



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ISABELA AMÊNDOLA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS GLICÓLICOS
VEGETAIS SOBRE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS**

2018

ISABELA AMÊNDOLA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS GLICÓLICOS VEGETAIS
SOBRE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Amêndola, Isabela

Potencial antimicrobiano de extratos glicólicos vegetais sobre bactérias anaeróbias / Isabela Amêndola. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
48 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. Plantas medicinais. 2. Bactérias anaeróbias. 3. Biofilme. 4. Antimicrobiano. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Associada Luciane Dias de Oliveira (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

Universidade de Taubaté (Unitau)

Instituto Básico de Biociências

Campus de Taubaté

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back-Brito

Fundação Universitária Vida Cristã (FAPI-Funvic)

Faculdade de Pindamonhangaba

Campus de Pindamonhangaba

Profa. Associada Luana Marotta Reis de Vasconcello

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dr. Jônatas Rafael de Oliveira

São José dos Campos, 03 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Primeiramente, dedico este trabalho à Deus, pois em inúmeras situações esteve comigo por meio da minha fé e, sem dúvidas, sozinha não teria conseguido chegar ao fim de mais esta etapa de vida.

*Ao meu namorado **Matheus Santos Castilho** por todos os momentos de apoio, paciência, amparo total e amor. Sem você, com toda a certeza, teria sido impossível.*

*À minha tia **Rita de Cássia Amêndola**, pelo carinho e amor dedicados a mim e que fizeram parte da minha formação, permitindo que eu me tornasse uma pessoa melhor.*

*Aos meus sogros, **Adriana Mara Santos Castilho** e **Armando Sebastião Castilho**, por estarem presentes durante um momento tão importante e difícil da minha vida, sempre me apoiando e me ajudando a chegar até aqui.*

*Ao meu pai, **Francisco Amêndola Neto**, por ter me dado a vida e por ter me ajudado a alcançar meus objetivos mais distantes.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por permitir o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP de São José dos Campos por todo apoio.

À secretaria da Pós-Graduação, ao Bruno, Sandra e Carol por toda a dedicação, disposição e eficiência a mim dedicados durante todo esse tempo.

À professora Luciane Días de Oliveira por toda dedicação, paciência e confiança a mim concedidos durante toda a elaboração deste sonho.

Aos amigos conquistados durante esta etapa, em especial à Fábíia Lugli Sper, Juliana Guimarães dos Santos e Lucas de Paula Ramos por toda a amizade, ajuda e amparo. Nossa jornada juntas tornou tudo mais leve.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos, mesmo que esses pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Extratos vegetais	15
3.2 Cultivo das bactérias.....	15
3.3 Padronização das suspensões bacterianas.....	16
3.4 Atividade antibacteriana sobre culturas planctônicas.....	16
3.5 Atividade antibiofilme	17
3.6 Análise estatística	188
4 RESULTADOS.....	19
4.1 Atividade antibacteriana sobre culturas planctônicas.....	19
4.2 Atividade antibiofilme	20
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXOS.....	45

Amêndola I. Potencial antimicrobiano de extratos glicólicos vegetais sobre bactérias anaeróbias [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

A resistência microbiana aos antibióticos disponíveis é preocupação constante, devido à dificuldade no tratamento de infecções causadas por cepas resistentes, em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos. Assim, a busca por terapias antimicrobianas alternativas tem sido crescente e necessária, sendo a fitoterapia umas das opções de escolha. O objetivo do presente estudo foi analisar a atividade antibacteriana de extratos glicólicos de *Achyrocline satureioides* (macela), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Hamamelis virginiana* (hamamelis) e *Persea americana* (abacateiro), pelos períodos de 5 min e 24 h de exposição sobre bactérias anaeróbias *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*, em culturas planctônica e biofilmes. As bactérias armazenadas a -80°C foram ativadas em caldo Brucella enriquecido (hemina 1%, menadiona 1% e sangue de carneiro desfibrinado 5%) e incubadas em câmara de anaerobiose por 48 h a 37°C por sete dias. A partir de culturas puras, o teste de microdiluição em caldo foi conduzido em microplacas por meio de suspensões bacterianas padronizadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e diluições dos extratos em caldo, sendo as placas incubadas por 48 h a 37°C em anaerobiose. Alíquotas de cada poço foram semeadas em ágar Brucella enriquecido. Após incubação, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram determinadas. As concentrações efetivas de cada extrato foram aplicadas sobre os biofilmes de cada espécie, formados em microplacas a partir de suspensões bacterianas puras padronizadas na escala 0,5 de McFarland. As microplacas foram incubadas por sete dias a 37°C para formação dos biofilmes, sendo o meio trocado a cada 48 h. Os biofilmes foram tratados por 5 min e 24 h. Em seguida, foram lavados e desprendidos por homogeneizador ultrassônico. As suspensões diluídas foram adicionadas em ágar Brucella enriquecido. Após 48 h, as Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) foram determinadas. Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ou por Kruskal-Wallis e teste Dunns, ambos com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Sobre as culturas planctônicas, a CIM e CBM dos extratos foi determinada apenas para *F. nucleatum*. A CBM dos extratos de *A. satureioides*, *C. scolymus* e *P. americana* foi obtida sobre *P. micra*. Não foi obtida atividade bactericida para *P. endodontalis* e *P. gingivalis*. Sobre biofilmes, todas as espécies apresentaram reduções significativas quando expostas aos extratos em ambos os tempos. Pode-se concluir que os extratos testados apresentaram efeito bacteriostático sobre *F. nucleatum*. Atividade bactericida dos extratos foi observada sobre *F. nucleatum*, bem como sobre *P. micra*, exceto para *H. virginiana*. Os extratos avaliados também apresentaram efeito antibiofilme sobre *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis* por 5 min e 24 h de exposição.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Bactérias anaeróbias. Biofilme. Antimicrobiano.

Amêndola I. Antimicrobial potential of plant glycolic extracts on anaerobic bacteria [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Microbial resistance to antibiotics available is constant concern, due to the difficulty in treating infections caused by resistant strains as a result of the indiscriminate use of antimicrobials. Thus, the search for antimicrobial alternative therapies has been growing and necessary, being one option the herbal medicine. The objective of the present study was to analyze the antibacterial activity to Achyrocline satureioides glycolic extracts (macela), Cynara scolymus (artichoke), Hamamelis virginiana (Witch-Hazel) and Persea americana (avocado), for periods of 5 min and 24 h from exhibition on anaerobic bacteria Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum, Parvimonas micra, Porphyromonas gingivalis and Porphyromonas endodontalis in planktonic communities and biofilms. Bacteria stored at -80°C have been activated in Brucella broth enriched (hemin 1%, menadione 1% and defibrinated sheep blood 5%) and incubated in anaerobiose chamber for 48 h at 37° C for seven days. From pure cultures, the microdiluição test in broth was conducted in microplates through standardized bacterial suspensions in sterile saline solution (NaCl 0.9%) and dilution of the extracts in broth, being incubated plates for 48 h at 37° C in anaerobiosis. Aliquots of each well were sown in Brucella agar enriched. After incubation, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined. Effective concentrations of each extract were applied on the biofilms of each species, formed in microplates from pure bacterial suspensions in 0.5 McFarland scale standard. The microplates were incubated for 7 days at 37°C for the formation of biofilms, being the culture medium replaced every 48 h. Biofilms were treated for 5 min and 24 h have been washed and given off by ultrasonic homogenizer. Dilute suspensions were added in Brucella agar enriched. After 48 h, the Colony Forming Units per milliliter (CFU/ml) were determined. The results were analyzed by ANOVA and Tukey test, or Kruskal-Wallis test and Dunns, both with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). On the planktonic cultures, CIM and CBM of extracts was determined only to F. nucleatum. The CBM of the extracts of A. satureioides, C. scolymus and P. americana was obtained on P. micra. Bactericidal activity was not obtained for P. endodontalis and P. gingivalis. About biofilms, all species exhibited significant reductions when exposed to the extracts in both times. It can be concluded that the extracts tested showed bacteriostatic effect on F. nucleatum. Bactericidal activity of extracts was observed on F. nucleatum and P. micra, except for H. virginiana. The extracts evaluated also presented antibiofilme effect on F. nucleatum, P. micra, P. endodontalis and P. gingivalis for 5 min and 24 h.

Keywords: Medicinal plants. Anaerobic bacteria. Biofilm. Antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

Fitoterápicos são medicamentos de origem exclusivamente vegetal, em que qualidade, eficácia e segurança devem ser comprovados clínica e cientificamente. Além disso, estes produtos não podem conter princípios ativos isolados, substâncias purificadas de origem sintética, semissintética ou natural e de origem animal, nem mesmo quando adicionados a um extrato vegetal (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015).

As atividades biológicas presentes nas plantas medicinais têm instigado a comunidade científica e vem favorecendo as pesquisas em diversas áreas a cerca de funções dos compostos químicos existentes em espécies vegetais, a fim de serem descobertos novos medicamentos, a partir de produtos naturais, com baixo custo e facilidade de acesso. As espécies *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., *Cynara scolymus* L., *Hamamelis virginiana* L. e *Persea americana* Mill., que foram utilizadas no presente trabalho foram caracterizadas a seguir (Atanasov et al., 2015).

A. satureioides (LAM.) DC. é uma espécie vegetal nativa da América do Sul, Europa e África, pertencente à família Asteraceae (Casero et al., 2013). Popularmente conhecida como macela, é uma planta medicinal comumente utilizada no Brasil e frequentemente encontrada nos Estados do Sul e Sudeste. A vasta utilização desta espécie se deve à sua composição química rica em flavonóides, cumarinas, ácidos fenólicos, dentre outros (Alerico et al., 2015). A variedade de componentes químicos encontrada em *A. satureioides* (LAM.) DC. proporciona muitas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antihiperglicemiante e antitumoral (Cariddi et al., 2015).

Outra espécie vegetal de grande importância é *C. scolymus* L., uma planta herbácea, de origem no Sudeste do Mediterrâneo e Norte da África, membro da família Asteraceae (Ben Salem et al., 2017b). Conhecida por alcachofra, é uma espécie vegetal de grande valor nutricional, sendo as folhas da cabeça da alcachofra utilizadas como alimento. Os benefícios da alcachofra à saúde humana têm sido relacionados à presença de grandes quantidades de compostos fenólicos nas inflorescências imaturas, além de fibras, potássio e cálcio (Rouphael et al., 2017). As folhas da alcachofra têm sido utilizadas como coleréticas, hepatoprotetivas, anti-

inflamatórias, antioxidantes, além de inibidoras da biossíntese de colesterol (Ben Salem et al., 2017a).

H. virginiana L. também apresenta relevância medicinal. É uma espécie vegetal arbustiva, nativa da região oriental da América do Norte e classificada como componente da família Hamamelidaceae (Duckstein et al., 2012). Popularmente conhecida como hamamelis, é uma planta muito utilizada para tratamento de lesões dérmicas, hemorroidas e pequenos ferimentos, devido à sua atividade adstringente, antiflogística, antioxidante e antisséptica (Mouchrek Junior et al., 2015). Taninos, pseudotaninos, taninos hidrolisáveis são alguns dos compostos encontrados em extratos produzidos a partir de folhas do vegetal, além de hamamelitanino, ácido gálico e ácido tânico (Theisen et al., 2014).

P. americana Mill. é uma espécie vegetal original da América Central e México, pertencente à família Lauraceae. Comumente conhecida por abacate, seus frutos têm alto valor nutricional, sendo compostos por minerais, vitaminas, proteínas, fibras e ácidos graxos insaturados benéficos à saúde (Tremocoldi et al., 2018). A casca e semente deste fruto são compostas quimicamente por flavonoides, ácidos fenólicos e taninos e, devido a essa constituição, algumas atividades biológicas, como atividade anti-inflamatória e antioxidante, lhe são atribuídas (Soldera-Silva et al., 2018).

As espécies vegetais citadas anteriormente são apenas algumas, dentre uma infinidade de plantas, capazes de curar doenças. Com isso, é necessário o desenvolvimento de pesquisas mais detalhadas, em relação à descoberta de novas substâncias antimicrobianas que poderiam ser utilizadas para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes aos antimicrobianos convencionais (Besra, Kumar, 2018). Atividade antimicrobiana é um dos efeitos mais almejados pelos grupos de pesquisa, devido ao avanço da resistência microbiana aos fármacos disponíveis (Gupta, Birdi, 2017).

A cavidade oral possui mais de 750 espécies microbianas que podem se agrupar e formar biofilme (Saleem et al., 2016), isto é, um conjunto de células microbianas, aderidas a superfícies rígidas bióticas ou abióticas, envolto por uma matriz polissacarídica extracelular, que pode ser até mil vezes mais resistente aos agentes antimicrobianos, em relação às células planctônicas (Stewart, 2015).

Em uma cavidade bucal saudável, estão presentes espécies de bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas, constituindo assim um ambiente heterogêneo. Essa heterogeneidade prevalece mesmo quando ocorre o aparecimento de gengivite e progressão para doenças periodontais mais severas. Estas últimas se dão por meio da sucessão ecológica bacteriana com predominância de determinadas espécies Gram-negativas anaeróbias que se depositam na forma de biofilme subgengival em nichos da cavidade oral com menor tensão de oxigênio. A progressão da doença leva ao desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos, que afetam os tecidos periodontais, levando à destruição da matriz extracelular e reabsorção do osso alveolar com consequente perda do elemento dental (Kornman et al., 1997; Sudhakara. et al., 2018).

P. gingivalis, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* são espécies bacterianas anaeróbias que compõe o complexo vermelho; *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Campylobacter* são gêneros que pertencem ao complexo laranja, bem como as espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eubacterium nodatum*, *P. intermedia*, *P. micra*. Todos os gêneros e espécies citados acima estão fortemente associados ao desenvolvimento da doença periodontal (Pérez-Chaparro et al., 2014).

Os gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* envolvem bacilos Gram-negativos produtores de pigmento negro quando cultivados em agar sangue, frequentemente associados a formas destrutivas da doença periodontal. *P. gingivalis* é encontrada com maior frequência em lesões mais avançadas, enquanto que *P. intermedia* está associada à periodontite crônica e gengivite ulcerativa necrosante aguda e *P. endodontalis* associada à infecção endodôntica (Teanpaisan et al., 1998; de Lima et al., 2018).

Estudos têm demonstrado que dentes acometidos por doenças pulpares podem apresentar diferenças na constituição da microbiota endodôntica. Essa diferença de composição microbiana pode levar ao aparecimento ou não de sintomas, que podem estar relacionados à virulência dos micro-organismos envolvidos no local da infecção (Sakamoto et al., 2006).

Em estudo realizado por Rôças e Siqueira (2018) foi verificada uma prevalência de 40 táxons bacterianos em amostras retiradas de abscessos apicais e de dentes com doença periodontal assintomática. Os autores constataram que *P. endodontalis* foi a mais prevalente das espécies (59%), seguida por *F. nucleatum*

(55%), *Dialister invisus* (50%), *Olsenella uli* (49%), *P. micra* (48%) e *Prevotella baroniae* (41%).

F. nucleatum é uma bactéria Gram-negativa, fusiforme (Ghosh et al., 2018), frequentemente associada à formação de biofilme dental, facilitando de maneira mutualística a adesão de micro-organismos tardios, como *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* (Henne et al., 2018). *F. nucleatum* também está associado às doenças sistêmicas, como infecções respiratórias, alterações gastrointestinais, aterosclerose e artrite reumatoide (Vander Haar et al., 2018). Estudos têm indicado que *F. nucleatum* pode ter desenvolvido resistência às defensas do hospedeiro, utilizando como estratégia de virulência para desenvolvimento de infecções extra orais, por meio da invasão às células epiteliais, levando a complicações de doenças sistêmicas (Han et al., 2000; Ghosh et al., 2018).

P. micra é um coco, anaeróbio, Gram-positivo, membro comensal da microbiota bucal e pode, portanto, causar doenças oportunistas (Uemura et al., 2014), sendo comumente associado ao desenvolvimento de infecções gengivais e periapicais. Tem sido relatado que o comprometimento periapical pode levar a complicações graves, como celulite e septicemia (Rôças, Siqueira, 2012; Willmann et al., 2018). Além disso, foi sugerido que *P. micra* pode estar associada ao desenvolvimento de meningite após extração dentária (Ko et al., 2015), bem como, meningite pode estar ligada à osteomielite vertebral e abscessos peridurais (Frat et al., 2004; Uemura et al., 2014).

Pesquisas utilizando extratos de plantas medicinais e bactérias anaeróbias ainda são raros, mas um trabalho realizado com extratos vegetais de raízes de *Althaea officinalis* L., flores de *Arnica montana* L. e *Calendula officinalis* L., folhas de *H. virginiana* L. e *Melissa officinalis* L. e frutos de *Illicium verum* Hook. sobre estes micro-organismos responsáveis por causarem doenças periodontais, indicaram eficiente atividade antibacteriana contra a maioria das espécies testadas, sugerindo uso tópico profilático de medicações desenvolvidas a partir de extratos alcóolicos de *H. virginiana* L., *A. montana* L. e *A. officinalis* L (Iauk et al., 2003).

De acordo com a literatura utilizada e a necessidade de novas substâncias com atividade antimicrobiana contra micro-organismos resistentes aos medicamentos de uso convencional, o presente estudo se torna de grande importância, já que propõe a utilização de extratos vegetais de baixo custo e

facilidade de acesso sobre bactérias anaeróbias normalmente encontradas em infecções periodontais e endodônticas.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar a atividade antibacteriana de extratos glicólicos de *A. satureioides* (Lam) DC. (macela), *C. scolymus* L. (alcachofra), *H. virginiana* L. (hamamelis) e *P. americana* Mill. (abacateiro), pelos períodos de 5 min e 24 h de exposição, sobre bactérias anaeróbias das espécies *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. micra*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis* em culturas planctônicas e biofilmes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC) do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” do Campus de São José dos Campos – SP.

3.1 Extratos vegetais

Os extratos glicólicos de flores de *A. satureioides*, folhas de *H. virginiana* L. e talo e folhas de *P. americana* Mill., a 200 mg/mL foram cedidos pela empresa Mapric (São Paulo, Brasil), com os devidos laudos e especificações (ANEXOS A, B, C), bem como o extrato glicólico de folhas de *C. scolymus* L. a 200 mg/mL, cedido pela empresa Seiva Brasilis (São Paulo, Brazil), com o devido laudo e especificação (Anexo D).

3.2 Cultivo das bactérias

Foram utilizadas neste estudo cepas de referência (ATCC - American Type Culture Collection) de bactérias anaeróbias como *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. micra* (ATCC 23195), *P. endodontalis* (ATCC 35406) e *P. gingivalis* (ATCC 33277), provenientes do Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Unicamp, Campinas – SP, Brasil. As bactérias foram mantidas a -80°C até ativação em caldo Brucella (Acumedia, Michigan, USA) enriquecido (hemina 1% - Sigma-Aldrich Co. -, menadiona 1% - Sigma-Aldrich Co.- e sangue de carneiro desfibrinado estéril 5% - Newprov, Pinhais – PR, Brasil).

As culturas foram incubadas em câmara de anaerobiose (nitrogênio 80%, dióxido de carbono 10% e hidrogênio 10%) a 37°C por 48 h (Whitley DG250

Workstation, West Yorkshire, Reino Unido). Para verificação da pureza das culturas, as mesmas foram repicadas em ágar Brucella enriquecido.

3.3 Padronização das suspensões bacterianas

Colônias idênticas de culturas recentes com 48 h de incubação, foram coletadas para a padronização da suspensão microbiana na escala 0,5 de McFarland, em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%).

3.4 Atividade antibacteriana sobre culturas planctônicas

A metodologia utilizada para este teste foi baseada no *Clinical and Laboratory Standards Institute*, documento M11-A7 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). Em poços de placas de microtitulação (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), 100 µL de caldo Brucella suplementado foram adicionados. Apenas no primeiro poço de cada coluna, 100 µL de extrato foram adicionados, iniciando oito diluições seriadas com concentrações que variaram de 100 a 0,78 mg/mL. Alíquotas de 10 µL de suspensão bacteriana padronizada foram adicionadas em todos os poços. As microplacas foram incubadas em anaerobiose por 48 h a 37°C. Como controle de crescimento foi utilizado 100 µL de caldo Brucella enriquecido e 10 µL de suspensão bacteriana.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada no primeiro poço visualmente límpido, ou seja, sem crescimento microbiano aparente. Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), alíquotas de 20 µL de cada concentração dos extratos foram inoculadas em ágar Brucella enriquecido por meio da técnica da gota (Herigstad et al., 2001) e incubadas por até 7 dias a 37°C em anaerobiose. A técnica da gota é baseada na contagem de UFC/mL de alíquotas reduzidas (20 µL) de uma amostra. A diluição adequada da amostra representa uma gota contendo entre três e trinta colônias. A menor concentração capaz de inibir

completamente e crescimento bacteriano após o período de incubação foi considerada CBM.

3.5 Atividade antibiofilme

Em placas de microtitulação de 96 poços (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), foram adicionados 100 µL de caldo Brucella enriquecido e 100 µL da suspensão microbiana diluída em solução fisiológica estéril e padronizada na escala 0,5 de McFarland. As placas foram incubadas em anaerobiose por sete dias a 37°C, sendo o meio de cultura substituído a cada 48 h, sem lavagem dos biofilmes.

Após o período de incubação, o biofilme foi lavado três vezes com 200 µL de solução fisiológica estéril e tratado com cada um dos extratos por 5 min e 24 h em experimentos independentes. Depois da exposição ao extrato, o biofilme foi lavado com 200 µL de solução fisiológica estéril e desprendido por homogeneizador ultrassônico (Sonoplus HD 2200 – Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlim, Alemanha) com potência de 25% por 30 s. A suspensão gerada foi diluída e 20 µL desta foram adicionados em ágar Brucella enriquecido, por meio da técnica da gota (Herigstad et al., 2001). As placas foram incubadas por 48 h a 37°C em anaerobiose para posterior determinação de UFC/mL.

Solução fisiológica estéril foi utilizada como controle para o tempo de exposição de 5 min do biofilme ao extrato. Solução fisiológica e meio de cultura para o período de 24 h de exposição de acordo com cada concentração dos extratos.

Os biofilmes foram submetidos à ação de três diferentes concentrações de cada extrato, determinadas de acordo com o teste de microdiluição em caldo, para as espécies bacterianas em que a CBM do extrato não foi obtida, foram realizadas exposições às maiores concentrações possíveis com a CBM e duas concentrações superiores.

3.6 Análise estatística

Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados estatisticamente por ANOVA complementado por teste Tukey. Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste Dunns, ambos com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os resultados foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão, 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antibacteriana sobre culturas planctônicas

Os resultados obtidos com o teste da microdiluição em caldo podem ser analisados na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., *Cynara scolymus* L., *Hamamelis virginiana* L. e *Persea americana* Mill. sobre espécies bacterianas anaeróbias de *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*

Espécies vegetais	<i>F. nucleatum</i> CIM - CMM	<i>P. micra</i> CIM - CMM	<i>P. endodontalis</i> CIM - CMM	<i>P. gingivalis</i> CIM – CMM
<i>A. satureioides</i>	12,5 - 50	i - 50	i - R	i – R
<i>C. scolymus</i>	50 - 100	i - 100	i - R	i – R
<i>H. virginiana</i>	6,25 - 25	i - R	i - R	i – R
<i>P. americana</i>	12,5 - 50	i – 50	i - R	i – R

Legenda: Unidade de medida: mg/mL; i: indeterminado; R: resistente
Fonte: Elaborado pela autora

F. nucleatum foi sensível aos cinco extratos testados até a maior concentração obtida, 100 mg/mL. *H. virginiana* L. foi o extrato mais efetivo contra esta bactéria, seguido de *A. satureioides* (Lam) DC., *C. scolymus* L. e *P. americana* Mill.

P. micra também foi sensível à maioria dos extratos testados, sendo *A. satureioides* (Lam) DC. e *P. americana* Mill. os mais eficazes contra esta bactéria.

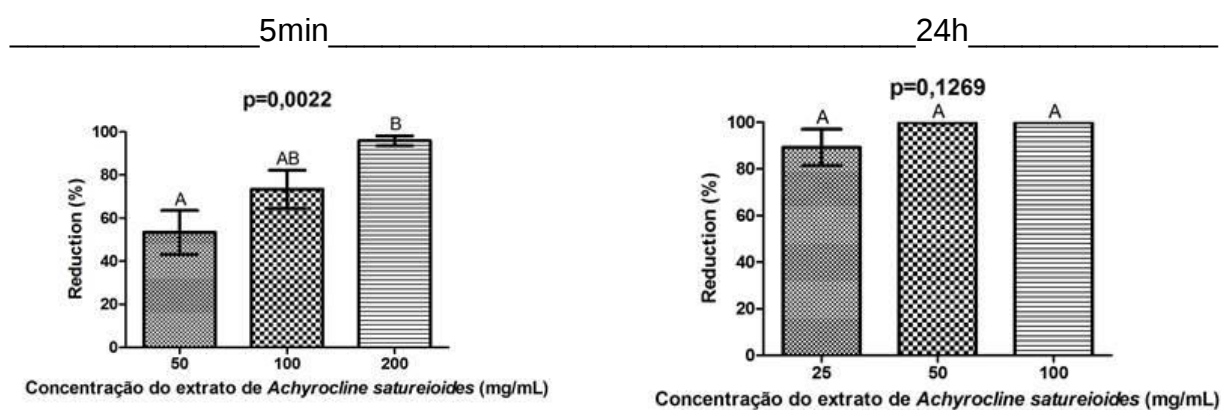
De acordo com a metodologia utilizada neste estudo, as maiores concentrações do extrato possíveis obtidas não foram efetivas sobre *P. endodontalis*

e *P. gingivalis* na forma planctônica.

4.2 Atividade antibiofilme

O percentual de redução dos biofilmes de *F. nucleatum* tratados pelo extrato de *A. saturoioides* (Lam) DC. por 5 min foi superior a 50%, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), sendo a concentração de 200 mg/mL a que apresentou maior redução ($p = 0,0022$). Em 24 h de contato com o extrato, o percentual de redução dos biofilmes foi superior a 80% em relação ao controle ($p < 0,05$), sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0,1269$) (Figura 1).

Figura 1 – Percentual de redução do biofilme de *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (ATCC 25586) tratado pelo extrato de *Achyrocline saturoioides* (Lam) DC. pelos períodos de 5 min e 24 h

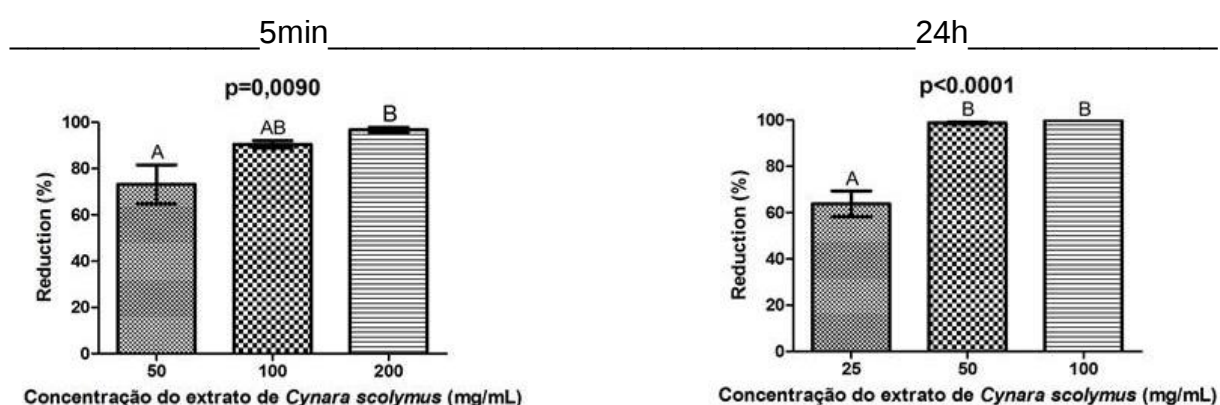


Fonte: Elaborado pela autora.

O contato de 5 min entre o extrato de *C. scolymus* L. e os biofilmes de *F. nucleatum* permitiu inibição do número de UFC/mL de pelo menos 60% na concentração de 50 mg/mL e superior a 95% nas demais concentrações, sendo 200 mg/mL a concentração que promoveu maior redução ($p = 0,0090$). Com inibição

bacteriana superior a 99%, 100 mg/mL e 200 mg/mL foram as concentrações mais ativas em 24 h (Figura 2).

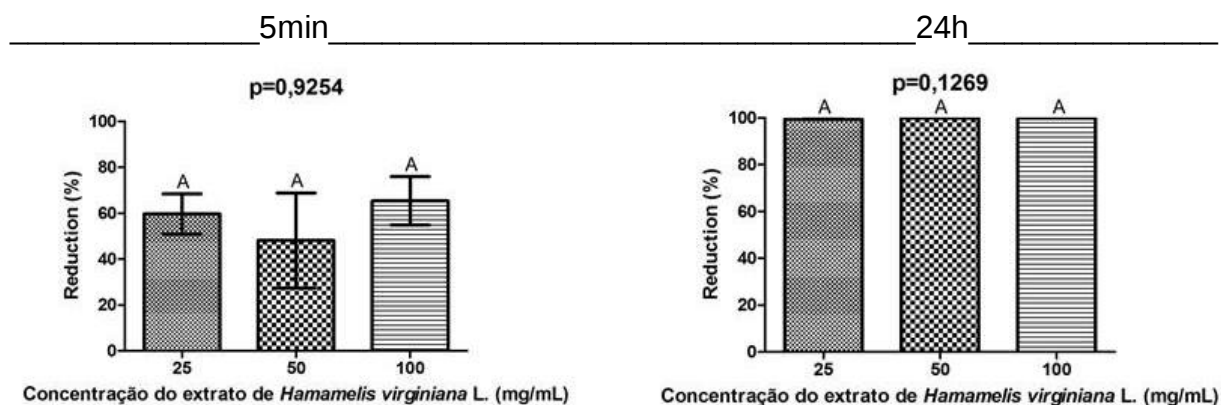
Figura 2 – Percentual de redução do biofilme de *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (ATCC 25586) tratado pelo extrato de *Cynara scolymus* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

A atividade antimicrobiana do extrato de *H. virginiana* L. sobre os biofilmes de *F. nucleatum* foi melhor representada pelo tempo de 24 h, quando a média de redução entre as concentrações foi superior a 99% em relação ao controle ($p<0,05$), sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,1269$) (Figura 3).

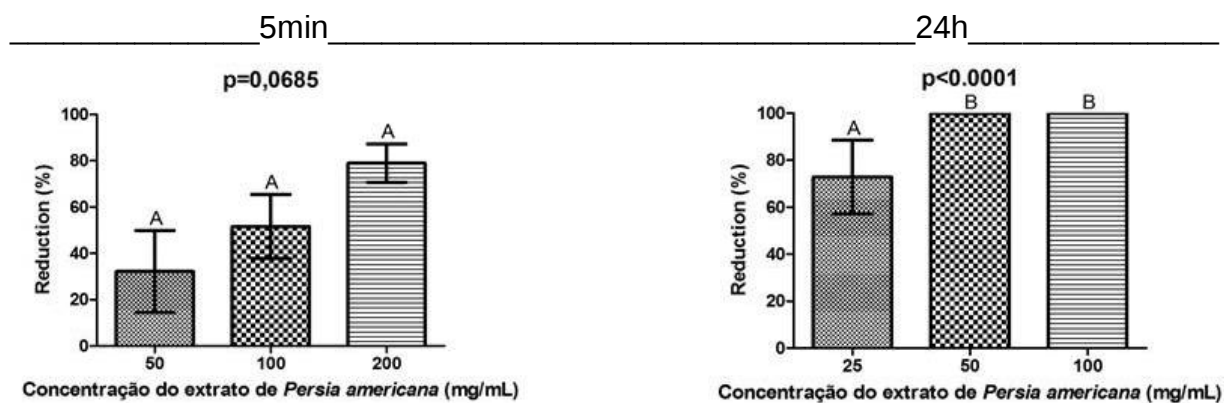
Figura 3 – Percentual de redução do biofilme de *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (ATCC 25586) tratado pelo extrato de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

Os biofilmes de *F. nucleatum* tratados pelo extrato de *P. americana* Mill. por 5 min reduziram em média 60% o número de UFC/mL, sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,0685$). Foi alcançada redução bacteriana acima de 99% no período de 24 h de contato com o extrato nas concentrações de 100 mg/mL e 200 mg/mL, sendo esses resultados estatisticamente diferentes dos obtidos pela concentração de 50 mg/mL ($p<0,0001$) (Figura 4).

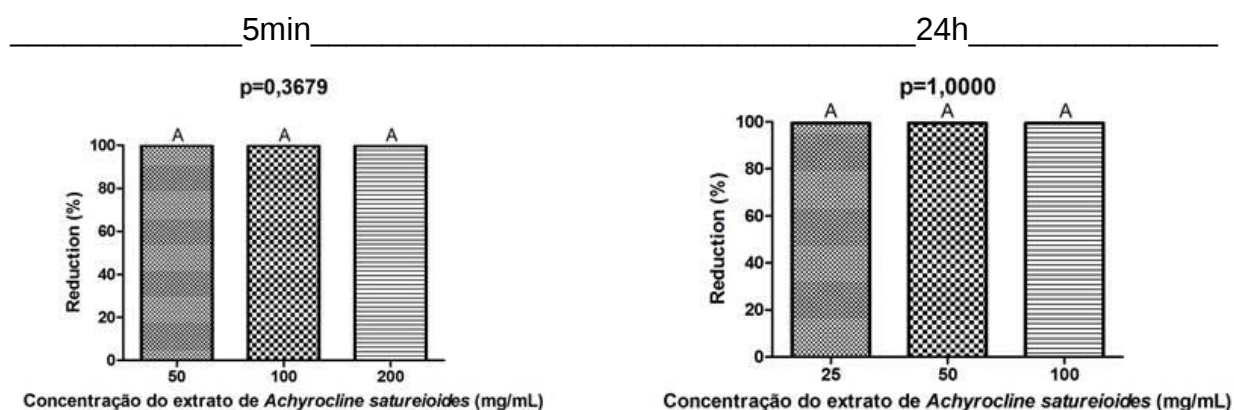
Figura 4 – Percentual de redução do biofilme de *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (ATCC 25586) tratado pelo extrato de *Persea americana* Mill. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 5, observa-se que a atividade antimicrobiana do extrato de *A. satereioides* (Lam) DC. em contato com o biofilme de *P. micra* por 5 min foi superior a 90% em relação ao controle ($p<0,05$), sem diferença estatística entre os grupos ($p= 0,3679$). No período de 24 h de contato com o mesmo extrato, o biofilme de *P. micra* apresentou redução superior a 99%, sem diferença estatística entre os grupos ($p=1,000$).

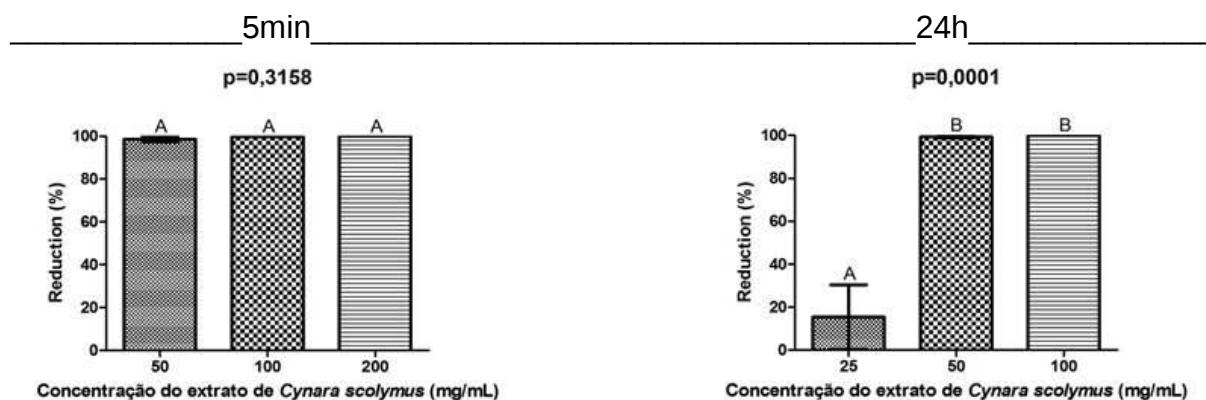
Figura 5 – Percentual de redução do biofilme de *Parvimonas micra* (ATCC 23195) tratado pelo extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

C. scolymus L., em contato com o biofilme de *P. micra* pelo período de 5 min também reduziu mais de 90% o número de UFC/mL ($p=0,3158$). Em 24 h de contato, as concentrações de 50 mg/mL e 100 mg/mL do extrato de *C. scolymus* L. atingiram um percentual de redução superior a 99% ($p=0,0001$) (Figura 6).

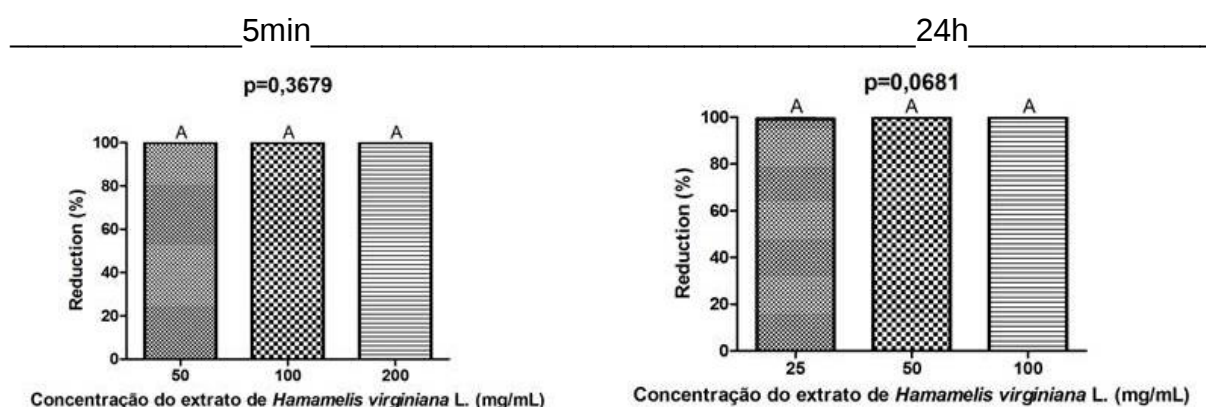
Figura 6 – Percentual de redução do biofilme de *Parvimonas micra* (ATCC 23195) tratado pelo extrato de *Cynara scolymus* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 7, é possível observar a ação do extrato glicólico de *H. virginiana* L. sobre biofilme de *P. micra* por 5 min e 24 h de contato. O contato por 5 min permitiu redução superior a 90%, sem diferença estatística entre as concentrações testadas ($p=0,3679$). Para o tempo de 24 h, o percentual de redução foi superior a 99%, sem diferença estatística entre os grupos ($0,0681$).

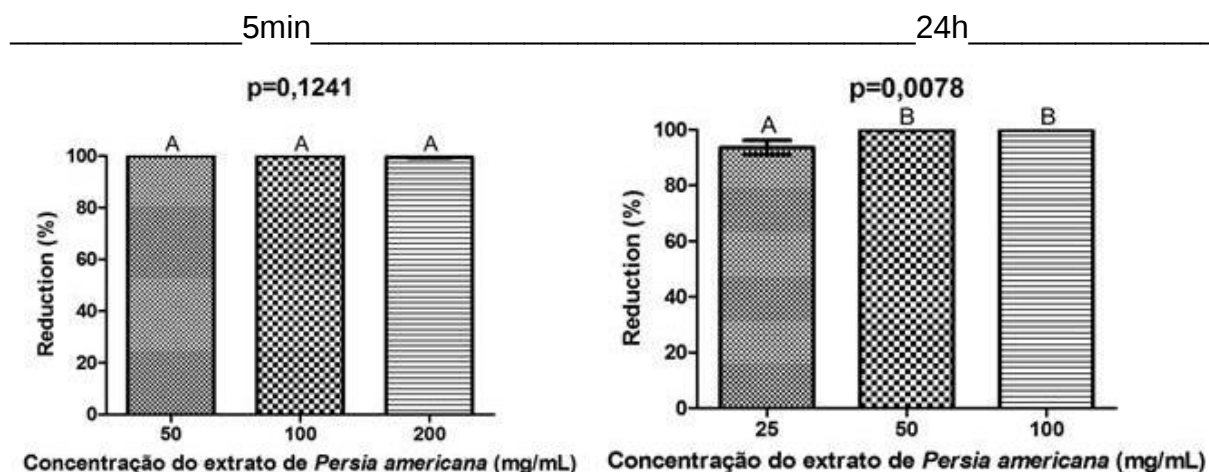
Figura 7 – Percentual de redução do biofilme de *Parvimonas micra* (ATCC 23195) tratado pelo extrato de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

As três diferentes concentrações do extrato de *P. americana* Mill. quando em contato com o biofilme de *P. micra* por 5 min, foram capazes de reduzir acima de 90% o número de UFC/mL, sem diferença estatística entre elas ($p=0,1241$). A concentração de 25 mg/mL do mesmo extrato sobre o biofilme de *P. micra* por 24 h, mostrou percentual de redução de 97%. Já as concentrações de 50 mg/mL e 100 mg/mL, inibiram aproximadamente 99% as UFC/mL ($p=0,0078$) (Figura 8).

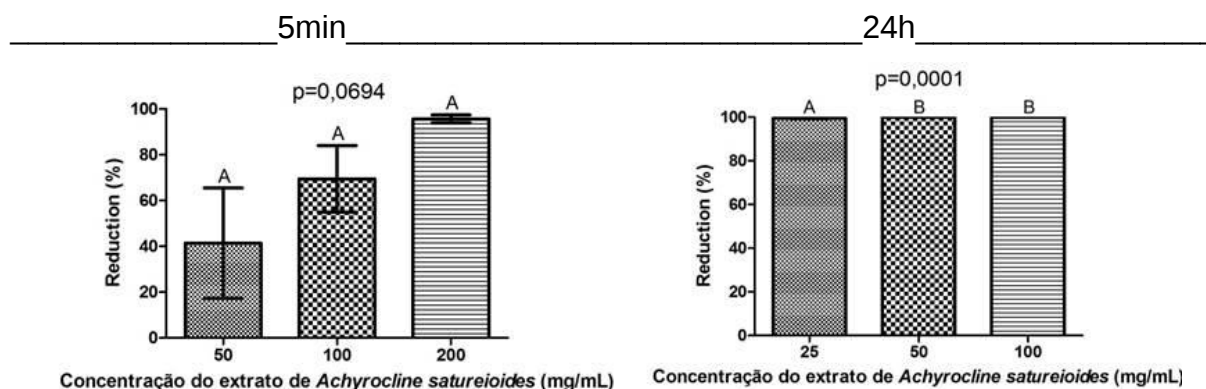
Figura 8 – Percentual de redução do biofilme de *Parvimonas micra* (ATCC 23195) tratado pelo extrato de *Persea americana* Mill. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação aos biofilmes de *P. endodontalis* submetidos ao extrato de *A. satereioides* (Lam) DC. pelo período de 5 min, todas as concentrações demonstraram reduções significativas em relação ao controle ($p<0,05$), sem diferença estatística entre as concentrações ($p=0,0694$). A concentração de 200 mg/mL foi a que apresentou maior percentual de redução. Em 24 h de contato, a redução do número de UFC/mL foi superior a 99% e 100 mg/mL e 200 mg/mL foram as concentrações com maiores reduções ($p= 0,0001$) (Figura 9).

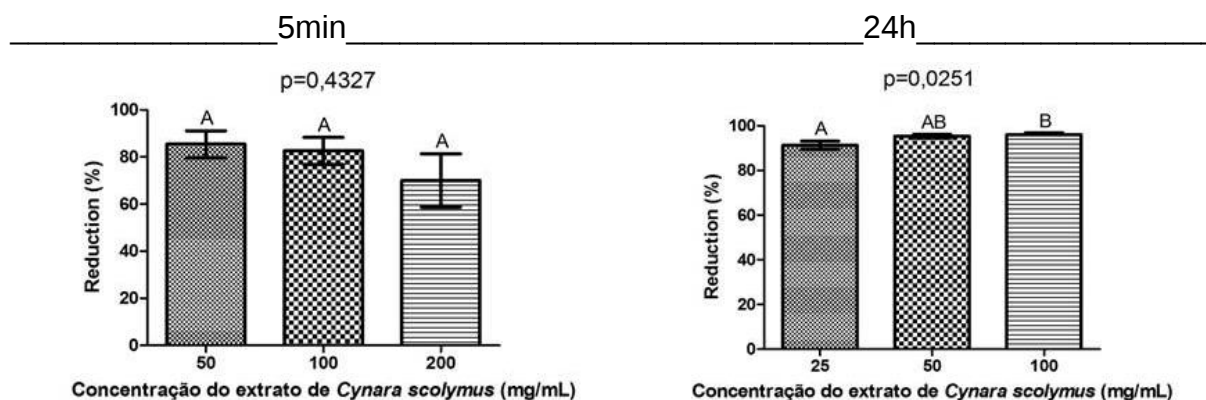
Figura 9 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406) tratado pelo extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

Os biofilmes de *P. endodontalis* tratados por 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL do extrato de *C. scolymus* L. pelo período de 5 min, em média, tiveram redução de 79% do número de UFC/mL ($p= 0,4327$). Já em 24 h, todas as concentrações testadas inibiram acima de 91% o número de UFC/mL, sendo 50 mg/mL e 100 mg/mL as concentrações que apresentaram as maiores reduções em relação ao controle ($p= 0,0251$) (Figura 10).

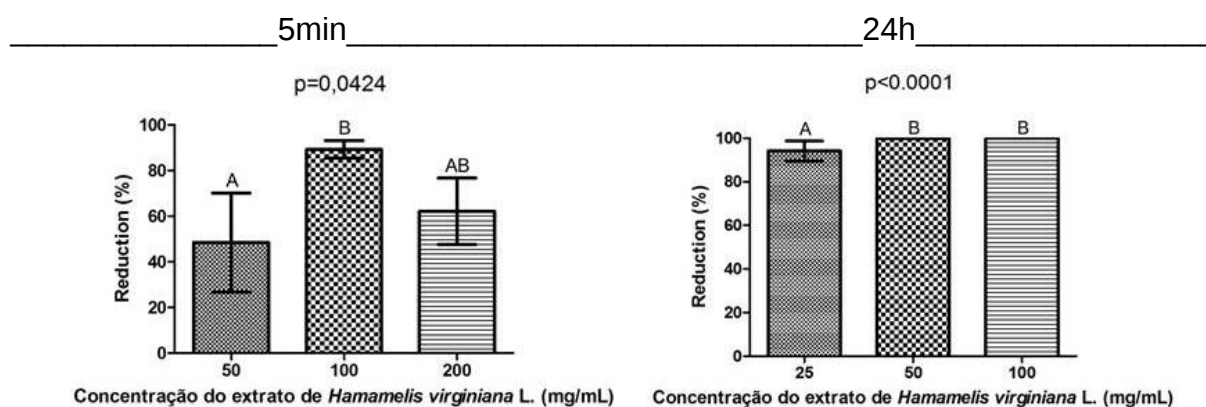
Figura 10 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406) tratado pelo extrato de *Cynara scolymus* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

O extrato de *H. virginiana* L., nas concentrações testadas no período de 5 min, reduziu a média de 66% o número de UFC/mL ($p= 0,0424$). Em 24 h, as concentrações de 50 mg/mL e 100 mg/mL promoveram as maiores reduções do biofilme, acima de 99% ($p< 0,0001$) (Figura 11).

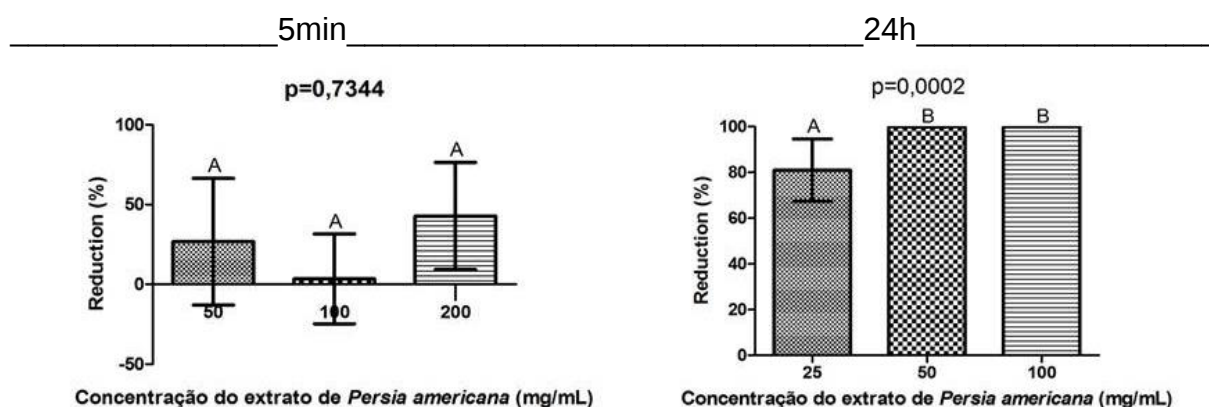
Figura 11 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406) tratado pelo extrato de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações do extrato de *P. americana* Mill., quando em contato com o biofilme de *P. endodontalis* por 5 min ($p= 0,7344$), apresentaram reduções inferiores a 50%, sem diferença estatística entre os grupos. Já em 24 h, 25 mg/mL reduziu em 81% o número de UFC/mL e 50 mg/mL e 100 mg/mL pouco mais de 99% ($p= 0,0002$) (Figura 12).

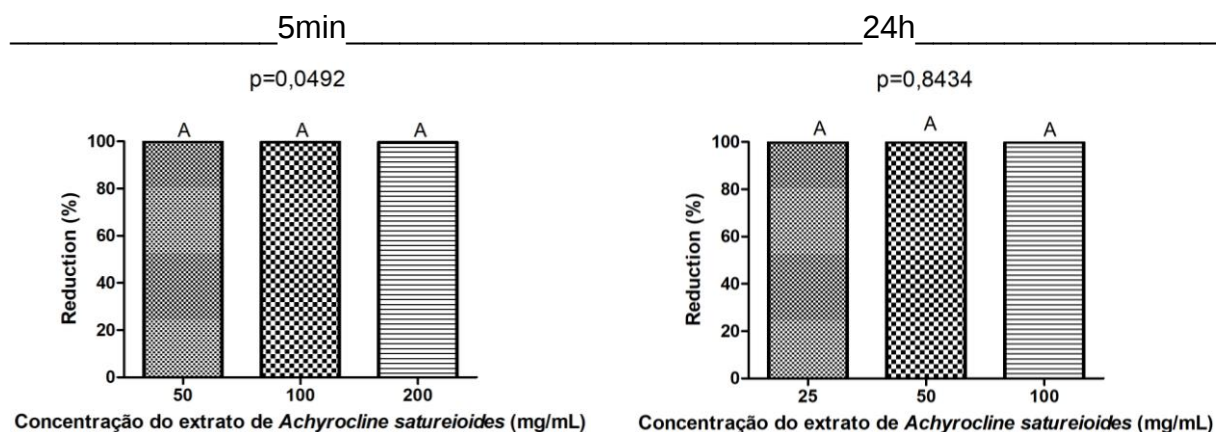
Figura 12 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406) tratado pelo extrato de *Persea americana* Mill. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações do extrato de *A. saturoioides* testadas sobre o biofilme de *P. gingivalis* pelos períodos de 5 min ($p=0,0429$) e 24 h ($p=0,8434$) de contato, apresentaram redução superior a 99%, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 13).

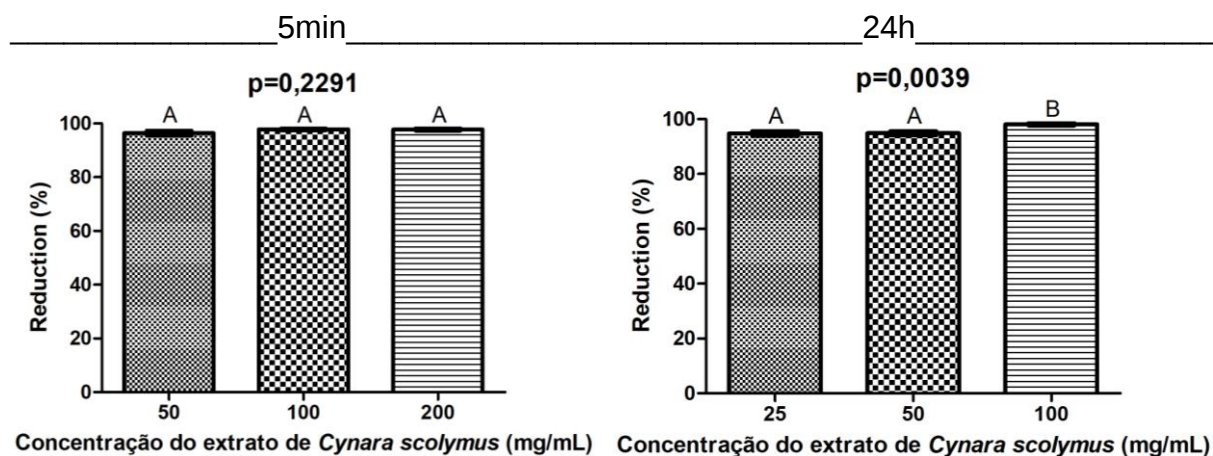
Figura 13 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) tratado pelo extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

Em 5 min de contato com as concentrações de 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL do extrato de *C. scolymus* L., os biofilmes de *P. gingivalis* reduziram, no mínimo, 96% o número de UFC/mL. Os biofilmes de *P. gingivalis* em contato, por 24 h, com as concentrações de 25 mg/mL e 50 mg/mL mostraram redução de 94% do número de UFC/mL. A concentração de 100 mg/mL permitiu a redução de 98% das UFC/mL, sendo esta concentração a mais efetiva ($p=0,0039$) (Figura14).

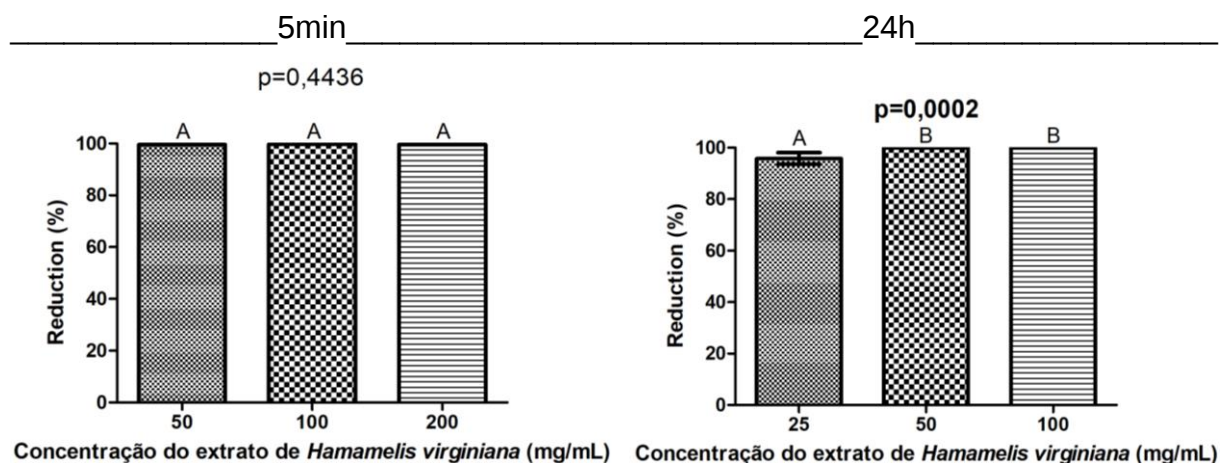
Figura 14 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) tratado pelo extrato de *Cynara scolymus* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

Os biofilmes de *P. gingivalis* tratados por 5 min pelo extrato de *H. virginiana* L. apresentaram percentual de redução superior a 99% para as concentrações de 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL, sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,4436$). No tempo de 24 h de contato com o extrato, o biofilme tratado com 25 mg/mL do extrato de *H. virginiana* L. apresentou redução de 95%, sendo as concentrações mais efetivas as de 50 mg/mL e 100 mg/mL, com percentual de redução de 99% ($p=0,0002$) (Figura 15).

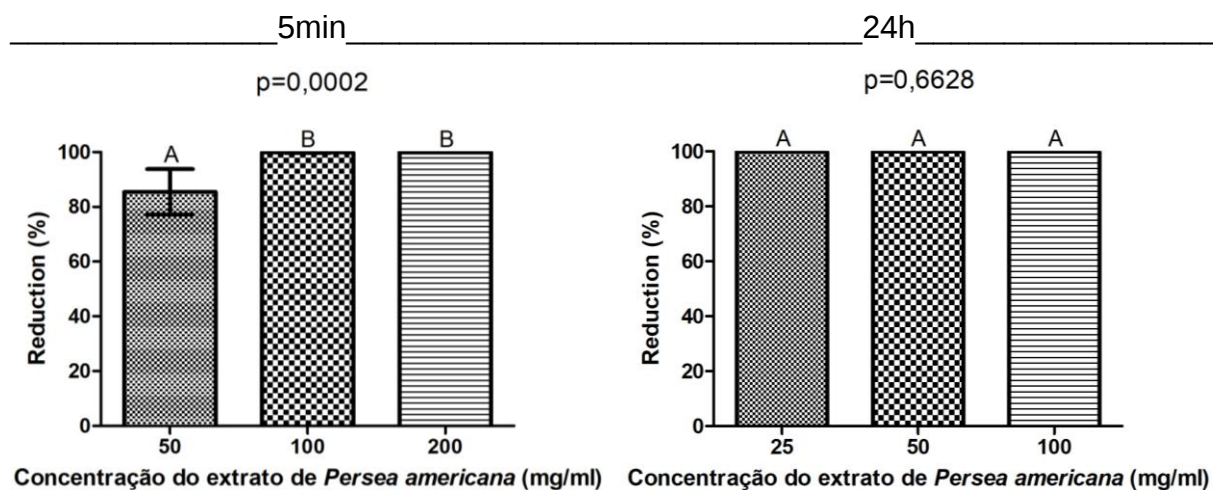
Figura 15 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) tratado pelo extrato de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

O extrato de *P. americana* Mill., na concentração de 50 mg/mL e 5 min de contato, foi capaz de inibir 85% o biofilme de *P. gingivalis*. As concentrações de 100 mg/mL e 200 mg/mL do mesmo extrato pelo mesmo período de tempo, mostraram percentual de redução de 99% (p=0,0002). No tempo de 24 h, todas as concentrações levaram à inibição de 99%, sem diferença estatística entre os grupos (p=0,6628) (Figura 16).

Figura 16 – Percentual de redução do biofilme de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) tratado pelo extrato de *Persea americana* Mill. pelos períodos de 5 min e 24 h



Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Na fase planctônica, por meio do teste da microdiluição em caldo, foi possível observar atividade inibitória (CIM) dos extratos de *A. satureioides*, *C. scolymus*, *H. virginiana* e *P. americana* sobre *F. nucleatum*. Ainda, atividade bactericida foi observada sobre *F. nucleatum*, bem como sobre *P. micra*, exceto para o extrato de *H. virginiana*. Atividade antibacteriana não foi determinada para *P. endodontalis* e *P. gingivalis*. Segundo Iauk et al. (2003), a dificuldade de cultivo e exigência nutricional de bactérias anaeróbias da cavidade bucal atrapalham a real determinação da atividade antimicrobiana das substâncias avaliadas pelos testes planctônicos.

Joray et al. (2013) realizaram o isolamento e a interação de princípios ativos extraídos de extrato etanólico de *A. satureioides*, tendo quercetina e 3-O-metilquercetina apresentado atividade bacteriostática moderada contra espécies Gram positivas e Gram negativas sem obtenção de efeito bactericida. Atividade bacteriostática do extrato glicólico de *A. satureioides* também foi observada no presente estudo sobre *F. nucleatum* e *P. micra*, além de atividade bactericida na concentração de 50 mg/mL para ambas as bactérias. Nossos resultados demonstram que a atividade antimicrobiana do extrato completo de *A. satureioides* pode ser mais eficaz quando comparada a ação de princípios ativos isolados, assim como Wagner e Ulrich-Merzenich (2009) descrevem que interações entre todos os componentes de um extrato, juntamente com metabólitos menores e fibras, podem gerar efeitos sinérgicos.

Zhu et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos extraídos de folhas de *C. scolymus* sobre bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Micrococcus luteus*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*), fungos (*C. albicans*, *C. lusitanae*, *Saccharomyces cerevisiae* e *S. carlsbergensis*) e bolores (*Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Mucor mucedo* e *Cladosporium cucumerinum*) e observaram que a fração de n-butanol foi a mais ativa sobre todos os micro-organismos testados. Os autores sugerem ampla atividade antimicrobiana de extratos produzidos a partir de folhas de *C. scolymus*,

podendo ser utilizados como conservantes naturais de alimentos, assim como na produção de fármacos naturais. No presente estudo, o extrato de *C. scolymus* foi efetivo agente bacteriostático sobre *F. nucleatum* (50 mg/mL), apresentando também atividade bactericida sobre esta cepa, bem como sobre *P. micra*. Assim como no estudo citado, o extrato glicólico de *C. scolymus* também pode conter compostos fenólicos de ação antimicrobiana que implicam nos resultados obtidos pelo presente estudo, indicando uma possível utilização como medicamento natural.

Iauk et al. (2003) analisando a atividade antimicrobiana de extratos metanólico e decocção de raízes de *Althaea officinalis* L., flores de *Arnica montana* L. e *Calendula officinalis* L., folhas de *H. virginiana* L. e *Melissa officinalis* L. e frutos de *Illicium verum* Hook. sobre cepas de *P. gingivalis*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* e *Actinomyces odontolyticus* verificaram que o extrato metanólico de *H. virginiana* L. foi o que apresentou os melhores resultados sobre a maioria dos micro-organismos avaliados. Este produto inibiu a maioria das cepas de *P. gingivalis* e *Prevotella* spp. por meio de CIM ≤ 512 mg/L. A maior CIM deste foi sobre cepas de *F. nucleatum* (≥ 16384 mg/L), *C. gingivalis*, *V. parvula* e *P. micros* (2048 mg/L). No presente estudo, o extrato de *H. virginiana* L. também foi o que apresentou melhor atividade antibacteriana utilizando baixas concentrações, principalmente sobre *F. nucleatum*, que apresentou CIM de 6,25 mg/mL e CBM de 25 mg/mL. Esses autores não mencionaram dificuldades quanto à visualização e obtenção dos valores de CIM para todos os extratos e bactérias analisados. A metodologia da microdiluição utilizada no estudo de Iauk et al., (2003) não continha sangue de carneiro desfibrinado para diluição dos extratos, fator que pode ter contribuído com a maior turvação e precipitação dos compostos, impedindo a visualização da CIM no presente estudo.

Amêndola (2015) analisou a atividade anti-inflamatória e antimicrobiana do extrato glicólico de *H. virginiana* sobre bactérias (*Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) e leveduras (*Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) de interesse médico-odontológico. Atividade fungistática e fungicida foi obtida para as espécies avaliadas, bem como

atividade bacteriostática e bactericida, exceto para *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os resultados obtidos em ambos os estudos demonstram a importância do extrato glicólico de *H. virginiana* para o tratamento de doenças infecciosas tanto de origem fúngica quanto de origem bacteriana aeróbica e anaeróbica.

Alviano et al. (2008) avaliaram a atividade antibacteriana de extrato aquoso de *Cocos nucifera*, extrato aquoso de *Ziziphus joazeiro*, extrato aquoso de *Caesalpinia pyramidalis* e extrato alcóolico de *Aristolochia cymbifera* sobre *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *S. mutans* e *Lactobacillus casei*. Os autores obtiveram maior atividade antibacteriana do extrato de *A. cymbifera* sobre *P. gingivalis*, seguido de *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *S. mutans* e *L. casei*. No presente estudo, *F. nucleatum* foi mais sensível aos extratos avaliados, seguido de *P. micra*, sendo *P. gingivalis* e *P. endodontalis* resistentes até a maior concentração testada. Essas diferenças se devem aos extratos usados e produzidos a partir de outras espécies vegetais. Além disso, demonstra que embora a cepa de *F. nucleatum* seja a mesma em ambas as pesquisas e que entre os extratos avaliados no presente estudo não tenha havido diferenças comportamentais desta, essas podem existir até mesmo em extratos produzidos a partir de um mesmo exemplar vegetal colhido em diferentes épocas do ano, já que a composição de substâncias presentes pode mudar (Rizzo et al., 2008).

Estudo realizado por Biasi-Garbin et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de espécies vegetais da caatinga brasileira, dentre elas *P. americana*, sobre dermatófitos (*Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*) e obtiveram que o extrato metanólico dessa espécie apresentou efeito antimicrobiano fraco. Entretanto, os autores afirmam que esta planta é conhecida por possuir atividade antimicrobiana contra bactéria e fungos, e que esta se deve a presença de substâncias químicas presentes no extrato. Essas informações corroboram com as do presente estudo, já que o extrato de *P. americana* apresentou atividade bacteriostática sobre *F. nucleatum* (12,5 mg/mL), assim como bactericida tanto para esta cepa quanto para *P. micra*, em 50 mg/mL para ambas. Desta forma, podemos sugerir que os vários extratos podem conter distintas concentrações de princípios ativos, fazendo com que as substâncias antimicrobianas sejam desiguais entre eles, explicando os diferentes resultados obtidos em ambos os estudos (Altemimi et al., 2017).

A adesão de células planctônicas microbianas a uma superfície é o primeiro estágio para a colonização e posterior formação de biofilmes, que podem ser até mil vezes mais resistentes que as células planctônicas, dificultando o tratamento de doenças e podendo agir como focos de infecções patogênicas sistêmicas, como cárie dentária, doença periodontal, pneumonia associada e osteomielite, sendo importante encontrar alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por estes (Al-Jumaili et al., 2018). Dentro da infinidade de alternativas terapêuticas naturais, os metabólitos secundários vegetais, bem como óleos essenciais e extratos, revelaram atividade antimicrobiana de amplo espectro (Hasan et al., 2013; O'Bryan et al., 2015).

No presente estudo, além da metodologia da microdiluição em caldo para avaliar a atividade bacteriostática e bactericida dos extratos, também foi realizado o teste de atividade antibiofilme. Foram utilizados dois períodos de exposição dos biofilmes aos extratos, 5 min é o tempo utilizado para determinar a ação antimicrobiana como dentifrício ou enxaguatório e 24 h para determinar uma ação sistêmica do extrato. Estudos avaliando a ação antibiofilme de extratos vegetais ainda são escassos sobre bactérias aeróbicas, mas principalmente sobre bactérias anaeróbicas.

Quando em biofilme, todas as bactérias submetidas aos extratos testados apresentaram sensibilidade tanto no período de 5 min quanto em 24 h de exposição, exceto *P. endodontalis* quando submetida ao extrato de *P. americana* pelo período de 5 min.

Extratos glicólicos ou hidroglicólicos são constituídos por propilenoglicol, água e extratos vegetais. Possuem ampla aplicabilidade na odontologia devido à presença de frações aromáticas puras e voláteis, mais conhecidas como óleos essenciais, que no vegetal desempenham inúmeras funções, como atividade antifúngica e antibacteriana (Bhavnani, Ballow, 1992; Lima et al., 2006). Devido à sua completa dissolução em água, são inteiramente absorvidos pelo organismo e em decorrência de sua composição, podem ser utilizados em medicamentos de uso tópico e oral para o tratamento de doenças infecciosas (Batistuzzo et al., 2000).

Estudo demonstra que a exposição microbiana a metabólitos secundários vegetais pode levar a inúmeras alterações metabólicas celulares, como redução de atividade enzimática, perda de pressão intracelular e modificações na síntese

protéica (Ultee et al., 1999). Além disso, alguns óleos essenciais têm comprovada ação sobre a comunicação entre células, dificultando a rede de sinalização química do quorum sensing, impedindo a regulação do controle populacional bacteriano, bem como alguns fatores de virulência, como a capacidade de formação de biofilme e resistência a antibióticos (Szabó et al., 2010). Essas alterações metabólicas podem ter sido desencadeadas sobre as células bacterianas dos biofilmes submetidas aos extratos, justificando a intensa atividade antibiofilme observada no presente estudo.

Células originadas de biofilmes, quando submetidas a concentrações subletais de uma substância antimicrobiana, podem gerar uma taxa de transferência plasmidial contendo gene de resistência antibiótica até dez vezes maior quando comparadas as células planctônicas. Essa informação pode explicar o motivo pelo qual o extrato de *P. americana*, não foi capaz de reduzir satisfatoriamente o biofilme de *P. endodontalis*, em 5 min de exposição (Ma, Bryers, 2013).

Pesquisas a cerca das atividades biológicas de extratos vegetais ainda são recentes e merecem atenção, sendo os resultados obtidos no presente estudo de grande importância por sugerirem a utilização de extratos de *A. satureioides*, *C. scolymus*, *H. virginiana* e *P. americana* na composição de enxaguatórios bucais, dentifrícios e fármacos de ação antibacteriana e antibiofilme contra cepas patogênicas associadas ao desenvolvimento de doença periodontal, servindo como alternativa terapêutica natural para o tratamento de infecções da cavidade bucal.

6 CONCLUSÃO

Os extratos glicólicos de *A. satureioides*, *C. scolymus*, *H. virginiana* e *P. americana* apresentaram efeito bacteriostático sobre *F. nucleatum*. Além disso, atividade bactericida foi constatada sobre *F. nucleatum* após exposição aos extratos, bem como, sobre *P. micra*, exceto para *H. virginiana*, em culturas planctônicas. Os extratos avaliados também apresentaram efeito antibiofilme sobre *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis*, constatado por reduções significativas destas comunidades após exposição aos extratos vegetais por 5 min ou 24 h.

REFERÊNCIAS*

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas da COFID (Versão V). Brasília: ANVISA; 2015.

Al-Jumaili A, Kumar A, Bazaka K, Jacob MV. Plant secondary metabolite-derived polymers: a potential approach to develop antimicrobial films. *Polymers*. 2018 May 10;10(515):1-24. doi:10.3390/polym10050515.

Alerico GC, Beckenkamp A, Vignoli-Silva M, Buffon A, von Poser GL. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2015 Dec 24;176:305-10. doi: 10.1016/j.jep.2015.11.001.

Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants (Basel)*. 2017 Sep 22;6(4):1-23. doi: 10.3390/plants6040042.

Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antonioli AR, Alviano CS, Farias LM, et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol*. 2008 Jun;53(6):545-52. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.12.001.

Amêndola I. Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* Linnaeus [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2015.

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv*. 2015 Dec;33(8):1582-614. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.

Batistuzzo JAO, Eto Y, Itaya M. Formulário médico-farmacêutico. São Paulo: Tecnopress; 2000.

Bhavnani SM, Ballow CH. New agents for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2000 Oct;3(5):528-34.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Ben Salem M, Affes H, Athmouni K, Ksouda K, Dhouibi R, Sahnoun Z, et al. Chemicals compositions, antioxidant and anti-inflammatory activity of *Cynara scolymus* leaves extracts, and analysis of major bioactive polyphenols by HPLC. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017a Apr 30;2017(4951937):1-14. doi: 10.1155/2017/4951937.

Ben Salem M, Ben Abdallah Kolsi R, Dhouibi R, Ksouda K, Charfi S, Yaich M. Protective effects of *Cynara scolymus* leaves extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*. 2017b Jun 19;17(1):328. doi: 10.1186/s12906-017-1835-8.

Biasi-Garbin RP, Demitto Fde O, Amaral RC, Ferreira MR, Soares LA, Svidzinski TI, et al. Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophytes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58(18):1-5. doi: 10.1590/S1678-9946201658018.

Cariddi LN, Sabini MC, Escobar FM, Bacchetti R, Montironi I, Merckis C, et al. *In vitro* and *in vivo* cytogenotoxic effects of hot aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Biomed Res Int*. 2015 May 11. doi: 10.1155/2015/270973.

Casero C, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Demo M, Méndez-Álvarez S, Machín F. Achyrofuran is an antibacterial agent capable of killing methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in the nanomolar range. *Phytomedicine*. 2013 Jan 15;20(2):133-8. doi: 10.1016/j.phymed.2012.11.003. 5.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard, CLSI document M11-A7. 7th ed. USA: CLSI; 2007.

de Lima BR, Nicoloso GF, Fatturi-Parolo CC, Ferreira MBC, Montagner F, Casagrande L. *Prevotella* strains and lactamic resistance gene distribution in different oral environments of children with pulp necrosis. *Int Endod J*. 2018 May 8. doi: 10.1111/iej.12948.

Duckstein SM, Lorenz P, Stintzing FC. Conversion of phenolic constituents in aqueous *Hamamelis virginiana* leaf extracts during fermentation. *Phytochem Anal*. 2012 Dec;23(6):588-97. doi: 10.1002/pca.2359.

Frat JP, Godet C, Grollier G, Blanc JL, Robert R. Cervical spinal epidural abscess and meningitis due to *Prevotella oris* and *Peptostreptococcus micros* after retropharyngeal surgery. *Intensive Care Med*. 2004 Aug;30(8):1695.

Ghosh SK, Feng Z, Fujioka H, Lux R, McCormick TS, Weinberg A. Conceptual perspectives: bacterial antimicrobial peptide induction as a novel strategy for symbiosis with the human host. *Front Microbiol*. 2018 Feb 26;9(302). doi: 10.3389/fmicb.2018.00302.

Gupta PD, Birdi TJ. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *J*

- Ayurveda Integr Med. 2017 Dec;8(4):266-275. doi: 10.1016/j.jaim.2017.05.004.
- Han YW, Shi W, Huang GT, Haake SK, Park NH, Kuramitsu H, et al. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. Infect Immun. 2000 Jun;68(6):3140-6.
- Hasan J, Crawford RJ, Ivanova EP. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. Trends Biotechnol. 2013 May;31(5):295-304. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.01.017.
- Henne K, Schilling H, Stoneking M, Conrads G, Horz HP. Sex-specific differences in the occurrence of *Fusobacterium nucleatum* subspecies and *Fusobacterium periodonticum* in the oral cavity. Oncotarget. 2018 Apr 17;9(29):20631-9. doi: 10.18632/oncotarget.25042.
- Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. J Microbiol Methods. 2001 Mar 1;44(2):121-9.
- Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antimicrobial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. Phytother Res. 2003 Jun;17(6):599-604.
- Joray MB, Palacios SM, Carpinella MC. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. Phytomedicine. 2013 Feb 15;20(3-4):258-61. doi: 10.1016/j.phymed.2012.10.015.
- Ko JH, Baek JY, Kang CI, Lee WJ, Lee JY, Cho SY, et al. Bacteremic meningitis caused by *Parvimonas micra* in an immunocompetent host. Anaerobe. 2015 Aug;34:161-3. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.004.
- Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontol 2000. 1997 Jun;14:33-53.
- Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Rev Bras Farmacogn. 2006 Jun;16(2):197-201.
- Ma H, Bryers JD. Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. Appl Microbiol Biotechnol. 2013 Jan;97(1):317-28. doi: 10.1007/s00253-012-4179-9.
- Mouchrek Junior JC, Nunes LH, Arruda CS, Rizzi CC, Mouchrek AQ, Tavares RR, et al. Effectiveness of oral antiseptics on tooth biofilm: a study in vivo. J Contemp Dent Pract. 2015 Aug 1;16(8):674-8.
- O'Bryan CA, Pendleton SJ, Crandall PG, Ricke SC. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture - *in vitro* studies on antibacterial mode of

- action. *Front Vet Sci*. 2015 Sep 14;2:35. doi: 10.3389/fvets.2015.00035.
- Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res*. 2014 Sep;93(9):846-58. doi: 10.1177/0022034514542468.
- Rizzo PV, Menten JFM, Racanicci AMC, Santarosa J. Foundation and perspectives of the use of plant extracts as performance enhancers in broilers. *Rev Bras Cienc Avic*. 2008 Dec;10(4):195-204.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1721-4. doi: 10.1128/JCM.00531-12.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. *PLoS One*. 2018 Jan 2;13(1):e0190469. doi: 10.1371/journal.pone.0190469.
- Rouphael Y, Colla G, Graziani G, Ritieni A, Cardarelli M, De Pascale S. Phenolic composition, antioxidant activity and mineral profile in two seed-propagated artichoke cultivars as affected by microbial inoculants and planting time. *Food Chem*. 2017 Nov; 1(234):10-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.175.
- Saleem HG, Seers CA, Sabra NA, Reynolds EC. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. *BMC Microbiol*. 2016 Sep;15(16):214. doi: 10.1186/s12866-016-0833-1.
- Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Apr;21(2):112-22.
- Soldera-Silva A, Seyfried M, Campestrini LH, Zawadzki-Baggio SF, Minho AP, Molento MB, et al. Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of *Persea americana* seed extracts. *Vet Parasitol*. 2018 Feb;15(251):34-43. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.12.019.
- Souza DMF, Sá RD, Araújo EL, Randau KP. Anatomical, phytochemical and histochemical study of *Solidago chilensis* Meyen. *An Acad Bras Cienc*. 2018 Aug;90(2 suppl 1):2107-20. doi: 10.1590/0001-3765201720160280.
- Stewart PS. Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol Spectr*. 2015 Jun;3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014.
- Sudhakara P, Gupta A, Bhardwaj A, Wilson A. Oral dysbiotic communities and their implications in systemic diseases. *Dent J (Basel)*. 2018 Apr 16;6(2). pii: E10. doi: 10.3390/dj6020010.
- Szabó MA, Varga GZ, Hohmann J, Schelz Z, Szegedi E, Amaral L, et al. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytother Res*. 2010 May;24(5):782-6. doi: 10.1002/ptr.3010.

Teanpaisan R, Baxter AM, Douglas CW. Production and sensitivity of bacteriocin-like activity among *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Pr. nigrescens* strains isolated from periodontal sites. J Med Microbiol. 1998 Jul;47(7):585-9.

Theisen LL, Erdelmeier CA, Spoden GA, Boukhallouk F, Sausy A, Florin L, et al. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. PLoS One. 2014 Jan 31;9(1):e88062. doi: 10.1371/journal.pone.0088062.

Tremocoldi MA, Rosalen PL, Franchin M, Massarioli AP, Denny C, Daiuto ÉR, et al. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. PLoS One. 2018 Feb 14;13(2):e0192577. doi: 10.1371/journal.pone.0192577.

Uemura H, Hayakawa K, Shimada K, Tojo M, Nagamatsu M, Miyoshi-Akiyama T, et al. *Parvimonas micra* as a causative organism of spondylodiscitis: a report of two cases and a literature review. Int J Infect Dis. 2014 Jun;23:53-5. doi: 10.1016/j.ijid.2014.02.007. Epub 2014 Mar 26.

Ultee A, Kets EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 1999 Oct;65(10):4606-10.

Vander Haar EL, So J, Gyamfi-Bannerman C, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* and adverse pregnancy outcomes: epidemiological and mechanistic evidence. anaerobe. 2018 Apr;50:55-9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.01.008

Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine. 2009 Mar;16(2-3):97-110. doi: 10.1016/j.phymed.2008.12.018.

Willmann C, Mata X, Hanghoej K, Tonasso L, Tisseyre L, Jeziorski C, et al. Oral health status in historic population: Macroscopic and metagenomic evidence. PLoS One. 2018 May 16;13(5):e0196482. doi: 10.1371/journal.pone.0196482.

Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. J Agric Food Chem. 2004 Dec 1;52(24):7272-8.

ANEXO A — Laudo do extrato glicólico de *Achyrocline satureioides* Lam (D.C.) emitido pela empresa Mapric



EXTRATO GLICÓLICO DE MACELA (HG)

Nome Científico: *Achyrocline satureioides*, Asteraceae

INCI: Achyrocline Satureioides Flower Extract

Nº CAS: 92346-81-1

Parte Utilizada: Flor

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

A Macela é constituída por: flavonóides (quercitina, luteolina, galangina, isognafalina); ésteres da calerianina com ácido cafeico e ácido protocatéquico; óleo essencial e saponinas triterpênicas.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Macela tem ação antiinflamatória, calmante, bactericida, miorelaxante, estimula a circulação sanguínea periférica. Indicado como auxiliar em tratamentos para queda de cabelos, em produtos para peles e cabelos delicados, como auxiliar na proteção solar.

Popularmente é usado para clarear cabelo. Poderá ser utilizado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, cremes e produtos para massagem, em shampoos, géis, produtos para o banho, máscaras faciais, produtos pós-barba e outros produtos cosméticos. Indicado somente para uso externo em concentrações de até 5%.

Atenção: O Extrato Glicólico de Macela deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor. Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação. Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, 3º edição, 1985.

**Av. Gentil de Moura, 194 CEP 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55 (11)
5061.5282 mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br**

ANEXO B — Laudo do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. emitido pela empresa Mapric



EXTRATO GLICÓLICO DE HAMAMÉLIS (HG)

Nome Científico: *Hamamelis virginiana* L. / Hamameliaceae

INCI: Hamamelis Virginiana Leaf Extract

Nº CAS: 84696-19-5

Parte Utilizada: Folhas

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Tanino pirogálico (hamamelitanino); pouco óleo essencial; saponina ácida; colina; ácidos graxos; mucilagem e pectina.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS:

O Extrato Glicólico de Hamamélis tem ação adstringente, vasoprotetora, vasoconstritora, descongestionante, antioleosidade, anti-acnêica. Indicado nas afecções venosas como varizes, flebites, hemorroidas; em preparações para oleosidade excessiva da pele e do couro cabeludo. Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, sabonetes, máscaras faciais, loções de limpeza, produtos pós-barba e outros produtos cosméticos em concentrações de até 10%. Uso Externo.

Atenção: O Extrato Glicólico de Hamamélis deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina-Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, 3º edição, 1985.

Av. Dr Gentil de Moura, 194 CEP 04278 080 Ipiranga São Paulo SP
Tel/Fax 55 (11) 5061.5282 mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br

ANEXO C — Laudo do extrato glicólico de *Persea americana* Mill. emitido pela empresa Mapric



EXTRATO GLICÓLICO DE ABACATEIRO (HG)

Nome Científico: *Persea Gratissima* Gaertner

INCI: Persea Gratissima Leaf Extract

N° CAS: 84695-98-7

Parte Utilizada: Talo e Folhas.

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Substâncias amargas (asocatina); flavonóides; quercetina; beta-sitosterol; hepta álcool (perseitol, do qual D-perseitol é o princípio ativo); óleo essencial (estragol e anetol).

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Abacateiro tem ação hidratante, calmante e suavizante. É também indicado para peles e cabelos secos e ressecados. Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, cremes para banho e outros produtos cosméticos.

Indicado para uso externo em concentração de até 10%.

Atenção: O Extrato Glicólico de Abacateiro deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Cravo, A.B.; Frutas e Ervas que Curam – Panacéia Vegetal. Ed. Helmus, 1995.

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, 3° edição, 1985.

Moreira, F.; As Plantas que Curam. Ed. Helmus, 1985.

ANEXO D — Laudo do extrato glicólico de *Cynara scolymus* emitido pela empresa Mapric



STD COMÉRCIO E EXPORTAÇÃO LTDA

EXTRATO GLICÓLICO DE ALCACHOFRA

Cynara scolymus

LAUDO DE ANÁLISE

DEFINIÇÃO: Obtido por extração de folhas de alcachofra

CTFA/INCI Name: *Cynara scolymus* leaf extract;

CAS No.: 84012-14-6

EINECS No: 281-859-3

FABRICAÇÃO.: 02.07.2018

VALIDADE: 24 meses

LOTE: STD0718

ANÁLISE	RESULTADO	ESPECIFICAÇÃO
ASPECTO	De acordo	Líquido de média viscosidade
COR	De acordo	Castanho escuro
ODOR	De acordo	Característico
CONCENTRAÇÃO	De acordo	20%
pH (a 25°C)	4,8	5,0 ± 2,0
DENSIDADE (a 25°C)	1,015	1,000 ± 0,050
SOLUBILIDADE	De acordo	Solúvel em propilenoglicol, glicerina e água
RESÍDUO SECO	De acordo	Mínimo 1,0%
CONTAGEM BACTÉRIANA* (35-37°C -48h)	De acordo	< 10 ³ UFC/ml
CONTAGEM BOLORES E LEVEDURAS* (20-25°C-5 dias)	De acordo	< 10 ³ UFC/ml

Conservar o produto em local fresco e arejado, ao abrigo de umidade e calor.
Durante o prazo de validade poderá ocorrer precipitação do produto sem alterar suas propriedades.

Químico Responsável
Ivanilson P. da Silva
CRQ: 04483978