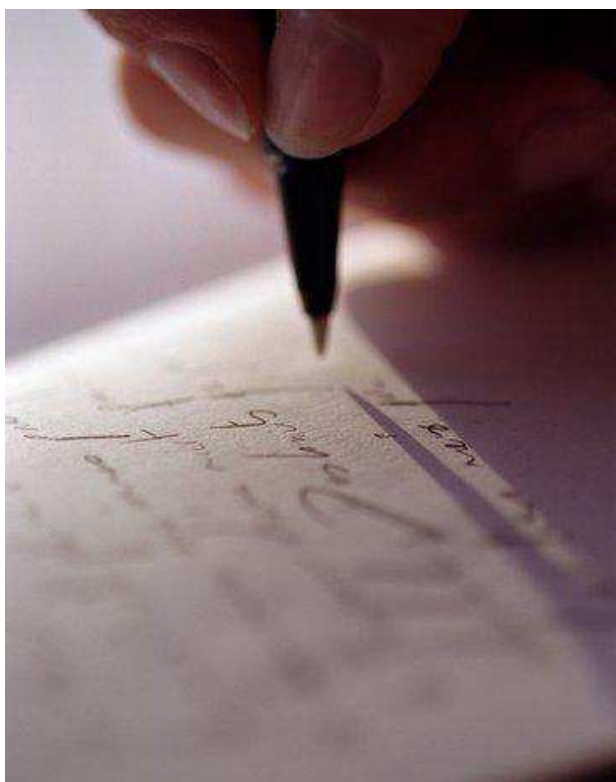


Figura 7 - Estrutura química do fungicida fluconazol

Fonte: Disponível em: <bioinformatics.ath.cx/index.php?id=158>. Acesso em 23 fev. 2007.



OBJETIVOS

6 Objetivos

6.1 Objetivo geral

O trabalho visa estudar os efeitos do extrato fluido etanólico da espécie *Calendula officinalis* na candidíase intertriginosa.

6.2 Objetivos específicos

- Levantar de acordo com a literatura dados botânicos e químicos da *Calendula officinalis*;
- Averiguar na literatura informações sobre sua atividade antifúngica;
- Comparar o espectro de ação do extrato fluido etanólico de calêndula com a droga sintética Fluconazol (grupo dos azóis) sobre leveduras do gênero *Candida*, especificamente *C. albicans*.



MATERIAL e MÉTODO

7 Material e Método

7.1 Especificação dos Materiais e dos Métodos Utilizados

Utilizamos uma balança semi – analítica, Modelo Marte.

O sistema de solvente utilizado foi o Etanol 95 °GL (Cromatado Produtos Químicos LTDA) e água, na proporção droga:líquido extrator 1:5, por tratar-se de extração de fármacos contendo substâncias de reserva, como flavonóides, taninos e quinonas (FRANCO e CARDOSO,1998).

A droga *C. officinalis* foi fornecida com seu respectivo laudo (Anexo C), pelo Grupo Centroflora, localizado na cidade de Botucatu, em 08 de maio de 2007.

7.2 Obtenção do Vegetal e Preparo do Extrato Fluido Etanólico

Para a obtenção do extrato fluído a 20% de *C. officinalis*, realizamos três extrações em Etanol (EtOH) , pelo método de Maceração. Inicialmente 25g da droga ficaram em contato com o solvente: Etanol / Água (25:100) durante oito dias, à temperatura ambiente, em frasco âmbar, bem fechado. Em seguida procedemos à filtração, através de papel de filtro. Tal procedimento foi realizado de forma exaustiva, três vezes, até o esgotamento dos princípios ativos, para a obtenção do extrato fluído. Posteriormente, o extrato fluído foi submetido ao ensaio para a Atividade Antifúngica.

A extração exaustiva, por três vezes consecutivas, tem por finalidade o esgotamento dos princípios ativos existentes na espécie em estudo, considerando-se os fatores à que a planta fica submetida durante o seu cultivo, entre eles: fatores climáticos e predadores, os quais podem interferir no teor de ativos que a mesma produz. Dessa forma, o mecanismo de extração em geral observado, é o de difusão ou de osmose, onde havendo igualdade de concentração dentro e fora das células, período que corresponde à aproximadamente oito dias, cessa-se a primeira extração com filtração, seguido de renovação do solvente, iniciando-se desta forma a segunda extração, com duração de aproximadamente oito dias. Posteriormente, repetiu-se o procedimento pela terceira vez, para esgotamento dos princípios ativos (PRISTA; ALVES, 1990).

7.3 Atividade Biológica

7.3.1 Avaliação da Atividade Antifúngica

Candida albicans

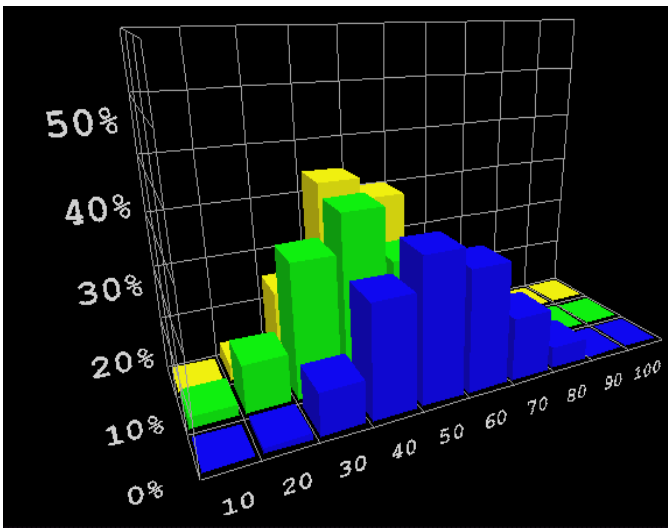
Foi utilizada cepa de *C. albicans* ATCC 10231 mantida em ágar Sabourad dextrose a 30°C pelo Laboratório de Biologia da Universidade do Sagrado Coração – USC, Bauru (SP). Antes da realização do experimento, foram realizados três repiques sucessivos, de 72 em 72 horas em ágar Sabouraud dextrose e incubados a 30°C.

Extrato de calêndula

Foi utilizada 100µl do extrato fluido de *C. officinalis*.

Suspensão de levedura

Preparamos uma suspensão com a levedura (*Candida albicans*, ATCC 10231) segundo a escala de 0,5 Mc Farland. Em doze tubos de ensaio (7x1) estéreis colocamos dois mL de meio RPMI – 1640 e 100 µl da suspensão de levedura previamente preparada. Desses doze tubo de ensaio, três foram acrescidos de 100 µl de Fluconazol a 100mg/mL, três tubos acrescidos de 100 µl de Extrato Fluido etanólico de *Calendula officinalis* 20%, e três tubos acrescidos de 100 µl de álcool 20% para controle da ação inibitória em relação a proliferação do fungo e mais três tubos com meio RPMI – 1640 e a suspensão de levedura foram considerados controle de crescimento do fungo. Os tubos foram incubados a 30°C. Todos os tubos foram submetidos à contagem do número de levedura em câmara de *neubauer* após 24, 48, 72 e 96 horas da incubação. As contagens de levedura, nos diferentes tempos foram realizadas em triplicatas.



RESULTADOS

8 Resultados

Após incubar os inóculos a 30°C, procedeu-se à contagem do número de levedura, em câmara de *neubauer*, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

A contagem, em câmara de *Neubauer*, após 24 horas de incubação das amostras do grupo controle (Meio RPMI), revelou $1,8 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio com presença de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos. Nos tubos de leveduras tratados com fluconazol, observou-se $6,4 \cdot 10^4$ leveduras por mL do meio e ausência de pseudo-hifas. Os tubos de levedura tratada com extrato fluído etanólico de *Calendula officinalis* a 20%, apresentou $1,8 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com formação de pseudo-hifas e ausência de múltiplos brotamentos. Nos tubos de levedura tratada com álcool a 20%, observou-se $8 \cdot 10^5$ leveduras por mL do meio, com formação de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos.

Após 48 horas de incubação das amostras o grupo controle (RPMI), revelou $1,7 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com presença de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos. Nos tubos de leveduras tratados com Fluconazol, observou-se $3,2 \cdot 10^4$ leveduras por mL de meio e ausência de pseudo-hifas. Nos tubos de levedura tratada com Extrato Fluído Etanólico de *Calendula officinalis* a 20%, observou-se $1,8 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com formação de pseudo-hifas e ausência de múltiplos brotamentos. Nos tubos de levedura tratada com álcool a 20%, observou-se $1 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com presença de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos.

Após 72 horas de incubação das amostras o grupo controle (RPMI), revelou $1,9 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com presença de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos. Nos tubos de leveduras tratados com Fluconazol, observou-se a ausência de pseudo-hifas e leveduras. Nos tubos de levedura tratada com Extrato Fluído Etanólico de *Calendula officinalis* a 20%, observou-se $1,1 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com formação de pseudo-hifas e ausência de múltiplos brotamentos. Os tubos de levedura tratada com álcool a 20% observou-se $1 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com presença de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos.

Após 96 horas de incubação das amostras o grupo controle (RPMI), revelou $1,9 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com presença de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos. Nos tubos de leveduras tratados com Fluconazol, observou-se a

ausência de pseudo-hifas e leveduras. Nos tubos de levedura tratada com Extrato Fluído Etanólico de *Calendula officinalis* a 20%, observou-se $1,9 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com formação de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos. Os tubos de levedura tratada com álcool a 20%, observou-se $1,5 \cdot 10^6$ leveduras por mL do meio, com presença de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos.



DISCUSSÕES

9 Discussões

Comparando os resultados das leituras de 24, 48, 72 com a de 96 horas, acima citados (Tabela 1), nota-se que na leitura de 24, 48 e 72 horas houve formação de pseudo-hifas e ausência de múltiplos brotamentos para o tubo tratado com *C. officinalis*, enquanto na leitura de 96 horas ocorreu formação de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos, quando comparados ao grupo controle (RPMI). Tais resultados demonstram que o Extrato Fluído Etanólico de *C. officinalis*, não apresenta atividade antifúngica, pois não inibe o crescimento do fungo, mas parece retardar seu total desenvolvimento. O grupo tratado com o álcool não revelou resultados diferentes quando comparado ao grupo controle (RPMI).

Embora o efeito antifúngico do Extrato Fluído Etanólico sobre a *Candida albicans* (ATCC 10231) *in vitro* não tenha sido observado nesse trabalho, foi possível notar a ausência de múltiplos brotamentos, nos tempos de 24, 48 e 72 horas quando comparado ao grupo controle. No tempo de 96 horas observou-se formação de pseudo - hifas e múltiplos brotamentos. Isso pode ter ocorrido, pois a *C. officinalis* é uma droga que pertence ao grupo químico dos glicosídeos flavônicos, conforme citado anteriormente. De acordo com Costa (1977), este grupo apresenta um núcleo benzopirano (Figura 3), que absorvem radiações ultravioletas. Esta propriedade pode em parte ter interferido na atividade antifúngica da *C. officinalis*, pois durante os experimentos biológicos os tubos estiveram em contato parcial com a luz durante uma semana nos horários de leitura. Embora a *C. officinalis* não tenha apresentado atividade antifúngica para *C. albicans*, de acordo com Fenner et al. (2006), a mesma apresenta aplicações terapêuticas antimicótica, antiinflamatória e cicatrizante, além de pertencer ao grupo dos flavonóides de importância farmacológica antitumoral, antiinflamatória, antiviral e antioxidante Simões et al. (2003), o que torna viáveis investigações científicas posteriores com a espécie, entre elas a pesquisa para o fungo dermatófito.

Tabela 1 – Análise comparativa do número de leveduras em meio RPMI, meio RPMI acrescido de fluconazol, álcool e extrato fluído de calendula nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas.

	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
RPMI	$1,8 \cdot 10^6^*$	$1,7 \cdot 10^6^*$	$1,9 \cdot 10^6^*$	$1,9 \cdot 10^6^*$
Fluconazol	$6,4 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^4$	—	—
Álcool	$8 \cdot 10^5^*$	$1 \cdot 10^6^*$	$1 \cdot 10^6^*$	$1,5 \cdot 10^6^*$
Calêndula	$1,8 \cdot 10^6^{**}$	$1,8 \cdot 10^6^{**}$	$1,1 \cdot 10^6^{**}$	$1,9 \cdot 10^6^*$

* formação de pseudo-hifas e múltiplos brotamentos

** formação de pseudo-hifas e ausência de múltiplos brotamentos



CONSIDERAÇÕES FINAIS

10 Considerações Finais

Neste modelo experimental, o extrato fluído etanólico de *C. officinalis* L. a 20% não apresentou atividade antifúngica sobre leveduras do gênero *Candida*, pois não inibiu o crescimento do fungo, além de permitir a formação de pseudo-hifas. Entretanto, nota-se diminuição de múltiplos brotamentos quando comparado ao grupo controle. Esses resultados precisam ser reavaliados em outras condições, mas principalmente com o aumento da concentração do extrato vegetal.



REFERÊNCIAS

11 Referências

AMITA, M. M. R. et al. Posibilidades de control de enfermedades a partir de productos naturales y controles biológicos en las plantas medicinales. **Revista Cubana Plant Med.**, Cuba, v. 9, n.3, p. 1-4, 2004.

BRASIL, Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **VISALEGIS**: D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004.

CARVALHO, J. C. T. Formulário Médico – **Farmacêutico de Fitoterápia**. 2ed. São Paulo: Pharmabooks, 2005.

CECHINELI, V. F. **Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudo desenvolvido no NIQFAR/UNIVALI**. Química Nova. v. 23. n 5. São Paulo. set./out. 2000.

CORDEIRO, C. H. G.; CHING, C. M.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações Medicamentosas de Fitoterápicos e Fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Micoses Superficiais**, São Paulo, ano XVI, n. 94, p. 88-95, set. /out. 2006. ISSN 1807-166X.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. vol II. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1977. p. 1117.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: arte e ciências, um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996.

EBI, K. Disponível em: <livingwilderness.com/seasons/calendula.html>. Acesso em: 15 maio 2007.

FRANCO, S. L.; CARDOSO, M. L. C. **Controle de Qualidade de Fitoterápicos**. São Paulo, 1998. p 79. Apostila.

FENNER, R. et al. Plantas Utilizadas na Medicina Popular Brasileira com Potencial Atividade Antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Rio Grande do Sul, v. 42, n. 3, p. 1-26, jul./set., 2006.

LACAZ, C. S., PEHINATI, A. H. et al. Ecologia das leveduras do Gênero *Candida* [EPU,EDUSP]. *Candidíases*, São Paulo, 1980.

LA LUZ, L. A.; FERRADÁ, C. R.; GOVÍN, E. S. Instructivo Técnico de *Calendula officinalis*. **Revista Cubana de Plantas Medicales**, Cuba, v. 2001, n. 1, p. 1-7, abr. 2001. ISSN 1028-4796.

LEITE, Flávio. Controle de Qualidade em Fitoterápicos. **Fitoterápicos**, São Paulo, ano VI, n. 37, p. 49-52, nov. /dez. 2005. ISSN 1807-1678.

MARQUES, Luís Carlos. Plantas Utilizadas em Patologias do Trato Gastrointestinal. **Fitoterápicos**, São Paulo, ano XII, n. 71, p. 18-36, nov. /dez. 2002.

MELO, A.S.A.; SERAFIM, R. C.; BRIONES, M. R. S. **Identificação de genes hifa-específicos de *Candida albicans* utilizando o método de hibridização diferencial**. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP, São Paulo, 2002.

MIRANDA, K. C. et al. **Identificação de levedura do gênero *Cândida* nas unhas e em descamação de pele em Goiânia (GO), durante o ano de 2003.**

NOBRE, M. O. et al. Drogas Antifúngicas para Pequenos e Grandes Animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 1-25, jan./fev. 2002. ISSN 0103-8478.

PRISTA, L. N.; ALVES A. C. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. ed 3. vol. II. Fundação Caloust Gulbenkian: Lisboa, 1990.

RODRIGUES, Eliana. A Parceria Universidade - Empresa Privada na Produção de Fitoterápicos no Brasil. **Fitoterápicos**, São Paulo, ano VI, n. 37, p. 30-39, nov. /dez. 2005. ISSN 1807-1678.

SADVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 27-36.

SIDRIM, J. J. C. ; MOREIRA, J. L. D. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ed. rev. Porto Alegre, Florianópolis: Universidade/ UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C. e CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, jan./feb. 2001, vol.24, n.1, p.147-152. ISSN 0100-4042.



ANEXOS

Anexo A – Plantas utilizadas para o tratamento de sinais e sintomas indicativos de infecções fúngicas.

Plantas utilizadas na medicina popular brasileira

373

TABELA I - cont.

Família Vegetal	Nome Científico Válido	Nome Científico (Referência Original)	Nome Popular	Parte Vegetal Utilizada/Produto Extrativo	Uso Popular	Referências
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia triangularis</i> Cham.	<i>Aristolochia triangularis</i> Cham. et Schl. <i>A. triangularis</i> Cham.	Cipó-mil-homens, cipó-de-cobra, mil-homens-do-rio-grande, cipó-jarrinha	Caulé, raiz Folhas, caules, raízes	Manifestações ulcerosas anti-séptico	Reitz, 1950 Simões <i>et al.</i> , 1998
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia trilobata</i> L.	<i>Aristolochia trilobata</i> L. <i>A. trifida</i> Lam., <i>A. caracasana</i> Spreng., <i>Howardia trifida</i> Klotzse	Urubu-caá, angelicó, calunga	Raiz Folhas	Anti-séptico, úlceras crônicas	Van den Berg, 1982; Di Stasi, <i>et al.</i> , 1989 Van den Berg, 1982
Asclepiadaceae	<i>Asclepias curassavica</i> L.	<i>Asclepias curassavica</i> L.	Oficial-de-sala	Raiz	Leucorréia	Freise, 1933
Asteraceae	<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze	<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze	Amor-de-negro, mata-pasto, picão-da-praia	Folhas e raízes	Úlceras, feridas, micoses	Lorenzi e Matos, 2002
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Achillea millefolium</i> L.	Mil-folhas	Extremidades floridas	Úlceras, feridas	Simões <i>et al.</i> , 1998
Asteraceae	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	Marcela, macela	Inflorescências	Anti-séptica	Simões <i>et al.</i> , 1998
Asteraceae	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	Ambrosia-americana	Folhas, sumidades floridas	Leucorréia	Reitz, 1954
Asteraceae	<i>Arctium minus</i> (Hill.) Bernh.	<i>Lappa minor</i> DC.	Bardana	Raízes, folhas	Dermopatias	D'Ávila, 1910
Asteraceae	<i>Arnica montana</i> L.	<i>Arnica montana</i> Linn. <i>A. montana</i> L.	Arnica	Raiz Capítulos florais	Anti-séptica	Caminhoá, 1877 Moreira Filho e Golteher, 1972 Caminhoá, 1877
Asteraceae	<i>Aster helenium</i> (L.) Scop.	<i>Inula helenium</i> Linn.	Enula	Raiz	Dartro	Caminhoá, 1877
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	Alecrim-do-mato	Folhas	Feridas	Freise, 1933
Asteraceae	-	<i>Baccharis silvestris</i> L.	Alecrim-do-mato	Folhas	Feridas	Freise, 1933
Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) A. P. de Candolle	Carqueja, carqueja-amargosa	Partes aéreas	Feridas, ulcerações	Simões <i>et al.</i> , 1998
Asteraceae	<i>Baccharis vulneraria</i> Baker	<i>Baccharis vulneraria</i> Baker	Herva-santa	Folhas	Feridas	Freise, 1933
Asteraceae	<i>Bidens cinapiifolia</i> Kunth	<i>Bidens bipinnata</i> L.	Carrapicho-de-duas-pontas, picão-preto	Parte aérea	Leucorréia	Di Stasi <i>et al.</i> , 1989
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> L.	<i>Bidens pilosus</i> L.	Picão	Planta inteira n.i.	Úlceras sórdidas Úlceras	Freise, 1933 Orth, 1937
Asteraceae	<i>Calendula officinalis</i> L.	<i>Calendula officinalis</i> L.	Bonina, calêndula, flor-de-todos-os-mares, malmequer	Flores Inflorescências	Anti-séptico, feridas, úlceras, micoses	Santos <i>et al.</i> , 1988 Lorenzi e Matos, 2002
Asteraceae	<i>Chaptalia nutans</i> (L.) Pol.	<i>Chaptalia nutans</i> Hemsley <i>C. nutans</i> Hemse	Língua-de-vaca	n.i. Folhas	Úlceras diversas	D'Ávila, 1910 Orth, 1937
Asteraceae	<i>Conoclinium</i> sp.	<i>Conoclinium</i> sp.	Caperiçoba	n.i.	Úlceras	Moreira, 1871
Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i> L.	<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofra	Folhas, raízes	Ácido úrico	Santos <i>et al.</i> , 1988
Asteraceae	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	Flor-roxa-cônica, cometa-roxo	n.i.	Antimicrobiano, anti-séptico	Lorenzi e Matos, 2002
Asteraceae	<i>Elephantopus mollis</i> Kunth	<i>Elephantopus mollis</i> Kunth	Erva-grossa, língua-de-vaca, fumo-bravo, erva-da-diabo	Folhas frescas	Anti-séptico, úlceras e feridas, micoses	Lorenzi e Matos, 2002
Asteraceae	<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	Perna-de-saracura	Folhas	Úlceras crônicas e tórpidas	Freise, 1933
Asteraceae	<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	Picão-branco, botão-de-couro, fazendeiro	n.i. Folhas	Feridas	Orth, 1937 Lorenzi e Matos, 2002

Fonte: FENNER, et al., 2006.

Anexo B - Marcadores farmacológicos da *Calendula officinalis* L. e parte encontrada.*Calendula officinalis* L.

Marcadores	Parte Encontrada
1,2-urseno-3,6,21-triol	Planta
4- α -metil-24-metileno-colest-7en-3beta-ol	Planta
4- α -metilestigmasta-7,24(28)-dien-3beta-ol	Planta
4-beta-metilestigmasta-7,24(28)-dien-3beta-ol	Planta
5-fitiltoluquinona	Planta
6-fitiltoluquinona	Planta
7-metiltocol	Planta
8-metil-tocol	Planta
ácido caféico	Planta
ácido laurico	Planta
ácido p-cumárico	Planta
α -tocoferolquinona	Planta
calendol	Planta
calendrina	Planta
citroxantina	Planta
fucostanol	Planta
kaempferol	Planta
plastoquinona	Planta
quercetina	Planta
rubixantina	Planta
saponosídeos	Planta
ursa-12-ene-3beta,16beta,21-triol	Planta
ursadiol	Planta
violaxantina	Planta
2,4-metileno-colesterol	Flor
4-beta-metilestigmasta-7,24(28)-dien-3-beta-ol	Flor
9'-cis-luteína	Flor
28-isofucosterol	Flor

ácido clorogênico	Flor
ácido gentísico	Flor
ácido málico	Flor
ácido oleanólico	Flor
ácido p-hidroxi-benzóico	Flor
ácido p-hidroxifenilacético	Flor
ácido pentadecanóico	Flor
ácido vanílico	Flor
ácido cerílico	Flor
alfa- amirina	Flor
auroxantina	Flor
arnadiol	Flor
beta-amirina	Flor
beta-caroteno	Flor
beta-sitosterol	Flor
estigmasterol	Flor
fitoflueno	Flor
calendina	Flor
calenduladiol	Flor
campesterol	Flor
carotenóides	Flor
cariofileno	Flor
cis-flavoxantina	Flor
cis-luteoxantina	Flor
eritrodiol	Flor
faradiol	Flor
flavonóides	Flor
flavoxantina	Flor
heliantriol-C	Flor
heliantriol-F	Flor
isoramnetina -3- glicosídico	Flor
isoramnetina - 3- o - rutinosídeo	Flor

isoramnetina - 3- rutinosídeo	Flor
lapenetriol	Flor
longispinogenina	Flor
lup- 20(29)- ene- 3beta, 16beta, 28- triol	Flor
lupeol	Flor
luteína	Flor
luteína- epóxido	Flor
luteoxantina	Flor
licopeno	Flor
maniladiol	Flor
metil- pentose	Flor
mutaxantina	Flor
neolicopeno	Flor
olean- 12-ene-3beta, 16beta, 28-triol	Flor
pseudotaraxasterol	Flor
taraxasterol	Flor
tanino pirrogalico	Flor
rutina	Flor
tarax-20-eno-3beta,16beta,22alfa-triol	Flor
Tarax-20-eno-3beta,16beta,30-triol	Flor
ursatriol	Flor
24-metilcolest-5,22-dien-3-beta-ol	Semente
24-metilcolest-7-em-7-beta-ol	Semente
ácido trans-8, trans-10,cis-12-octadecatrienico	Semente
ácido 9-hidroxi- trans-10,cis- 10-octadecadienico	Semente
ácido dimorfecolico	Semente
ácido linoléico	Semente
ácido linolênico	Semente
ácido mirístico	Semente
ácido oléico	Semente
ácido palmítico	Semente
ácido palmitoleico	Semente

colest- 7-em-3-beta-ol	Semente
estigmast-7-em-3-beta-ol	Semente
estigmastanol	Semente
calendulosídeos	Raiz
campestanol	Raiz
ubiquinona	Raiz

Anexo C – Certificado de Análise da *Calendula officinalis* L.

Botucatu, 12 de setembro de 2007.

Certificado de Análise

Matéria Prima: Calendula
Parte Usada: Flor
Nome Científico: *Calendula officinalis* Linné
Lote: 204040036
Validade: 04/2009

Análises	Especificação	Resultado
Macroscopia	Positiva	Positiva
Flavonoides Totais	Informativa	0,66%
Cromatografia Camada Delgada (CCD)	Positivo para Flavonóides	Positivo
Cinzas Totais	Máx. 12%	8,47%
Cinzas Insolúveis em Ácido	Máx 3,0%	0,24%
Umidade	Máx. 15 %	14,09%

Referencias:

- 1- Macroscopia/Umidade/Cinzas Totais/Cinzas Insol. em Ácido:
Farmacopéia Brasileira IV edição. Ed Atheneu: São Paulo, 1988.
- 2- CCD:
Wagner, H; Blatt, S Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. 2 edition. Springer: New York, 1995



Reinaldo Aparecido de Souza
 Gerente de Qualidade
 Responsável Técnico
 CRF/SP/24.284

GRUPO CENTROFLORA – Escritório Comercial Rod. Eduardo Zuccari, Km 21,5 CEP 18603-970 Cx. Postal 254 Botucatu SP
 Fone: 14 3811 3520 Fax: 14 3611 3506 E-mail: sac@centroflora.com.br Web: www.centroflora.com.br
EUROPA Bracom S.A. - Breitenweg 10 CH-6370 Stans Switzerland Fone: +41 41 612 3355 Fax: +41 41 612 3357
 E-mail: info@bracom-sa.ch Web: www.bracom-sa.ch
USA RFI Ingredients Inc. - 300 Corporate Drive Suite 14 Blauvelt NY 10913 USA Fone: +1 845 358 8600 Fax: +1 845 358 9003
 E-mail: rfi@rfiingredients.com Web: www.rfiingredients.com

