



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

**ISABELA AMÊNDOLA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO GLICÓLICO DE *Hamamelis  
virginiana* Linnaeus**

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos  
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Amêndola, Isabela

Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do  
extrato glicólico de Hamamelis virginiana Linnaeus / Isabela  
Amêndola. - São José dos Campos : [s.n.], 2015.  
66 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em  
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José  
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

Orientador: Graziella Nuernberg Back Brito.

1. Medicamentos fitoterápicos. 2. Biofilmes. 3. Macrófagos. 4.  
Citocinas. I. Nuernberg Back Brito, Graziella , orient. II.  
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -  
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio  
de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,  
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer  
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 01 de dezembro de 2015  
E-mail: isabelaamendola@hotmail.com

Assinatura: \_\_\_\_\_

**ISABELA AMÊNDOLA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO GLICÓLICO DE  
*Hamamelis virginiana* Linnaeus**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

São José dos Campos

2015

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito (Orientador)**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ. Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ. Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Marcos Roberto Furlan**

Instituto de Ciências Agrárias  
UNITAU – Universidade de Taubaté  
Campus de Taubaté

**São José dos Campos, 01 de dezembro de 2015**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu pai, Francisco Amêndola Neto, por todo amor, carinho, atenção e preocupação durante minha história de vida, estando sempre presente em minha trajetória acadêmica, apoiando e continuamente me conduzindo a fazer o certo, além de todo apoio emocional, sem o qual não poderia estar aqui hoje. Pai, te amo muito! Obrigada por tudo.*

*Também dedico esse trabalho ao meu namorado, Matheus Santos Castilho, meu companheiro de vida e amigo, meus dias difíceis se tornaram simples ao seu lado. Obrigada por me apoiar, por me entender e estar sempre ao meu lado. Te amo demais! Você é minha vida!*

*As minhas irmãs, Isadora Amêndola, Inara Amêndola e Victória Monteiro Amêndola; aos meus avós, Rosa Beareto Amêndola e Ramiro Beareto Amêndola e D. Shirley Santos Moreira (avó do coração), que mesmo tendo se tornado lindas estrelas no céu, estarão para sempre em nossas memórias e nosso coração; a minha tia, Rita de Cássia Amêndola; aos meus primos, Leandro Amêndola Correa e Guilherme Amêndola Correa; aos meus sogros (pais de coração), Adriana Mara Santos Castilho e Armando Sebastião Castilho por toda atenção e apoio dados a mim durante todos esses anos; aos meus cunhados, ou melhor dizendo, irmãos cedidos por Deus, Eder Santos Castilho e Patrícia Batista de Oliveira.*

*As meras palavras escritas anteriormente não podem expressar todo o amor e carinho que tenho por vocês. Obrigada meu Deus por minha família maravilhosa! Amo vocês!*

*Dedico, ainda, este trabalho aos meus amigos, Daiane de Jesus e Jonatas Rafael de Oliveira, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por estarem ao meu lado nesta difícil jornada. Com vocês tudo se tornou mais fácil. Muito obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por ser tão bom e generoso e nunca me desamparar. Eu, sem a Fé que me acompanha, não teria como lutar com os dragões que surgem durante a vida.*

*Agradeço a Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito, que mesmo sem me conhecer, aceitou me orientar e me ajudou a aprimorar ainda mais minhas habilidades científicas, buscando sempre o melhor em mim, além de ter se tornado uma amiga. Grazi, muito obrigada!*

*Agradeço a Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, que me ajudou durante minhas pesquisas, sempre estando por perto. Lu, muito obrigada!*

*Ao Prof. Titular Antonio Osavo Cardoso Jorge e Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira, sempre estando prontos a nos ajudar, tirando dúvidas e dando conselhos. Muito Obrigada!*

*Aos funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, que nos ajudaram, estando sempre dispostos a nos atender. Muito obrigada!*

*A Universidade de Taubaté e aos professores e funcionárias dos Laboratórios de Microbiologia e Imunologia da Unitaú, por todo apoio e carinho prestados a mim durante todos esses anos.*

*Agradeço aos alunos de Iniciação Científica Eduardo e Thais, por terem nos ajudado e se tornado nossos amigos.*

*Agradeço a todos os alunos de Pós Graduação em Microbiologia/Imunologia por terem se tornado mais que colegas de laboratório, por terem se tornado amigos de verdade. Nós somos uma equipe e tenho muito orgulho de fazer parte dela. Obrigada amigos, sem vocês eu não teria chegado até aqui!*

*“Criatividade é permitir a si mesmo cometer erros. Arte  
é saber quais erros manter”. Scott Adams*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	24
<b>4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato</b> .....	25
4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM).....	25
4.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes...26	
<b>4.2 Avaliação da citotoxicidade do princípio ativo</b> .....	28
4.2.1 Análise da atividade mitocondrial de células viáveis.....	29
4.2.2 Produção de citocinas IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ por macrófagos.....	30
4.2.2.1 Ensaio imunoenzimático.....	30
<b>4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato</b> .....	31
4.3.1 Produção de óxido nítrico.....	32
<b>4.4 Análise Estatística</b> .....	33
<b>5 RESULTADOS</b> .....	34
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>ANEXOS</b> .....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biofilme de <i>Acinetobacter baumannii</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelo pelos períodos de 5 min e 24 h.....	36
Figura 2 - Biofilme de <i>Escherichia coli</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	37
Figura 3 - Biofilme de <i>Enterococcus faecalis</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	37
Figura 4 - Biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	38
Figura 5 - Biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	39
Figura 6 - Biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	39

Figura 7 - Biofilme de <i>Candida albicans</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	40
Figura 8 - Biofilme de <i>Candida dubliniensis</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	41
Figura 9 - Biofilme de <i>Candida glabrata</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	41
Figura 10 - Biofilme de <i>Candida guilliermondii</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	42
Figura 11 - Biofilme de <i>Candida krusei</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	42
Figura 12 - Biofilme de <i>Candida tropicalis</i> tratado com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelos períodos de 5 min e 24 h.....	43
Figura 13 - Percentual de viabilidade celular de macrófagos (RAW 264.7) tratados com diferentes concentrações do extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. pelo período de 5 min e 24 h.....	44
Figura 14 - Quantificação de citocina Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) por	

macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. crescidos ou não de LPS de <i>E. coli</i> pelo período de 24 horas (pg/mL).....	45
Figura 15 - Quantificação de citocina TNF- $\alpha$ por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. crescidos ou não de LPS de <i>E. coli</i> pelo período de 5 minutos (pg/mL).....	46
Figura 16 - Quantificação de citocina TNF- $\alpha$ por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. crescidos ou não de LPS de <i>E. coli</i> pelo período de 24 horas (pg/mL).....	47
Figura 17 - Quantificação de óxido nítrico por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. crescido ou não de LPS de <i>E. coli</i> pelo período e 5 min.....	47
Figura 18 - Quantificação de óxido nítrico por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L. crescido ao não de LPS de <i>E. coli</i> pelo período e 24 horas.....	48

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

## RESUMO

*Hamamelis virginiana* L. é uma planta nativa dos Estados Unidos da América que foi inserida no Brasil por conta de suas vastas atividades biológicas, como ação antimicrobiana e anti-inflamatória. As pesquisas com extratos desse vegetal são vastas, embora não haja estudos com extrato glicólico da mesma. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. sobre cepas padrão de leveduras do gênero *Candida* (*Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis*), espécies de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) e Gram-negativas (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), nas fases planctônica e biofilme; além de avaliar a citotoxicidade e atividade anti-inflamatória. A atividade antimicrobiana foi realizada por teste de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), sendo os resultados utilizados como parâmetro para análise em biofilmes monotípicos. A atividade citotóxica foi analisada pelo teste MTT e quantificação da produção das citocinas interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por ELISA, sendo a avaliação da atividade anti-inflamatória realizada por meio de exposição da cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) a lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* seguido por tratamento com o extrato de *H. virginiana* L. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados por ANOVA e teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ); já os sem distribuição normal foram analisados por Kruskal-Wallis e pós teste Dunns. Os resultados obtidos revelam que o extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. proporcionou atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados no presente estudo e o teste de citotoxicidade apontou viabilidade celular igual ou superior ao controle, exceto para a concentração de 100 mg/mL no período de 24 h de contato células-extrato. Quanto à produção de citocinas, não houve aumento dessas substâncias pelos macrófagos. Óxido nítrico, no período de 24 h, foi produzido pelas maiores concentrações testadas do extrato, fator que pode estar envolvido com a

alta atividade antimicrobiana alcançada. O extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. ofereceu eficaz redução microbiana sobre as cepas testadas na fase planctônica, exceto para as bactérias Gram-positivas; reduziu o número de UFC/mL quando em contato com os micro-organismos na forma de biofilme, sem apresentar citotoxicidade sobre os macrófagos, além de proporcionar atividade anti-inflamatória sobre os mesmos.

Palavras-chave: Medicamentos fitoterápicos. Biofilmes. Macrófagos. Citocinas

Amêndola I. Evaluation of antimicrobial and anti-inflammatory activity of glycolic extract of Hamamelis virginiana Linnaeus [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2015.

## ABSTRACT

Hamamelis virginiana L. is a North American plant that was insert in Brasil because their biological activities, like antimicrobial and anti-inflammatory activities. Large researchs are development with H. virginiana L. extracts, although there are no studies with glycolic extract from it. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial and anti-inflammatory activity of glycolic extract of Hamamelis virginiana L. over standard strains of genus Candida yeast (C. albicans, C. dubliniensis, C. glabrata, C. quilliermondii, C. krusei e C. tropicalis), species of Gram-positive bacteria (Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus e Streptococcus mutans) and Gram-negative (Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae), in plankton communities and biofilm; besides the cytotoxicity and anti-inflammatory. The antimicrobial activity was performed by microdilution test in broth for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) e Minimum Microbicide Concentration (MMC), and the results used for antimicrobial analysis in biofilms monotypic. The cytotoxic activity was analyzed by the MTT test and quantification of production of the cytokines IL- $\beta$  1 and TNF- $\alpha$  by ELISA., being that the anti-inflammatory activity was performed with exposition of macrophages mouse culture to E. coli lipopolissacaride (LPS) and extract post-treatment. The results were analyzed by ANOVA and Tukey Test ( $p \leq 0.05$ ) if the results present normal distribution; and Kruskal Wallis and post-test Dunn if the results don't presente normal distribution ( $p \leq 0.05$ ). Results shows that the H. virginiana L. glycolic extract have antimicrobial activity about test micro-organisms and the cytotoxicity test shows high cellular viability or equal the control, except for the 100 mg/mL for 24 h contact time. Cytokines weren't produced by macrophages. Nitric oxide was produced by cells in a contact for 24 h with the extract, which can be related with the increased antimicrobial activity. Hamamelis virginiana L. glycolic extract propound antimicrobial activity, except for the Gram-positive bacterias; reduced the CFU/mL number when the contact with microbial biofilm, without induce cytotoxicity about the macrophages, besides display anti-inflammatory activity.

Keywords: *Phytotherapeutic drugs*. Biofilms. Macrophages. Cytokines

## 1 INTRODUÇÃO

Fitoterápicos são medicamentos de origem vegetal, caracterizados pelos pilares eficácia, segurança e qualidade, sendo necessário o conhecimento de seu efeito terapêutico, os riscos de sua utilização, além da constância de sua qualidade (Lopes et al., 2006; Ferreira Filho et al., 2013; Brasil, 2014).

O vasto uso da fitoterapia como forma de tratamento alternativo se deve, principalmente, por ser uma opção de baixo custo e fácil aquisição se comparada aos produtos de origem química, em consequência das patentes depositadas sobre esses (Castilho et al., 2007; Ferreira Filho et al., 2013).

Apesar de plantas medicinais serem utilizadas de forma milenar pela população mundial e passado entre gerações, não deve ser empregado de forma indiscriminada, assim como os de síntese química, pois podem apresentar sérios riscos associados ao seu uso, necessitando de comprovação de sua segurança (Brasil, 2010).

*Hamamelis virginiana* L. é uma planta produtora de inúmeros metabólitos com múltiplas ações biológicas, sendo utilizados como fitoterápicos. Trata-se de uma planta arbustiva, conhecida popularmente por hamamélis, nativa de bosques úmidos da região leste da América do Norte e utilizada empiricamente para o tratamento de hemorragias e inflamações. No entanto, após comprovação de sua eficácia, foi adotada por médicos norte-americanos (Moreti et al., 2006).

De forma geral, fitoterápicos com *H. virginiana* L. apresentam efetividade como agentes antisséptico, adstringente, antimicrobiano, antiviral, auxiliam na cura de corrimentos, na higienização

e cicatrização de feridas purulentas, como anti-inflamatório e antioxidante (Faivre et al., 2009; Costa et al., 2012).

Na área odontológica o extrato metanólico das folhas de *H. virginiana* L. apresentou capacidade antimicrobiana para micro-organismos periodontopatogênicos como *Prevotella* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp., dentre outros (Iauk et al., 2003; Ferreira Filho et al., 2013).

Todas essas atividades biológicas apresentadas por *H. virginiana* L. se devem a compostos presentes em sua estrutura como flavonóides presentes nas folhas, além de glicosídeos, taninos, óleos voláteis e fixos, colina, ácido gálico livre e hamamelose livre (Moreti et al., 2006).

Embora estes estudos demonstrem diferentes ações e efeitos desta planta, não foram encontrados trabalhos na literatura científica que avaliasse, *in vitro*, o potencial antimicrobiano, citotóxico e pró ou anti-inflamatório do extrato glicólico de *H. virginiana* L. Estas avaliações se faz importante em relação à utilização deste extrato em produtos comerciais na área médica e odontológica, no qual as características ideais deste fitoterápico seriam de amplo espectro de ação microbiana, baixa toxicidade e de controle inflamatório.

Diante do exposto e considerando a necessidade novos medicamentos com valores acessíveis, baixa toxicidade e eficazes para o tratamento de doenças de origem microbiana, julgou-se importante o estudo dos possíveis efeitos do extrato glicólico de *H. virginiana* L. sobre micro-organismos potencialmente patogênicos, sua ação citotóxica e atividade anti-inflamatória.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Historicamente, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades é tão remota quanto à própria humanidade, sendo, pinturas rupestres, provas de que diversos vegetais, além de serem consumidos como alimentos, eram utilizados terapêuticamente. A humanidade pode perceber então que a natureza disponibilizava insumos necessários para melhoria de sua qualidade de vida, podendo levar à cura e ao bem-estar (Matos, 1999; Maciel et al., 2002; Lima Junior, 2005; Haraguchi, Carvalho, 2010).

Pesquisas tem confirmado o uso de vegetais por neandertais há mais de 60 mil anos, como *Althaea officinalis* utilizada como anti-inflamatório, e *Lophophora williamsii* utilizado com antibiótico pela população indígena do México (Haraguchi, Carvalho, 2010).

A Política Nacional de Práticas Interativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) visa gerar alternativas terapêuticas aos usuários desse sistema e garantir o acesso da população aos fitoterápicos de forma mais segura, eficaz e com qualidade (Brasil, 2006), uma vez que, um dos maiores problemas de saúde pública está relacionado à toxicidade provocada por medicamentos de origem vegetal que pode ser gerada pelos próprios constituintes dos vegetais em decorrência de interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda, com características do próprio paciente como idade, gênero e genética (Balbino, Dias, 2010).

O uso consciente de medicamentos seja qual for sua origem deve ser levado em consideração, uma vez que eles podem gerar consequências quando em superdosagem, ineficácia terapêutica, reações adversas ou comprometimento de tratamentos convencionais (Capasso

et al., 2000; World Health Organization, 2002b). Entretanto, no Brasil, o uso seguro e o controle da comercialização desses produtos em mercados e feiras livres ainda são insuficientes (Veiga Junior e Pinto., 2005).

Sendo assim, profissionais de saúde precisam ser treinados para questionar os pacientes sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos e devem ser estimulados a notificar qualquer reação adversa ao Sistema Nacional de Farmacovigilância. Da mesma forma, os usuários precisam buscar recomendações de uso com profissionais da saúde e procurar atendimento diante de qualquer suspeita de reação adversa (Balbino, Dias, 2010).

Embora as plantas medicinais possam apresentar riscos à saúde, a participação delas no desenvolvimento tanto de novos medicamentos fitoterápicos quanto sintéticos é de extrema importância, uma vez que, compõe entre 60-80% dos medicamentos anticâncer e antimicrobianos introduzidos no mercado entre os anos de 1984 e 1995 (Castilho, 2007).

*H. virginiana* L., membro da família Hamamelidaceae, é nativa da América do Norte, mais especificamente da região do Estado da Virginia, nos Estados Unidos da América, local que lhe cedeu o nome. Trata-se de uma planta de pequeno porte podendo chegar a até três metros de altura, composta por folhas largas, denteadas e ovais, com florescimento durante o outono dando origem à flores amarelo-douradas (Kiran et al., 2008; Duckstein et al., 2012). Está entre as espécies de plantas medicinais inseridas na flora brasileira, sendo empregada tanto na fitoterapia como na homeopatia. No Brasil, devido às diferentes condições climáticas, é pouco estudada com relação à aclimação, cultivo, potencial produtivo e toxicidade. Entretanto, com a normatização dessas plantas, poderá ocorrer um aumento de seu consumo, acarretando no aumento da necessidade de mais estudos, a fim de se

garantir sua qualidade e disponibilidade no mercado (Brasil, 2010; Ming et al., 2012).

Extratos naturais e compostos destilados extraídos de *H. virginiana* L. são frequentemente utilizados na medicina popular em decorrência de sua atividade anti-inflamatória, posteriormente confirmada em modelo de edema de pata de rato, e como antimicrobiano (World Health Organization, 2002a).

Loções a 10% de destilados dessa planta levaram a um decréscimo de 20 a 27% do eritema causado pela radiação UVB. Esse efeito foi em decorrência da presença de hamamelitano, um polifenol com efeito de proteção celular contra os danos causados por esse tipo de radiação evidenciando, assim, uma potente atividade antioxidante (Masaki et al., 1995; Hughes-Formella et al., 2002; Kiran et al., 2008).

Com relação à toxicidade de *H. virginiana* L., sabe-se que o óleo volátil dessa planta apresenta um constituinte denominado safrole, um conhecido carcinógeno. Todavia, esse composto está presente em pequenas quantidades nesse vegetal, não carecendo de preocupação. Entretanto, engenol e acetaldeído são substâncias também presentes em *H. virginiana* L., podendo provocar irritação gástrica em pacientes suscetíveis que fazem uso desse fitoterápico por via oral. Outros efeitos colaterais são desconhecidos, além de contraindicações e interações medicamentosas (Moreti et al., 2006).

Trabalho realizado por Ramos e colaboradores (2005) avaliou, dentre outras, a atividade mutagênica de extratos seco e fluído de *Aloe* spp., própolis e *H. virginiana* L. em três concentrações distintas, sobre a pele de cobaia. Neste estudo puderam notar que nenhum dos extratos induziu efeitos nocivos com relação aos dois parâmetros avaliados. Além disso, perceberam que a ausência de fototoxicidade desses extratos não está relacionada à concentração do mesmo, já que o extrato seco é cerca de cem vezes mais concentrado que o fluído.

Dois compostos extraídos de *H. virginiana* L., catequina e taninos, foram testados sobre cultura de células humanas tipo Hep G2, conferindo um efeito protetor às mesmas (Dauer et al., 2003).

O uso de fitoterápicos como constituintes de dentifrícios vêm crescendo consideravelmente, em decorrência das buscas por novos produtos com maior eficácia e biocompatibilidade, além de menores custos, que pode favorecer sua aquisição pela comunidade. Exemplos de aplicabilidade nesse âmbito são tratamento de patologias bucais, prevenção e tratamento da cárie, doença periodontal, candidose oral, inflamações, odontalgias e processos cicatriciais. Os extratos vegetais mais utilizados para compor dentifrícios são a decocção, maceração e infusão (Castilho et al., 2007.; Zanin et al., 2007).

Segundo a Associação dos Higienistas Bucais do Canadá, a utilização de óleos essenciais como enxaguatório bucal em curto prazo reduz o biofilme dentário e a gengivite em torno de 35%, valores muito semelhantes aos alcançados com o tratamento em longo prazo, que constatou uma redução média de, respectivamente, 25% e 30%. Os resultados obtidos revelaram que a combinação de mentol, timol, eucaliptol e salicilato de metila foi a responsável pela redução do biofilme e inflamação gengival (Asadoorian, 2006).

Extratos glicólicos são frequentemente empregados na odontologia devido à presença de frações aromáticas puras e voláteis, denominadas óleos essenciais que exercem diferentes funções no organismo da planta, como atividade antimicrobiana, por exemplo, comprovada por 60% de ação antifúngica e 35% antimicrobiana (Bhavanani, Ballow, 1992; Lima et al., 2006).

Além dos óleos essenciais, frações hidrossolúveis como taninos apresentam características adstringente, anticancerígena, ação protetora do DNA, de vasoconstrição periférica; incluindo o fato de não acarretar efeitos adversos mesmo em altas concentrações, sendo um promissor agente quimiopreventivo, incluindo terpenos, compostos

fenólicos, flavonoides e aminoácidos, que oferecem ação calmante, anticancerígena e antibiótica (Batistuzzo et al., 2000; Moreti et al., 2006; Ferreira Filho et al., 2013).

Os constituintes dos extratos hidroglicólicos, como podem também ser chamados, são água, propilenoglicol e extratos vegetais. Devido à completa dissolução em água, são totalmente absorvidos pelo organismo, e compõe assim, uma solução límpida ou levemente turva (Brasil, 2012b).

O propilenoglicol é um diol da classe dos glicóis, produzido sinteticamente para utilização na indústria farmacêutica, alimentícia, de bebidas e cosmética. É uma substância desenvolvida baseada nas normas da *Good Manufacturing Practice* (GMP – Boas Práticas de Fabricação), apresenta-se como um líquido incolor, praticamente inodoro, ligeiramente viscoso, umectante, além de ser hidratante e impedir a volatilização do etanol, prevenindo, respectivamente, o ressecamento do produto dentro da embalagem e fornecendo um aroma mais estável ao mesmo (Batistuzzo et al., 2000; Zanin et al., 2007; Propilenoglicol, 2013\*; Brasil, 2005).

A presença de propilenoglicol em extratos glicólicos permite sua utilização em medicamentos de uso tópico, por via oral ou intravenosa para o tratamento de inúmeras doenças infecciosas (Batistuzzo et al., 2000).

A busca incansável por novos medicamentos e o teste com produtos de metabolismo secundário de inúmeras plantas tem apenas um propósito: encontrar medicamentos mais potentes, com menor toxicidade e baixo custo para o tratamento de doenças, principalmente de origem microbiana, que se tornam cada vez mais complexas de combater, devido à resistência dos micro-organismos aos

---

\*Propilenoglicol USP: TB: Código: FC-025 [ficha técnica]. Cláudia S. Portantiolo química. Joinville: Quimidrol; 2013. 3p.

medicamentos habituais (Brasil, 2012a; Schiavone et al., 2013).

A presença de *Staphylococcus* spp. multirresistente em ambiente hospitalar gera preocupação com relação à colonização precoce da cavidade bucal por este micro-organismo, que embora seja um gênero presente na microbiota normal do ser humano, em condições de imunossupressão e resistência dessa bactéria pode, a partir de cavidade bucal, alcançar outros órgãos e tecidos e causar infecção (Silva et al., 2003).

Assim como estafilococos, *E. coli* e espécies do gênero *Candida* são micro-organismos residentes do corpo humano e de animais. Na cavidade bucal e trato gastrointestinal, estes micro-organismos compartilham um mesmo hábitat e, devido a algumas alterações imunológicas do hospedeiro, determinadas cepas de *E. coli* podem desencadear doença como a gastroenterite, sendo capaz de se dispersar e colonizar o sistema nervoso central, trato urinário e sangue (Piva et al., 2011).

Por sua vez, as infecções causadas por *Candida* spp., em imunossuprimidos, também são um grande problema por conta da fácil dispersão pelo organismo humano. Apresentam alta penetrabilidade pelos tecidos do hospedeiro através da produção de hifas, podendo desencadear infecções sistêmicas que apresentam altos índices de mortalidade, além da capacidade de formação de biofilme e resistência aos antifúngicos usuais. Esses fatores de virulência levam a dificuldade no tratamento por medicamentos convencionais, até mesmo à terapia fúngica de primeira linha (Piva et al., 2011; Mayer et al., 2013).

A eficácia antimicrobiana de extratos de *H. virginiana* L. foi observada sobre bactérias aeróbias e anaeróbias periodontopatogênicas, sendo o extrato metanólico mais ativo que a decocção, inibindo *Actinomyces* spp., *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella parvula*, e *P. gingivalis*, *Prevotella*

spp., *E. corrodens* Os resultados inibitórios obtidos foram comparados à ação da espiramicina, fármaco da classe dos macrolídeos frequentemente utilizado na odontologia (Iauk et al., 2003).

O biofilme maduro é composto por uma variedade de bactérias e outros micro-organismos presentes normalmente na microbiota do hospedeiro e que quando encontram características como alteração da microbiota, doenças sistêmicas ou redução na imunidade do hospedeiro acabam desencadeando doença (Oliveira, 2010). Esses micro-organismos também são denominados oportunistas (Eisenstein, Schaechter, 2002; Cavalcanti et al., 2011).

A formação de biofilme associada aos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas* têm grande importância em ambiente hospitalar já que, em infecções, são patógenos super-resistentes a antimicrobianos (Gaetti-Jardim Júnior et al., 2009).

As doenças nosocomiais são doenças desenvolvidas em ambiente hospitalar após 48h de internação do indivíduo, sendo que os patógenos envolvidos não estavam presentes ou incubados no momento da chegada ao hospital (Oliveira et al., 2007).

ESKAPE é a sigla designada aos principais patógenos associados à infecção nosocomial. Esses micro-organismos representam o mais alto risco em relação a padrões de resistência frente às atuais alternativas terapêuticas, principalmente com relação a micro-organismos Gram-negativos. A sigla em questão acomoda, respectivamente, *Enterococcus faecium* vancomicina resistentes (VRE), *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA), *Klebsiella* e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado (BLEA), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, além de outras espécies da família Enterobacteriaceae (Lisboa, Nagel, 2011).

Devido a grande importância desses micro-organismos tanto na microbiota normal quanto adquirida, torna-se necessário o estudo tanto da ação antimicrobiana de novos fármacos naturais quanto à

ação citotóxica dos mesmos para o alcance de medicamentos com menores efeitos colaterais ao corpo humano.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana, citotóxica e pró-inflamatória do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L.

Os objetivos específicos foram

- a) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. sobre espécies de leveduras do gênero *Candida*, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas nas fases planctônica e biofilme monotípico;
- b) avaliar a atividade citotóxica de dez concentrações do extrato sobre macrófagos de camundongo (RAW 264,7)
- c) quantificar citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico sobre três concentrações do extrato previamente escolhidas por meio de testes-piloto.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O extrato glicólico de *H. virginiana* L. (20%) foi obtido da empresa Mapric (São Paulo, SP), com os devidos laudos e especificações (Anexo A).

### 4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato

A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada sobre cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *Candida albicans* (sorotipo A – ATCC 36801), *C. dubliniensis* (ATCC MYA 646), *C. glabrata* (ATCC 9030), *C. guilliermondii* (ATCC 6260), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. tropicalis* (ATCC13803), *A. baumannii* (ATCC 19606), *E. coli*, *E. faecalis* (ATCC 4083), *K. pneumoniae* (ATCC 4352), *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. mutans* (ATCC 35688) provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, curso de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

#### 4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Para a determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), normas M7-A6 e M27-A2.

Os inóculos foram preparados, a partir de cultura de 24 h incubadas em estufa bacteriológica (37°C, com 5%CO<sub>2</sub> para *S. mutans*), em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e padronizados em espectrofotômetro.

O teste foi realizado em microplacas, onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura, 100 µL dos extratos, apenas na primeira fileira de poços da microplaca, de onde partirão uma série de 10 diluições seriadas, e os inóculos foram acrescentados em seguida. Os meios utilizados foram caldo Müeller Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias, e meio RPMI 1640 (Himedia) tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) pH 7,0 ± 0,1, para as leveduras. Após incubação de 24 h, a CIM foi determinada no primeiro poço da microplaca que não apresentar turvações que indiquem crescimento microbiano.

Para a determinação da CMM do extrato, foi inoculado, em placas contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI - Himédia) ou Sabouraud-dextrose (Himedia) 100 µL da CIM, bem como 100 µL de todas as outras concentrações superiores. Após 48 h de incubação, a placa onde não for observado crescimento de colônias, foi a CMM do extrato natural para cada micro-organismo.

#### 4.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes

Os biofilmes foram formados em fundo de placas de 96 poços. Para tanto, foi preparado o inóculo de cada micro-organismo em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB – Himedia) suplementado com 100 mM de glicose, diluído 10 vezes em água destilada estéril, para as leveduras, e Brain Heart Infusion Broth (BHI- Himedia) para as bactérias. Os tubos contendo o respectivo meio para cada micro-organismo foi incubado em

estufa a 37°C por 16h. Depois desse período, o inóculo foi centrifugado e lavado duas vezes com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e foram feitas suspensões padronizadas em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) contendo  $10^7$  UFC/mL em caldo YNB (10X) ou BHI. Foram colocados 0,1 mL da suspensão microbiana nos poços da microplaca. A placa foi incubada por 1 h e 30 min em estufa (37°C sob agitação de 75 rpm) para aderência inicial. Após, as placas foram lavadas duas vezes com solução fisiológica estéril e foi colocado 0,1 mL de caldo YNB diluído duas vezes em água destilada estéril ou BHI. A seguir, a placa foi incubada nas mesmas condições da aderência inicial por 48 h, no entanto, após 24 h de incubação foi trocado o meio de cultura.

Passado o período de formação de cada biofilme, este foi colocado em contato com extrato, por período de 5 min e 24 h, nas concentrações efetivas pré-determinadas (CMM). Solução salina estéril foi utilizada como controle negativo. Posteriormente, estas soluções foram descartadas, o biofilme foi lavado com solução fisiológica estéril, e então sonicados com homogeneizador ultrassônico, com potência de 25% por 30 segundos. Em seguida, diluições sucessivas foram realizadas e três gotas de 20 µL de cada diluição foram inoculadas em ágar BHI (Himedia) ou Sabouraud-dextrose (Himedia) por meio da técnica da gota. Após incubação de 48 h, foram contadas as unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Foram realizados três experimentos independentes, com quatro repetições cada, totalizando n=12 para cada grupo experimental.

## 4.2 Avaliação da citotoxicidade do princípio ativo

A avaliação da citotoxicidade do extrato natural foi realizada por teste colorimétrico MTT, que analisou a atividade mitocondrial celular, e teste imunoenzimático (ELISA) que quantificou a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), ambos após contato de 5 min e 24 h com o extrato, para tanto, foram utilizadas culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7).

A cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ), foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, com 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e quando for observado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as células foram utilizadas nos testes ou foram realizados congelamentos da cultura. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com auxílio de um varredor celular, as células suspensas foram centrifugadas por 5 min a 2000 rpm. Foi aplicado o teste de exclusão pelo azul de Trypan, para ser quantificado o número de células viáveis.

#### 4.2.1 Análise da atividade mitocondrial de células viáveis

Foi realizada análise da atividade mitocondrial das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazina. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 1 mL de *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Cultilab, Brasil) estéril.

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça) foram adicionados 200  $\mu$ L de meio DMEM + 10% SFB contendo  $4 \times 10^4$  células viáveis (Jesus et al., 2015). Estas placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 h para que ocorra aderência celular nos poços da microplaca. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 200  $\mu$ L/poço de cada concentração do extrato separadamente nas concentrações mais efetivas determinadas no teste de microdiluição. Foram utilizados poços-controles, contendo apenas células com meio de cultura. O período de incubação foi de 24 h e o teste foi feito em triplicata. Após, o conteúdo de cada poço foi descartado, e os poços foram lavados com PBS para descartar as células mortas. Em seguida, para verificação da viabilidade da cultura, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço da solução de MTT. As placas foram incubadas novamente (37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>) por período de 1 h, abrigadas da luz. Posteriormente, esta solução foi descartada e foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) para expor os cristais de formazina produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis. Após incubação de 10 min e agitação em *shaker*, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a

seguinte fórmula: % Viabilidade = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle

#### 4.2.2 Produção de citocinas IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ por macrófagos

Em placas de 24 poços (TPP, Suíça) foram acrescentados  $5 \times 10^5$  células viáveis por poço, sendo o volume completado com meio DMEM + 10% SFB para 1 mL. As placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 h para aderência das células. Após, o meio foi removido e foi adicionado o extrato natural nas concentrações mais efetivas encontradas no teste antimicrobiano. Para o grupo controle foi utilizado apenas meio DMEM + 10% SFB. O  $n$  foi igual a 12 para todos os grupos. As placas seguirão novamente para incubação por mais 24 h.

Após o período de exposição, os sobrenadantes de todos os grupos foram coletados, armazenados em microtubos e congelados em freezer (-20°C) para posterior quantificação de citocinas pelo teste imunoenzimático (ELISA).

##### 4.2.2.1 Ensaio imunoenzimático

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IL-1 $\beta$  de camundongo (R&D Systems, NE) e mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 hora. Após, as placas foram lavadas com PBS-

T e receberam os sobrenadantes da cultura de células (100  $\mu$ L por poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata. Após 2 h, as placas foram lavadas (PBS-T) e foram acrescentados anticorpos de detecção anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IL-1 $\beta$  marcados com biotina. Após 2 h, a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada após 20 min com ácido sulfúrico 2N. As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm.

Após obtenção das DO foram determinadas as quantidades de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (pg/mL) das amostras de sobrenadantes celulares com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

### **4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato**

Foram cultivados em cada poço da placa de 24 poços 5 x 10<sup>5</sup> células/mL de macrófagos (RAW 264.7) em 1 mL de DMEM, por 24 h. Após incubação, o sobrenadante foi descartado e acrescentado meio fresco (DMEM + 10%SFB) acrescido de concentrações distintas do extrato além de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma) na concentração de 1  $\mu$ g/mL em cada poço. O tratamento dos macrófagos com extrato e LPS foi realizado nos tempos de 5 min e 24 h. Após o tratamento de 5 min, os conteúdos dos poços foram retirados e acrescentado meio fresco. As placas de ambos os tratamentos foram incubadas por 24 h (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) para possível produção de citocinas.

Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração (-20°C) para posterior quantificação de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico.

#### 4.3.1 Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura de macrófagos (com LPS) foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess, composto por volumes iguais de três soluções (A, B e C). Antes do início do teste, os sobrenadantes foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min. A solução A foi produzida à partir de 0,6 g de ácido sulfanílico dissolvido em 70 mL de água destilada quente. Após a solução ter esfriado, foram adicionados 20 mL de ácido clorídrico concentrado e de água destilada suficiente para 100 mL. A solução B foi produzida à partir de 0,6 g de alfa-naftalamina dissolvida em 20 mL de água destilada e 1 mL de ácido clorídrico. O volume foi completado com água destilada suficiente para 100 mL. A solução C foi produzida à partir 16,4 g de acetato de sódio na forma hidratada em água destilada no volume de 100 mL.

Após o preparo, 100  $\mu$ L o reagente de Griess foi acrescentado nos poços de uma microplaca de 96 poços. A seguir, o mesmo volume das amostras dos sobrenadantes foi acrescentado. Depois de 10 min, a leitura foi realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. Para o cálculo da concentração no nitrito, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 23 pg/mL a 0,72 pg/mL, constituindo uma curva-padrão.

#### **4.4 Análise estatística**

Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0.05$ ). Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Khruskal-Wallis e pelo teste de Dunns, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0.05$ ).

## 5 RESULTADOS

Foram realizados testes preliminares ao biofilme de cada espécie a fim de estabelecer a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano planctônico (CIM) ou eliminar cada micro-organismo (CMM). De acordo com os resultados obtidos no teste planctônico, é possível perceber que o extrato foi eficaz para todos os micro-organismos Gram-negativos e leveduras, sendo *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, do total de micro-organismos testados, os mais sensíveis ao extrato (Tabela 1).

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. sobre bactérias e leveduras

Extratos	Extrato Glicólico de <i>Hamamelis virginiana</i> L.L.	
	Micro-organismos	CIM (% - mg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,3125 – 3,12	1,25 – 12,5
<i>Candida albicans</i>	0,15625 – 1,56	0,625 – 6,25
<i>Candida dubliniensis</i>	0,07812 – 0,78	0,3125 – 3,12
<i>Candida glabrata</i>	0,15625 – 1,56	0,625 – 6,25
<i>Candida guilliermondii</i>	0,03906 – 0,39	0,3125 – 3,12
<i>Candida krusei</i>	0,01953 – 0,19	0,3125 – 3,12
<i>Candida tropicalis</i>	0,03906 – 0,39	0,3125 – 3,12
<i>Enterococcus faecalis</i>	>5 - 50	>5 - 50
<i>Escherichia coli</i>	1,25 – 12,5	2,5 - 25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,25 – 12,5	1,25 – 12,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>5 - 50	>5 - 50
<i>Streptococcus mutans</i>	>5 - 50	>5 - 50

Em seguida, os biofilmes foram desenvolvidos e, por meio de testes-piloto, pode-se perceber que, para alguns micro-organismos, no período de 5 min de contato do extrato com o biofilme, havia pouca ou nenhuma redução. Dessa forma, para esses micro-organismos, os biofilmes expostos pelo período de 5 min ao extrato, foram tratados com as maiores concentrações do mesmo. Já no período de 24 h, foram utilizadas a CMM, CMM X 2 e CMM X 4 de cada micro-organismo.

Sendo assim, os testes microbiológicos realizados demonstraram que o biofilme de *A. baumannii* tratado por 5 min e 24 h com extrato glicólico de *H. virginiana* L. apresentou redução significativa com relação ao controle, mesmo quando testadas as menores concentrações da substância (Figura 1).

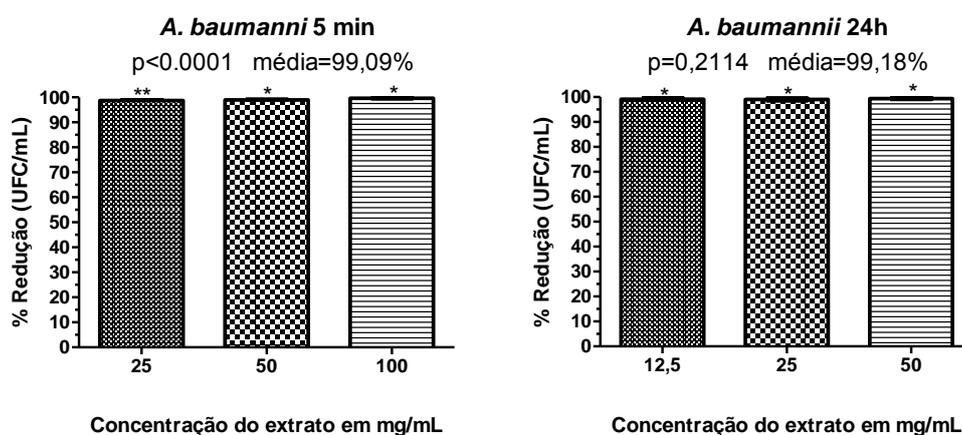


Figura 1- Biofilme de *Acinetobacter baumannii* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelo pelos períodos de 5 min e 24 h.

Com relação ao biofilme de *E. coli*, foi possível observar que, com as mesmas concentrações do extrato para os diferentes tempos de exposição do biofilme, foi obtida redução do número de UFC/mL, com médias de redução de 98,12% , no tempo de 24 h e 81,03% no tempo de 5 min (Figura 2).

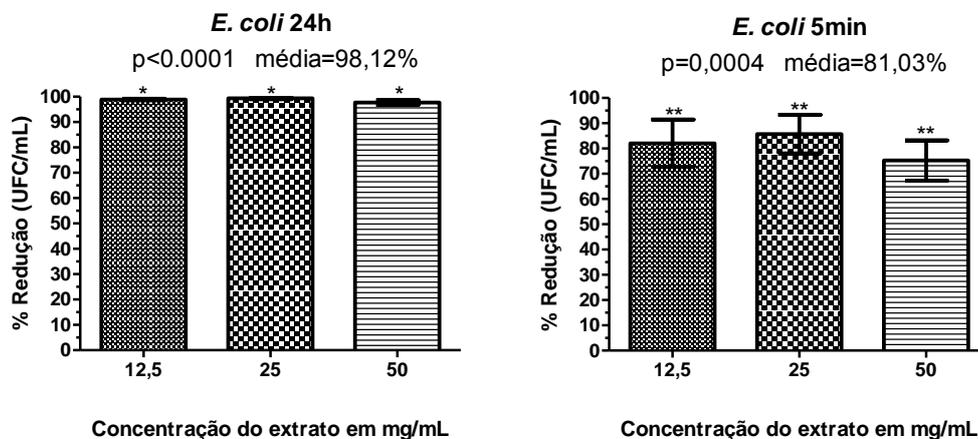


Figura 2- Biofilme de *Escherichia coli* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

As maiores concentrações do extrato em contato com biofilme de *E. faecalis* pelo período de 5 min apresentaram redução média de 57,95% do número de UFC/mL e 70,12% para 24 h de exposição (Figura 3).

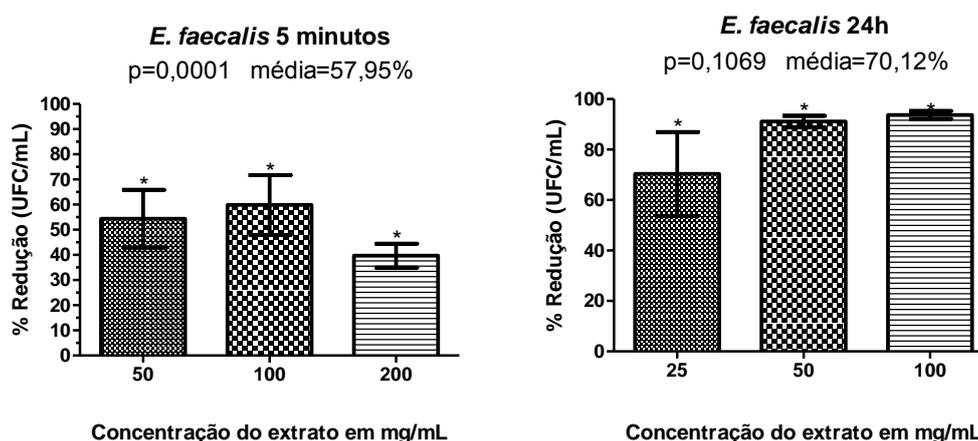


Figura 3- Biofilme de *Enterococcus faecalis* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

O biofilme de *K. pneumoniae* apresentou redução estatisticamente significativa quando exposto pelo período de 5 min às maiores concentrações do extrato (52,26%). Em adição, no período de 24 h e em menores concentrações, o percentual de redução foi de 89,68% (Figura 4).

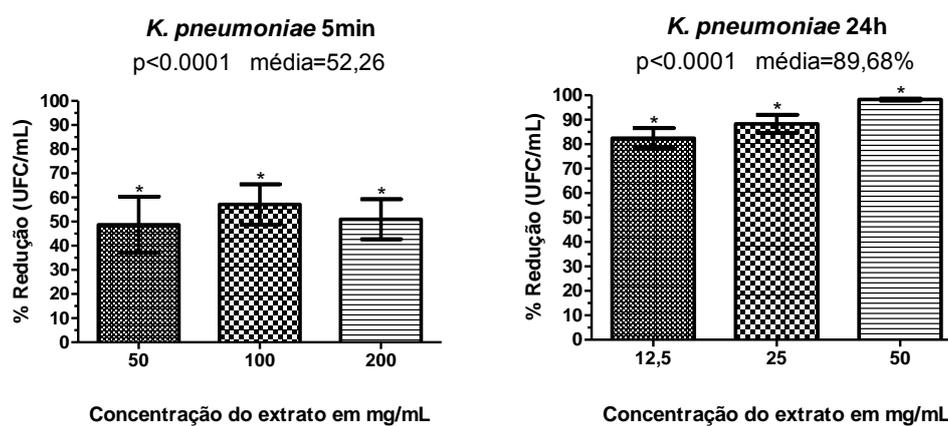


Figura 4- Biofilme de *Klebsiella pneumoniae* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

Sobre o biofilme de *S. aureus* também foi observada redução do número de UFC/mL no período de 5 min (55,19%). Já em 24 h de exposição nota-se maior redução, de 97,97% (Figura 5).

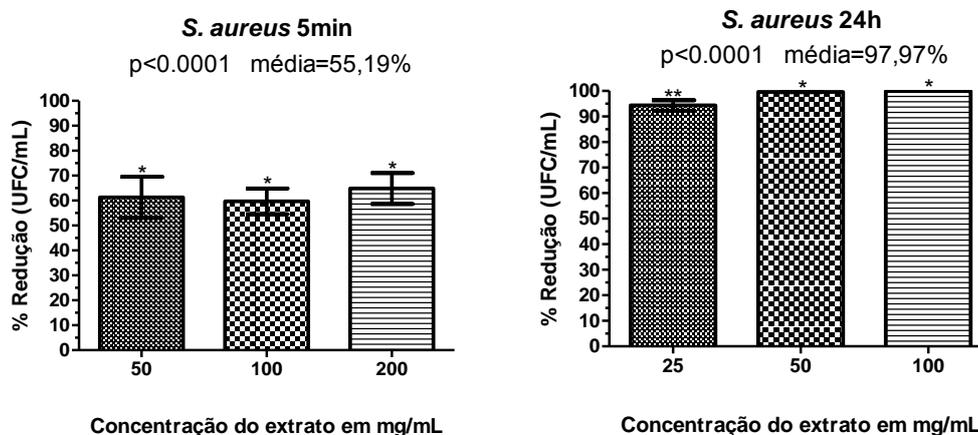


Figura 5- Biofilme de *Staphylococcus aureus* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

*S. mutans*, quando em biofilme, exibiu redução do número de UFC/mL nos dois tempos, com diminuição de 75,25% em 5 min e 92,32% em 24 h de contato (Figura 6).

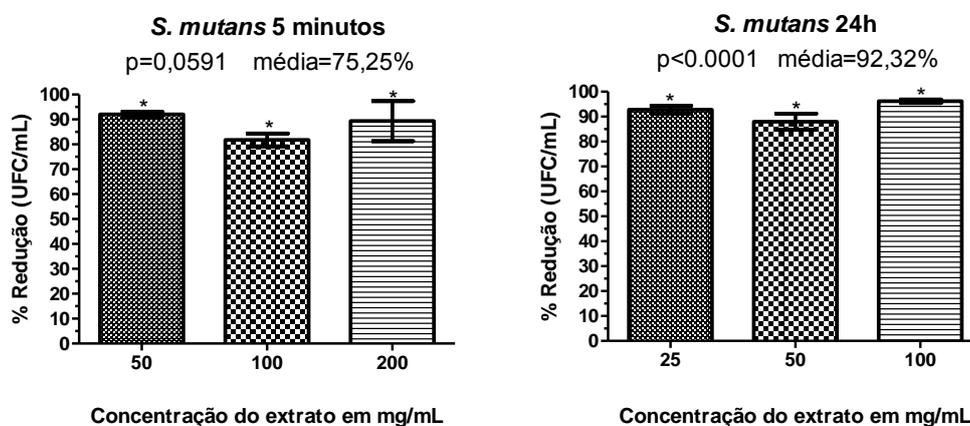


Figura 6- Biofilme de *Streptococcus mutans* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

Os resultados do extrato sobre os biofilmes das bactérias Gram-positivas são estimulantes, já que os mesmos micro-organismos em contato com diferentes concentrações do extrato, quando em fase planctônica, foram indiferentes.

Além das espécies de bactérias Gram-positivas e Gram negativas avaliadas, seis espécies de leveduras do gênero *Candida* também foram testadas no presente estudo.

*C. albicans* foi submetida às maiores concentrações do extrato no tempo de 5 min, obtendo-se uma redução de 80,90%. Já por 24 h de contato com menores concentrações do extrato, o biofilme desse micro-organismo reduziu em 94,17% o número de UFC/mL (Figura 7).

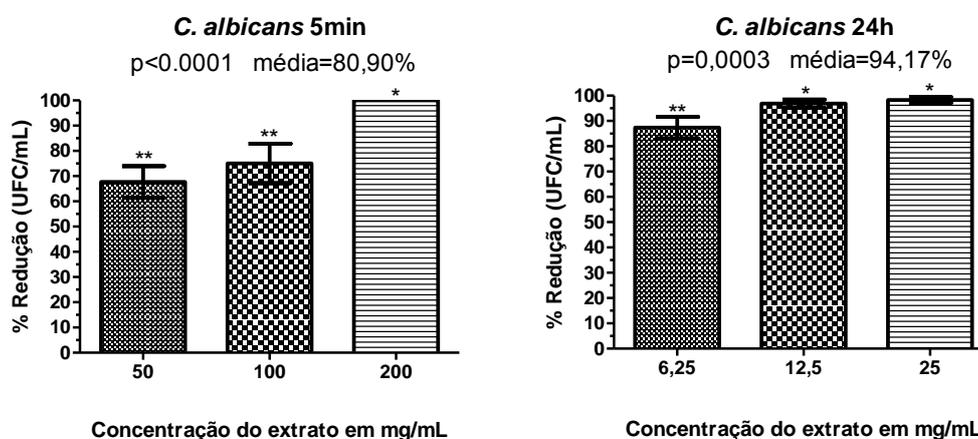


Figura 7- Biofilme de *Candida albicans* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

No tempo de 5 min de exposição ao extrato, o biofilme de *C. dubliniensis* exibiu considerável redução na contagem do número de colônias, 98,29%, sendo observado resultado semelhante para o tempo de 24h, em média 99,99% (Figura 8).

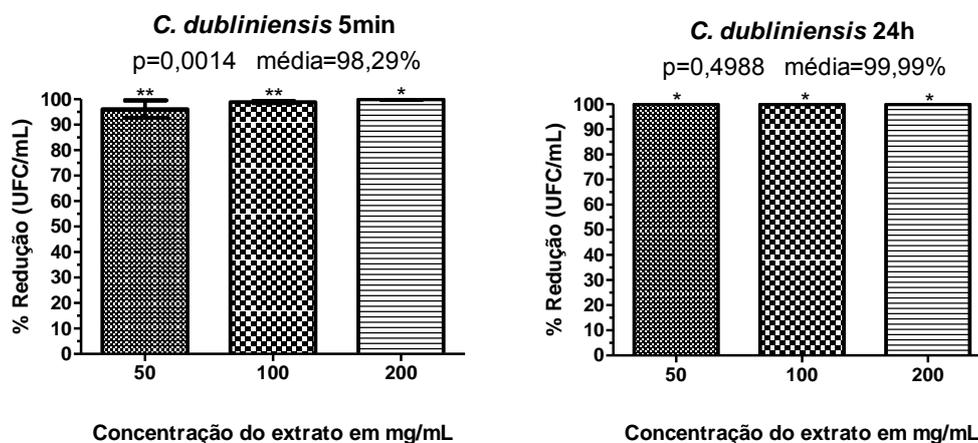


Figura 8- Biofilme de *Candida dubliniensis* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

Para o biofilme de *C. glabrata*, observou-se redução de 86,72% e 99,67% do número de UFC/mL, respectivamente, em 5 min e 24 h de exposição ao extrato (Figura 9).

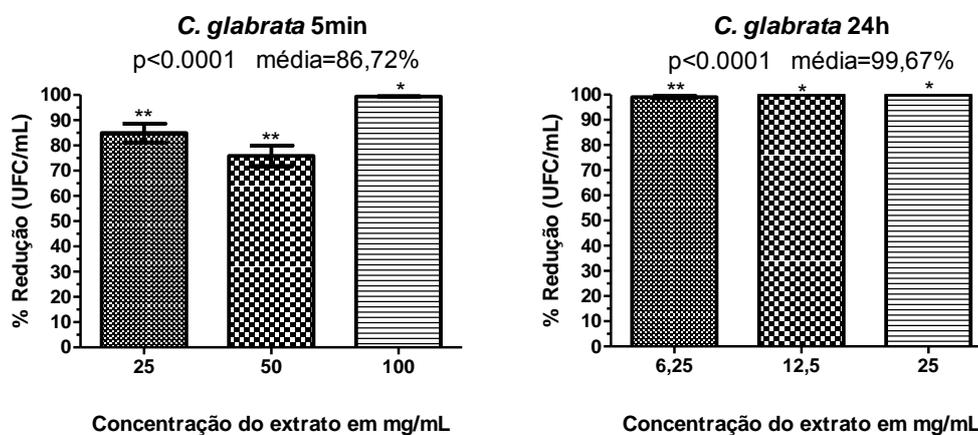


Figura 9- Biofilme de *Candida glabrata* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

*C. guilliermondii* apresentou redução média de 60,49% em 5 min, obtendo-se aumento desse valor no período de 24 h, sendo este de 97,38%.

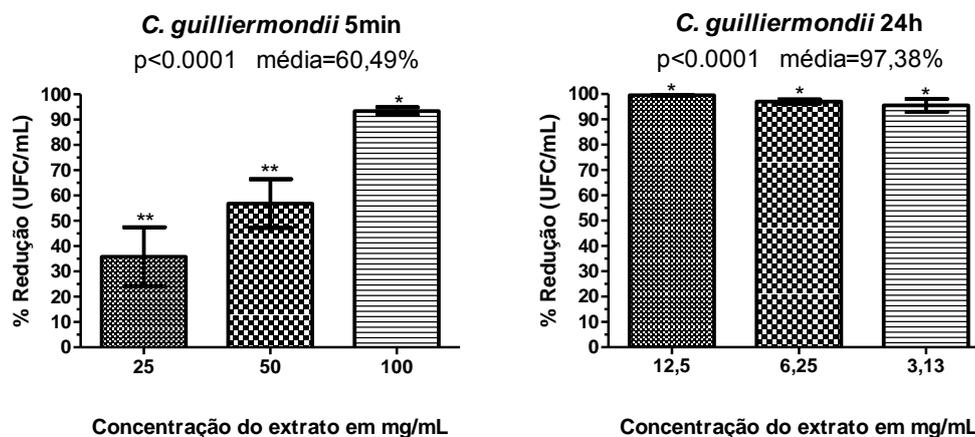


Figura 10- Biofilme de *Candida guilliermondii* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

Todas as concentrações do extrato testadas sobre o biofilme de *C. krusei* tanto no período de 5 min quanto de 24 h de exposição foram efetivas, com percentuais de redução de 49,28% e 73,35%, respectivamente (Figura 11).

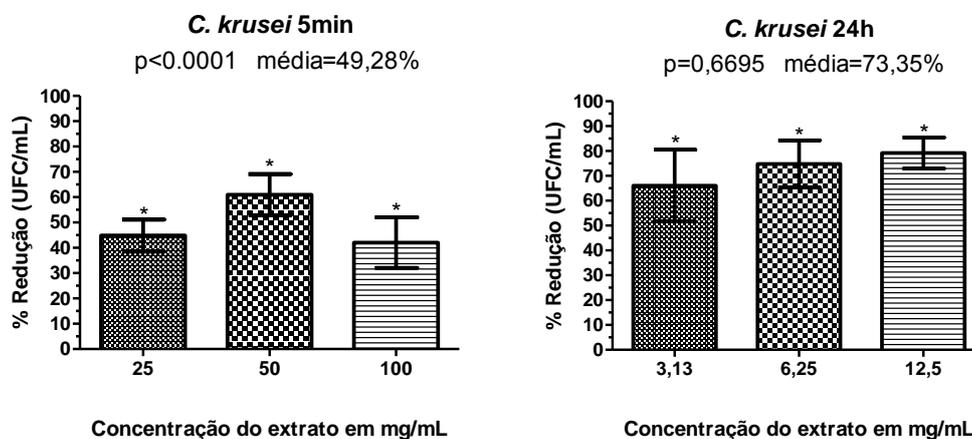


Figura 11- Biofilme de *Candida krusei* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

Os resultados obtidos com o tratamento de *C. tropicalis* foram de 89,85% de redução para o tempo de 5 min e 62,79% para o tempo de 24 h. É importante observar que, mesmo quando utilizado em

menores concentrações no período de 24 h, o extrato apresentou redução satisfatória (Figura 12).

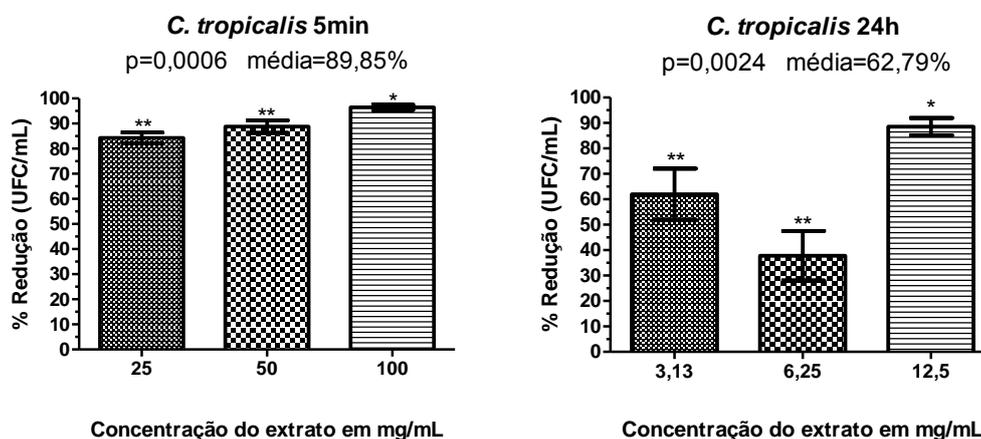


Figura 12- Biofilme de *Candida tropicalis* tratado com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelos períodos de 5 min e 24 h.

Após obtenção dos resultados para redução dos biofilmes microbianos, foram realizados testes para verificação da possível toxicidade celular causada pelo extrato de *H. virginiana* L. Pode-se observar que a viabilidade celular obtida entre os grupos controle e tratado foi estatisticamente semelhante quando as células foram expostas ao extrato pelo período de 5 min, sendo a média de viabilidade dos grupos de 107,70%. Já no período de 24 h de exposição ao extrato, todas as concentrações, exceto 100 mg/mL, mostraram resultados iguais ou superiores de viabilidade celular, com média de 120%. Tais resultados podem ser observados na figura 13.

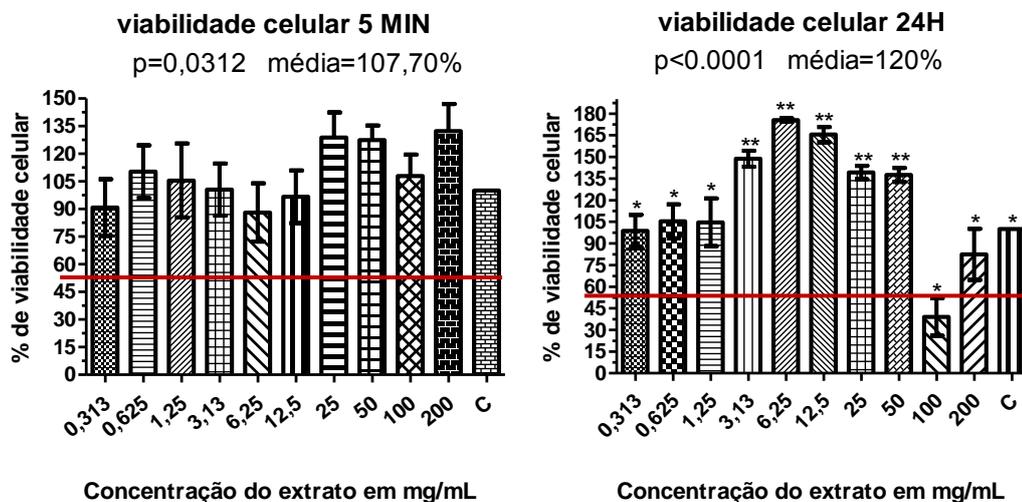


Figura 13- Percentual de viabilidade celular de macrófagos (RAW 264.7) tratados com diferentes concentrações do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelo período de 5 min e 24 h.

Também foram realizados testes para quantificação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , para três concentrações do extrato glicólico de *H. virginiana* L. nos tempos de 5 min e 24 h e na presença ou não de LPS de *E. coli*.

Os valores obtidos para IL-1 $\beta$  dos grupos tratados com extrato pelo período de 5 min, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e tratados, tanto para os grupos com LPS como sem LPS, quando comparados os valores em pg/mL (p= 0,4289). Esses resultados afirmam que o extrato controlou a produção dessa citocina e pode ser considerado agente anti-inflamatório (Tabela 2).

Tabela 2- Quantificação de citocina Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. pelo período de 5 minutos

GRUPOS	Concentração média corrigida (pg/mL) $\pm$ desvio padrão
Controle com LPS	0 $\pm$ 0
100 mg/mL LPS	0 $\pm$ 0
50 mg/mL LPS	0 $\pm$ 0
25 mg/mL LPS	0 $\pm$ 0
Padrão	328,2025583 $\pm$ 338,3098466
Controle	0 $\pm$ 0
100 mg/mL	0,184532 $\pm$ 0,553596
50 mg/mL	0 $\pm$ 0
25 mg/mL	0 $\pm$ 0

No período de 24 h de exposição das células à diferentes concentrações apenas do extrato, pode-se observar que quanto maior a concentração do extrato, maior a produção de IL-1 $\beta$ . O grupo tratado com 100 mg/mL de extrato apresentou aumento da produção dessa substância quando comparado ao controle. Para os grupos tratados com extrato acrescidos de LPS, houve redução da produção de IL-1 $\beta$  pelas células em 99,62% (Figura 14).

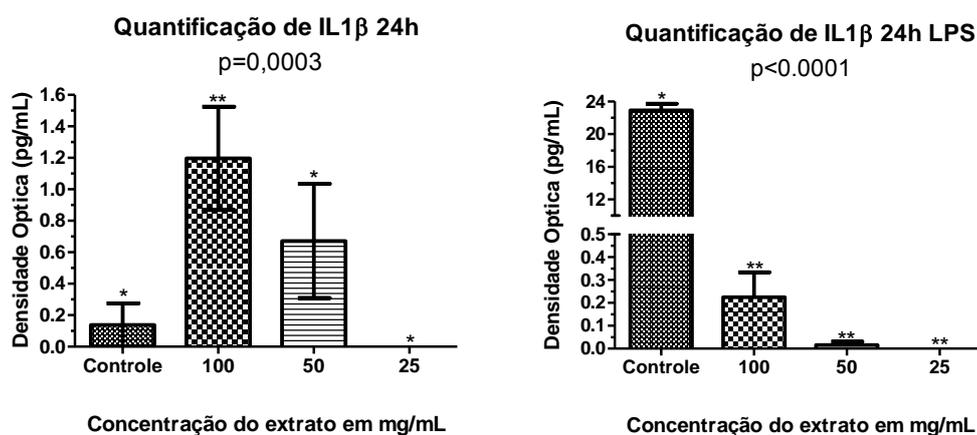


Figura 14- Quantificação de citocina Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. acrescidos ou não de LPS de *E. coli* pelo período de 24 horas (pg/mL).

Na quantificação de TNF- $\alpha$  pode-se observar que os grupos tratados com extrato pelo período de 5 min, mas sem acréscimo de LPS, os grupos 50 mg/mL e 25 mg/mL foram significativamente iguais ao controle, mostrando que o extrato não influenciou na produção desta citocina. Entretanto, a maior concentração do extrato houve redução da produção desta substância ainda menor que o controle, 46,54%. Da mesma forma, para os grupos tratados com extrato acrescidos de LPS, também foi possível observar que quanto menor a concentração do extrato, mais citocina é produzida, embora tenha havido uma média de redução de 89,44% com relação ao controle (Figura 15).

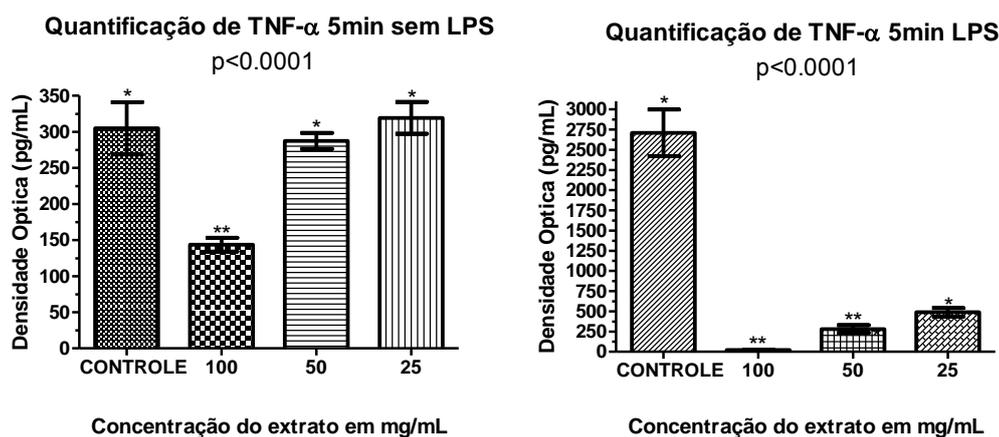


Figura 15- Quantificação de citocina TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. acrescidos ou não de LPS de *E. coli* pelo período de 5 minutos (pg/mL).

Já no período de 24 h, tanto os grupos tratados apenas com extrato quanto os tratados com extrato e LPS apresentaram produção de TNF- $\alpha$  estatisticamente menor do que o controle, mostrando que além de o extrato não auxiliar na produção desta substância, ainda a reduziu, sendo os valores médios de diminuição de 86,25% e 99,93% respectivamente para os grupos sem e com LPS (Figura 16).

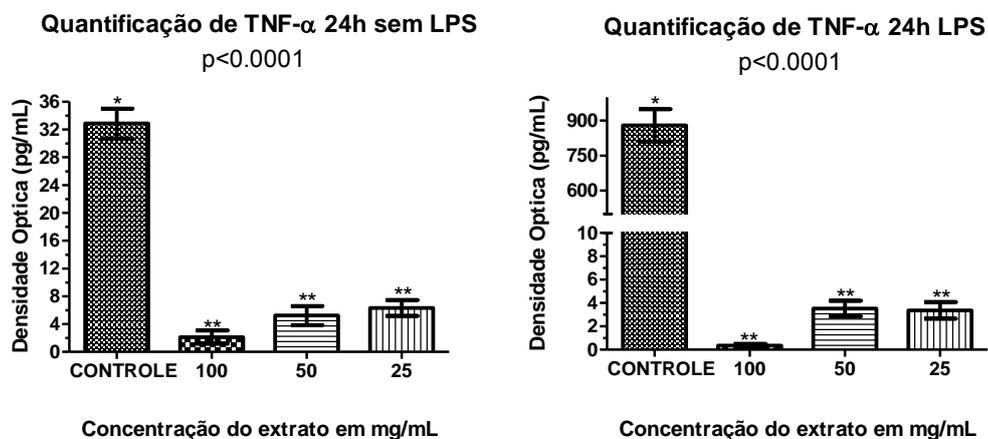


Figura 16- Quantificação de citocina TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. acrescidos ou não de LPS de *E. coli* pelo período de 24 horas (pg/mL).

Quanto à citotoxicidade provocada pela produção de óxido nítrico, todos os grupos tratados apenas com extrato por 5 min apresentaram resultados significativamente iguais ao controle, provando que o extrato não influenciou na produção dessa substância pelos macrófagos. Resultados similares foram obtidos para os grupos tratados com extrato e LPS (Figura 17).

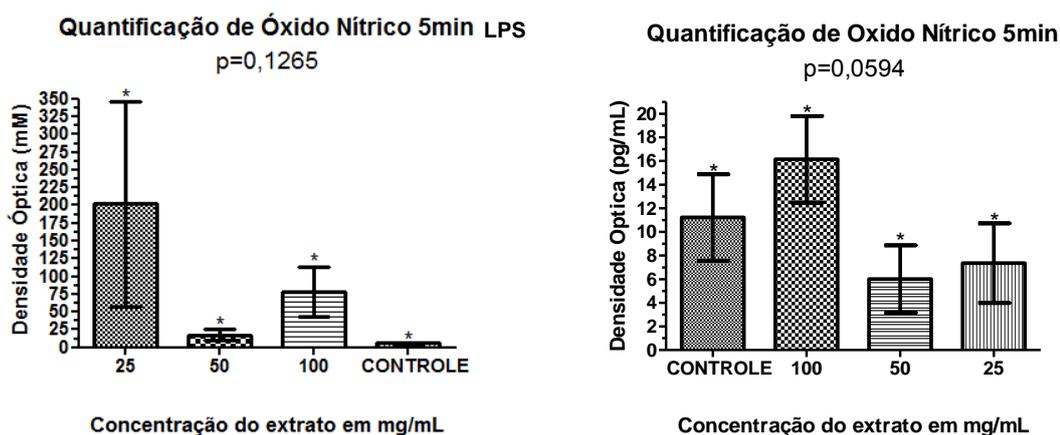


Figura 17- Quantificação de óxido nítrico por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. acrescido ou não de LPS de *E. coli* pelo período de 5 min.

Assim como para o período de 5 min, não foi observada citotoxicidade pela produção de óxido nítrico pelos macrófagos, quando em contato pelo período de 24 h. Os grupos tratados com maiores concentrações do extrato e LPS apresentaram aumento da quantidade de óxido nítrico, fator que pode estar relacionado à ampla atividade antimicrobiana observada tanto nos testes do planctônico como em biofilme (Figura 18).

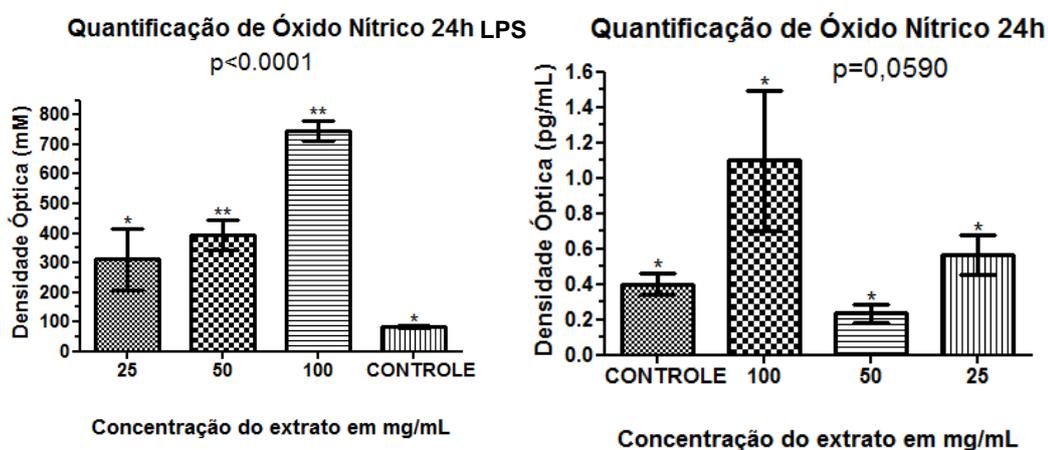


Figura 18- Quantificação de óxido nítrico por macrófagos de camundongo (RAW 264.7) tratados com extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. acrescido ao não de LPS de *E. coli* pelo período e 24 horas.

## 6 DISCUSSÃO

Extratos de plantas ou substâncias extraídas de vegetais estão sendo frequentemente utilizadas no combate à diversos micro-organismos causadores de doenças, inclusive os relacionados à cárie, doença periodontal e formadores de biofilme (Palombo, 2011).

O hamamelitano é um composto da família dos taninos, que são polifenóis naturais encontrados na casca e folhas de *H. virginiana* L., um arbusto de folhas decíduas, nativo de florestas da região leste da América do Norte e Canadá. Nas folhas e casca dessa planta são encontradas, respectivamente, 0.04% e 5% de hamamelitano. Antigamente, *H. virginiana* L. era frequentemente utilizada pela população indígena para alívio da dor, febre e resfriados. Atualmente é usada em produtos de cuidados com a pele e no tratamento dermatológico de queimaduras solares, irritação cutânea e eczema atópico. *H. virginiana* L. possui, ainda, ação biológica cicatrizante, anti-inflamatória e adstringente conferidos pela presença de taninos e flavonoides. A ação antimicrobiana de *H. virginiana* L. também é relatada em alguns trabalhos, principalmente para micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, pois age sobre o *quorum sensing*, levando a redução da virulência desses micro-organismos (Korting et al., 1993; Korting et al., 1995; Brantner, Grein, 1994; Cobrado et al., 2012; Hortolan et al., 2014). Concentrações inferiores a 100 M de hamamelitano inibem o fator de necrose tumoral endotelial mediada por apoptose, já a 50 M possui alta atividade contra danos celulares induzidos por peróxidos ou radiação ultra-violeta (Masaki et al., 1995; Habtemariam, 2002).

Vários estudos estão sendo realizados para obtenção da sensibilidade de micro-organismos, *in vitro* e *in vivo*, a fármacos

convencionais e medicamentos alternativos, como os fitoterápicos. Desse modo, inúmeros métodos estão sendo utilizados para encontrar a CIM e CMM de micro-organismos, como o do disco difusão, diluição em agar e microdiluição em caldo, o qual se enquadra nos testes realizados no presente trabalho.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram menor ação do extrato sobre os micro-organismos Gram-positivos na fase planctônica, quando comparados aos obtidos para bactérias Gram-negativas (3,12 – 25 mg/mL). Tais resultados corroboram com os alcançados por Brantner e Grein (1994) que, por meio do método da microdiluição em caldo e da utilização de 35 extratos diferentes, dentre eles o aquoso de cascas de *H. virginiana* L. sobre *S. aureus*, *E. faecalis*, *Bacillus subtilis* e *E. coli*, obtiveram resultados de CIM superiores para micro-organismos Gram-positivos (0.08-30.7 mg/ml) se comparados aos Gram-negativos (0.07-25.7 mg/ml). Os autores afirmam que os extratos testados apresentam grande potencial para o tratamento de infecções e lesões de pele e que resultados ainda melhores podem surgir de futuros estudos.

Iauk e colaboradores em 2003 avaliaram, dentre outros, decocção e extrato metanólico de folhas de *H. virginiana* L. sobre bactérias periodontopatogênicas, e puderam comparar a ação inibitória dos extratos testados à espiramicina, um clássico antibiótico da classe dos macrolídeos frequentemente utilizado na odontoterapia. Destacam, ainda, que *H. virginiana* L. é uma planta medicinal com ótima atividade antimicrobiana sobre a maioria das espécies testadas, tendo o extrato metanólico apresentado melhores resultados quando comparado à decocção. Sobre bactérias Gram-negativas, o extrato metanólico teve efeito sobre *Eikenella corrodens* na concentração de 32 mg/L e sobre quase todas as cepas de *Porphyromonas gingivalis* testadas, pois uma apresentou CIM de 2048 mg/L; além de inibir *Prevotella* spp. em concentrações  $\leq$  512 mg/L e *Actinomyces* spp. com CIM entre 32-128

mg/L. Altas concentrações do extrato foram necessárias para inibir *V. parvula* (CIM 2048 mg/L), *Capnocytophaga gingivalis* (CIM 4096 mg/L) e também para *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus* spp. (CIM 2048 mg/L), sendo este último considerado um micro-organismo resistente a vários antibióticos de uso odontológico. A decocção, embora tenha apresentado menor efeito sobre as cepas testadas, proporcionou atividade antimicrobiana confirmada sobre *P. gingivalis*, *Prevotella* spp., *E. corrodens* e *Actinomyces* spp. Com relação à CBM, o extrato metanólico de *H. virginiana* L. testado sobre cepas de *P. melaninogenica* e *A. odontolyticus* não apresentou atividade bactericida (CBM  $\geq$  16384 mg/L).

Embora tanto os extratos como as bactérias Gram-negativas testadas no presente estudo sejam diferentes das avaliadas por lauk e colaboradores em 2003, houve relação entre os resultados, já que o extrato glicólico de *H. virginiana* L. apresentou menor percentual de redução quando testado sobre o biofilme de *K. pneumoniae* (52,26% e 89,68%) pelo período de 5 min e 24 h, respectivamente; e quando comparado aos resultados obtidos pelas outras bactérias, sendo *A. baumannii* 99,09% e 99,18% e *E. coli* 98,12% e 81,03%.

O hamamelitano é uma substância natural que quando utilizada de forma isolada ou em associação a outros antibióticos proporcionou atividade antibiofilme, principalmente, sobre cepas padrão de *S. aureus* e *S. aureus* metilicina resistentes (MRSA) e *S. epidermidis*, bactérias sabidamente formadoras de biofilme. A ação dessa substância é devido ao poder de inibição de alguns mecanismos considerados fatores de virulência como o *quorum sensing* e adesão à superfícies. Como resultados, os autores obtiveram que a associação entre o hamamelitano (20 µg/mL) e vancomicina e clindamicina apresentou maior inibição da formação de biofilme, quando comparado à ação de cada componente de forma isolada, podendo, a substância inibidora de *quorum sensing*, como o hamamelitano, aumentar a eficácia dos fármacos

convencionais, alcançando tratamento mais eficaz em infecções *in vivo* (Brackman et al., 2011; Kiran et al., 2008; Bassyouni et al., 2015).

Cobrado et al. (2012) realizaram estudos para verificar a ação antimicrobiana de três compostos, dentre eles o hamamelitano, sobre o sistema *quorum sensing* de cepas padrão e clínicas de *A. baumannii*, *C. albicans*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, micro-organismos frequentemente envolvidos na formação de biofilme em catéter venoso central. Dessa forma, puderam verificar que hamamelitano na concentração de 100 mg/mL reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme de *A. baumannii* em 31,8%, *S. aureus* em 23% e *S. epidermidis* em 42,2% e para *C. albicans*, resultados inconclusivos foram obtidos, embora em menores concentrações hamamelitano tenha sido fungistático.

Embora no presente estudo não se tenha utilizado o hamamelitano purificado, obteve-se bons resultados com o extrato glicólico de *H. virginiana* L. sobre as cepas de *A. baumannii* e *Candida*, principalmente *C. albicans*.

Kiran e colaboradores em 2008 avaliaram a ação do hamamelitano em ratos Wistar, nos quais foi desenvolvida infecção por MRSA e *S. epidermidis* metilina resistentes (MRSE). Testes preliminares realizados *in vitro* evidenciaram que o hamamelitano não apresentou ação antimicrobiana sobre as cepas testadas, considerando que a ação da ampicilina sobre *S. aureus* é de 0,1 g/mL e que do hamamelitano foi 12.500 vezes maior sem apresentar inibição do crescimento celular. Em contradição, a presença do hamamelitano, *in vivo*, controlou a carga microbiana e na concentração de 20 µg da substância já não havia crescimento microbiano. Além disso, os autores comprovaram que a presença do hamamelitano dificulta a adesão microbiana sobre a superfície do poliestireno.

Com relação à atividade citotóxica de *H. virginiana* L., Masaki e colaboradores, em 1995 estudaram a ação citotóxica de

diversas concentrações do hamamelitano sobre fibroblastos epiteliais observando que com o aumento da concentração da substância, menor atividade citotóxica havia.

Sánchez-Tena e colaboradores, em 2012 encontraram surpreendíveis resultados ao testarem a ação citotóxica de diferentes concentrações do hamamelitano sobre células saudáveis e cancerígenas de cólon uterino. Verificaram, para células anômalas, redução de viabilidade celular indiretamente proporcional ao aumento da concentração de hamamelitano. Já para células saudáveis, alta viabilidade celular foi encontrada. Outros autores supõem que taninos e proantocianinas sejam as substâncias responsáveis pela ação sobre células tumorais (Maldonado-Celis et al., 2008; McDougall et al., 2008).

Oliveira et al., em 2011 testaram, dentre outras, a atividade citotóxica de diferentes concentrações de extratos glicólicos de alcaçuz, barbatimão, cavalinha e romã. Obtiveram como resultados que o extrato de cavalinha foi o único a apresentar viabilidade celular inferior a 50% em algumas das concentrações testadas. Em contrapartida, o extrato de barbatimão apresentou grupos com viabilidade celular superiores ao controle (100%). Uma observação importante é que não existe relação entre a concentração do extrato e a viabilidade celular, pois existem menores concentrações que apresentam viabilidade reduzida e vice-versa, quando comparados os grupos.

Sendo assim, de forma geral, o presente estudo proporcionou valores de viabilidade celular acima de 50%, com a maior sobrevida nos grupos tratados com extrato por 24 h, embora neste tempo e na concentração de 100 mg/ mL, a viabilidade tenha sido inferior a 50%. Trabalho realizado por Jesus e colaboradores, em 2015 encontrou igual resultado na mesma concentração (100 mg/ mL) com extrato glicólico de *Persia americana* sobre macrófagos tratados pelo período de 5 min de exposição ao extrato.

Além da atividade citotóxica em macrófagos avaliada por Oliveira, em 2011, o mesmo autor realizou a quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ ) produzidas pelas células. Dois de seus extratos, glicólico de romã e barbatimão, apresentaram as maiores quantidades desta substância, tendo os dois outros grupos apresentado resultados iguais ao controle.

No presente estudo, a produção de citocina IL-1 $\beta$  pelos grupos tratados foi comparada ao controle e resultados significativamente iguais foram obtidos tanto para os dois tempos quanto para a presença ou ausência de LPS, sendo possível notar que não houve a produção dessa substância pelos macrófagos (RAW 264,7). Além disso, também foi notado o que Korting e colaboradores em 1993 encontraram em seu estudo, que com o aumento da concentração do extrato não existe avanço da atividade biológica.

Estudo realizado por Habtemariam em 2002 verificou a produção de TNF- $\alpha$  por células endoteliais tratadas com hamamelitano e observou que maiores concentrações da substância levavam à menor produção de TNF- $\alpha$ . Tais resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho que, mesmo não tendo utilizado a substância isolada e a mesma célula como material de estudo, obteve resultados semelhantes tanto para os macrófagos tratados por 5 min ou 24 h, como os tratados com ou sem LPS.

A produção de óxido nítrico por macrófagos também foi realizada no presente trabalho. O óxido nítrico é uma substância que pode ser produzida por várias células e possui diferentes atividades biológicas, como transmissão de estímulos nervosos, coagulação sanguínea, pode atuar na modulação de respostas inflamatórias quando produzido em altas concentrações (Moncada et al., 1991). Nitrito, nitrato, nitrosaminas e peroxinitrito, são alguns de seus metabólitos ativos responsáveis por efeitos tóxicos como inibição da respiração mitocondrial, danos protéicos, incluindo danos à moléculas de DNA. Como

consequência desses efeitos, podem ser observadas alterações genéticas, perda de função protéica, morte celular e necrose tecidual (Lima et al., 2008).

Contra micro-organismos e células tumorais, o óxido nítrico é um componente tóxico que pode levar à morte ou inibição desses corpos estranhos, entretanto, pode levar à vasodilatação patológica e danos teciduais no hospedeiro. Estudos recentes revelam que, por meio de estímulo de macrófago murinos com TNF- $\alpha$ , essas células produziram grande quantidade de óxido nítrico, sendo possível que reativos intermediários gerados por essa substância desempenhem função sobre as atividades tumoricida e microbicida (Moncada et al., 1991). A produção de óxido nítrico por células teciduais do pulmão e fígado, por exemplo, quando em contato com LPS da membrana externa de bactérias Gram-negativas, está intimamente ligada à imunidade inespecífica, já que ambos os órgãos estão estrategicamente alocados na circulação para servir como filtros imunológicos (Carlos et al., 2005).

Estudos revelam toxicidade óxido nítrico-dependente gerada por macrófagos, hepatócitos e células de adenocarcinoma. Em adição, sobre a viabilidade celular e proliferativa, o óxido nítrico pode desempenhar um importante papel na regulação normal de células mitóticas, embora possa agir sobre algumas enzimas do ciclo celular, e de acordo com estas, gerar consequências citotóxicas ou citostáticas (O'Connor, Moncada, 1991).

O óxido nítrico está envolvido na patogenicidade de muitas doenças inflamatórias crônicas por tratar-se de uma substância intimamente ligada a processos inflamatórios. A superprodução de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios resultam em patologias associadas a doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide, aterosclerose, diabetes e câncer. Por outro lado, a inibição do óxido nítrico e de mediadores pró-inflamatórios talvez seja uma útil estratégia clínica para o tratamento de uma infinidade de doenças

inflamatórias. O lipopolissacarídeo é a substância de maior estímulo inflamatório de macrófagos que desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral e IL1- $\beta$ . As células RAW 264.7 são macrófagos murinos de camundongo utilizadas como excelente modelo *in vitro* para triagem de drogas e avaliação do potencial inibidor de vias de sinalização, especialmente quando estimuladas com LPS (Li et al., 2015).

Em estudo realizado por Li e colaboradores, em 2015, ao testarem, dentre outros parâmetros, a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 267.4 tratados com herbacetin, um flavonóide natural extraído de algumas espécies vegetais, na presença ou não de LPS puderam observar uma redução progressiva do óxido nítrico, com relação ao controle, quando tratadas com herbacetin.

Tabarsa e colaboradores, em 2015, avaliaram a ação de uma substância imunoestimuladora (NF) extraída de *Codium fragile*, uma espécie de alga marinha, sobre macrófagos RAW 264.7 e puderam observar um aumento da produção de óxido nítrico por essas células quando estimuladas com LPS e tratadas com NF sendo os níveis comparados aos das células tratadas apenas com LPS, indicando uma forte atividade estimulante.

Sendo assim, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os obtidos por Tabarsa et al. (2015) e vão de encontro com os obtidos por Li et al. (2015) para os sobrenadantes das células em contato prévio com LPS e extrato pelo período de 5 min, são valores significativamente iguais ao controle negativo, ou seja, sem a presença de nitrito. Entretanto, os sobrenadantes das células que permaneceram em contato por 24 h com o extrato acrescido de LPS, apresentaram resultados semelhantes ao padrão ou controle positivo, mostrando maior produção de óxido nítrico por essas células, embora, para a concentração de 50 mg/mL de extrato (com ou sem LPS) não tenha havido aumento

dessa substância, bem como para os resultados obtidos no tempo de 5 min sem contato das células com LPS.

Dessa forma, é possível afirmar que existem ainda inúmeras vertentes de pesquisas que podem ser realizadas com extratos de *H. virginiana* L. e que o presente estudo apontou algumas dessas, mostrando que esta é uma espécie vegetal de grande importância farmacológica devido às suas vastas ações biológicas conhecidas, sendo seus extratos potenciais medicamentos para o tratamento de infecções superficiais, orais e sistêmicas.

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L.:

- a) apresentou ação antimicrobiana sobre os microorganismos testados, tanto na fase planctônica quanto em biofilme monotípico;
- b) manteve ou elevou a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7;
- c) não levou à produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, bem como para óxido nítrico, ocorrendo, por vezes, redução dessas substâncias.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Asadoorian J. CDHA Position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. *Canadian J Dent Hyg.* 2006 Jul-Aug;40(4):1-13.

Balbino EE, Dias MF. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Rev Bras Farmacogn.* [Internet]. 2010, [citado 2015 Dez 01];20(6):992-1000. Disponível em <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/659d46804ad58b02a36bafa337abae9d/Farmacovigilancia\\_um\\_passo\\_em\\_direcao\\_ao\\_uso\\_racional\\_d\\_e\\_plantas\\_medicinais\\_e\\_fitoterapicos\\_Farmacovigilancia.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/659d46804ad58b02a36bafa337abae9d/Farmacovigilancia_um_passo_em_direcao_ao_uso_racional_d_e_plantas_medicinais_e_fitoterapicos_Farmacovigilancia.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 27 de janeiro de 2016.

Bassyouni RH, Dwedar RA, Farahat MG, Kamel Z, Elwekel AE. Protective effect of hamamelitannin against biofilm production by methicillin-resistant staphylococci isolated from blood of patients at intensive care units. *Br Microbiol Res J.* 2015;10(5).

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

Bhavanani SM, Ballow CH. New agents for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 1992;13:528-534.

Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jun;55(6):2655–61

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução: RDC nº 222, de 02 de agosto de 2005. Diário Oficial da União.

---

\*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals; Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago

2013; acesso em 25 out 2014]. US National Library of Medicine; [about 6 p.] disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.htm](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htm)

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. [Internet] Brasília: ANVISA; 2006. [Série B. textos Básicos de Saúde]. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)> Acesso em 13 de janeiro de 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada: RDC nº 26/2014: guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f7288044703a8bbb8fffe3a642e80/Guia+final+dicol+180614.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 13 de janeiro de 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica [Internet]. [Série A. Normas e Manuais Técnicos: Cadernos de Atenção Básica, n. 31] Brasília: Ministério da Saúde; 2012a. Disponível em <[http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/miolo\\_CAP\\_31.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/miolo_CAP_31.pdf)> Acesso em 14 de janeiro de 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2012b. [Série A. Normas e Manuais Técnicos]. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/servicos\\_farmaceuticos\\_atencao\\_basica\\_saude.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/servicos_farmaceuticos_atencao_basica_saude.pdf)> Acesso em 13 de janeiro de 2016.

Brantner A, Grein E. Antimicrobial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 1994;35-40. Disponível em <[http://ac.els-cdn.com/0378874194900965/1-s2.0-0378874194900965-main.pdf?\\_tid=6a8f0fde-c4ee-11e5-bbef-00000aab0f6b&acdnat=1453896577\\_67da1b3ac2d2dbdb145c827259954b7d](http://ac.els-cdn.com/0378874194900965/1-s2.0-0378874194900965-main.pdf?_tid=6a8f0fde-c4ee-11e5-bbef-00000aab0f6b&acdnat=1453896577_67da1b3ac2d2dbdb145c827259954b7d)>. Acesso em 27 de janeiro de 2016.

Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia.* 2000 Aug;71(1):58-65.

Carlos IZ, Lopes FCM, Benzatti FP, Carli CBA, Marques MF, Jordão Junior CM, et al. Ação do extrato metanólico e etanólico de Davilla

elliptica St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. Rev Bras Farmacogn. 2005;15(1):44-50.

Castilho AR. Produtos naturais em Odontologia. Revista Saúde. 2007;1(1):11-19.

Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Anti-adherent activity of Rosmarinus officinalis essential oil on Candida albicans: an SEM analysis. Rev Odonto Cienc. 2011;26(2):139-44.

Clinical and laboratorial Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts [Internet]. 2 nd. Wayne: CLSI; 2002 [acesso 2016 Jan 13]. Disponível em <file:///D:/Downloads/M27-A2.pdf>. [Approved Standard – M27-A2, Replaces M27-A].

Clinical and laboratorial Standard Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [Internet]. 9th ed. Wayne: CLSI; 2012 [acesso 2016 Jan 13]. Disponível em <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>. [Approved standard – M07-A9, Replaces M07-A8.document M7- A8].

Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? J Antimicrob Chemother. 2012:1-4.

Costa JGM, Leite GO, Dubois AF, Seeger RL, Boligon AA, Athayde ML, et al. Antioxidant effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): potential involvement in its therapeutic use. Molecules. 2012 Jan;17(1):934-50.

Dauer A, Hensela A, Lhosteb E, Knasmüllerc S, Mersch-Sundermann, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L.L. L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. Phytochem Lett. 2003 May;63:199–207.

Duckstein SM, Lorenz P, Stintzing FC. Conversion of phenolic constituents in aqueous *Hamamelis virginiana* L. leaf extracts during fermentation. Phytochem Anal. 2012 Nov-Dez;23(6):588-97.

Eisenstein BI, Schaechter M. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p 10-5.

Faivre C, Ghedira AK, Goetz P, Le Jeune R. *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae). *Phytothérapie*. 2009;7(4):215-20.

Ferreira Filho JCC, Cunha DA, Pereira IF, Gondin BLC, Valença AMG. Avaliação da atividade antibacteriana das tinturas de *Hamamelis virginiana* L.L. L. e *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. frente a bactérias bucais. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2013;17(1):71-8.

Gaetti-Jardim Júnior E, Landucci LF, Gaetti-Jardim EC, Sangalli J, Sousa FRN. Atividade inibitória de extratos do cerrado brasileiro sobre microrganismos anaeróbios e associados a infecções nosocomiais. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2009;13(2):43-52.

Habtemariam S. Hamamelitannin from *Hamamelis virginiana* L. inhibits the tumour necrosis factor-alpha (TNF)-induced endothelial cell death in vitro. *Toxicol*. 2002 Jan;40(1):83-8.

Haraguchi LMM, Carvalho OB. Plantas medicinais: curso de plantas medicinais. São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente; 2010. p. 19-32.

Hortolan E, Coelho MV, Simiel JJ, Braga GAA, Moreno AH. Verificação de alguns parâmetros de qualidade de extratos vegetais. *Cienc Pesq Consciênc*. 2014 Jan-Dez;6(1):11-6.

Hughes-Formella BJ, Filbry A, Gassmueller J, Rippke F. Anti-inflammatory efficacy of topical preparations with 10% hamamelis distillate in a UV erythema test. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002 Mar-Apr;15(2):125-32

Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother. Res*. 2003 Jun;17(6):599-604.

Jesus D, Oliveira JR, Oliveira FE, Higa K, Junqueira JC, Jorge AOC et al. *Persia americana* glycolic extract: in vitro study of antimicrobial activity against *Candida albicans* biofilm and cytotoxicity evaluation. *ScientificWorldJournal*. 2015.

Kiran MD, Adikesavan NV, Cirioni O, Giacometti A, Silvestri C, Scalise G et al. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol Pharmacol*. 2008;73(5):1578-86.

Korting HC, Schaefer-Korting M, Hart H, Laux P, Schmid M. Anti-inflammatory activity of hamamelis distillate applied topically to the skin. Influence on vehicle and dose. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;44(4):315-8.

Korting HC, Schaefer-Korting M, Klövekorn W, Klövekorn G, Martin C, Laux P. Comparative efficacy of hamamelis distillate and hydrocortisone cream in atopic eczema. *Eur J Clin Pharmacol.* 1995;48(6):461-5.

Li L, Sapkota M, Kim S, Soh Y. Herbacetin inhibits inducible nitric oxide synthase via JNK and nuclear factor- $\kappa$ B in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Eur J Pharmacol.* 2015 Oct;765:115-23.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn.* 2006 Apr-Jun;16(2):197-201.

Lima Júnior JF, Vieira LB, Leite MJVF, Lima KC. O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. *Saúde Rev.* 2005;7(16):11-7.

Lima V, Bezerra MM, Leitão RFC, Brito GAC, Rocha FAC, Ribeiro RA. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – papel de mediadores farmacológicos. *R. Periodontia.* 2008, Sep;18(3):7-9.

Lisboa T, Nagel F. Infecção por patógenos multi-resistentes na UTI: como escapar? *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(2):120-4.

Lopes DCDXP, Freitas ZMF, Santos EP, Tomassini TCB. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16(2):206-10.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Junior ACP. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova.* 2002 Mai; 25(3):429-38.

Maldonado-Celis ME, Roussi S, Foltzer-Jourdainne C, Gossé F, Lobstein A, Hahold C, Roessner A, Schneider-Stock, Raul F. Modulation by polyamines of apoptotic pathways triggered by procyanidins in human metastatic SW620 cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008:1425-1434.

Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Protective activity of hamamelitannin on cell damage of murine skin fibroblasts induced by UVB irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 1995 Jul;10:25-34.

Matos EL. Breve histórico da legislação ambiental brasileira e dos movimentos ambientalistas. *Curitiba, Aracaju.* 1999;2(1):69-83.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–128.

McDougall GJ, Ross HÁ, Ikeji M, Stewart D. Berry extracts exert diferente antiproliferative effects against cervical and colon câncer cells grown in vitro. *J Agric Food Chem*. 2008;56(9):3016-23.

Ming LC, Ferreira MI, Gonçalves GG. Pesquisas agronômicas de plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. *Rev Bras Plantas Med*. 2012;14(m e esp.):131-37.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ver*. 1991 Jun;43(2):109-42.

Moreti DLC, Martins CHG, Alves EG, Prado FO, Paz K, Regis GC et al. Estudo hematológico em ratos sob ação de planta medicinal. XLIX. *Hamamelis virginiana L*. *Rev Bras PI Med*. 2006;8(4):152-64.

O'Connor KJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase and the related cell damage in adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys*. 1991 Oct; 1097(3):227-31.

Oliveira LCBS, Carneiro PPM, Fischer RG, Tinoco BEM. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. *Rev Bras Ter Inten*. 2007 Out-Dez;19(4):428-33.

Oliveira MAC. Plantas medicinais utilizadas para problemas bucais: estudo etnobotânico em diferentes biomas da Paraíba [Trabalho de Conclusão de Curso]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2010.

Oliveira, JR. Ensaio de citotoxicidade de extratos naturais após determinação da concentração microbicida mínima para *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus mutans* E *Candida spp.* [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid-Based Complement Alternat Med*. 2011; 680354. Epub 2011 Jan 12. doi:10.1093/ecam/nep067.

Piva E, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados *in vitro*: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. *Rev Odontol UNESP, Araraquara*. 2011 Set-Out;40(5):222-7.

Ramos MFS, Santos EP, Silva AB, Leitão AC, Dellamora-Ortiz GM. Avaliação fototóxica e screening mutagênico de extratos de própolis, *Aloe* spp. e *Hamamelis virginiana* L. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2005;26(2):105-11.

Rieck EB. Informe técnico nº. 005: MED/NVP/DVS/CEVS/SES/RS: Versão 001. Esclarecimentos sobre a regulamentação de medicamentos fitoterápicos, plantas medicinais, drogas vegetais e derivados vegetais. [Internet]. [Elaborado com base no Informe Técnico nº 45/2010]. Disponível em <[http://www.saude.rs.gov.br/upload/1361994472\\_Informe%20Tecnico%20MED%20N.o%20%20005\\_Drogas%20vegetais%20e%20fitoterapicos%20-%20Versao%20001.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1361994472_Informe%20Tecnico%20MED%20N.o%20%20005_Drogas%20vegetais%20e%20fitoterapicos%20-%20Versao%20001.pdf)> Acesso em 16 de março de 2015.

Sánchez-Tena S, Fernández-Cachón ML, Carreras A, Mateos-Martin ML, Costoya N, Moyer MP, Nuñez MJ, Torres JL, Cascante M. Hamamelitannin from Witch Hazel (*Hamamelis virginiana*) Displays Specific Cytotoxic Activity against Colon Cancer Cells. J Nat Prod. 2012;75:26-33.

Schiavone BIP, Rosato A, Marilena M, Gibbons S, Bombardelli E, Verotta L et al. Biological evaluation of hyperforin and its hydrogenated analogue on bacterial growth and biofilm production. Nat Prod. 2013 Sep;76(9):1819–23.

Silva HA, Abdallah VO, Carneiro CL, Gontijo PPF. Infection and colonization by *Staphylococcus aureus* in a high risk nursery of a Brazilian teaching hospital. Braz J Infect Dis. 2003;7(6):381-6.

Tabarsa M, Park GM, Shin IS, Lee EJ, Kim JK, You SG. Structure activity relationships of sulfated glycoproteins from *Codium fragile* on nitric oxide releasing capacity from RAW264.7 Cells. Mar Biotechnol. 2015 Jun;17:266-76.

Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? Quim Nova. 2005 May-Jun;28(3):519-28.

World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants [Internet]. Geneva: WHO; 2002a [acesso 2015 jun 10]. V-2. Disponível em < <https://books.google.com.br/books?id=qWP4aG-wXAQC&pg=PA135&lpg=PA135&dq=vennat+et+al.,+1992+hamamelis+virginiana&source=bl&ots=RKt1FVTtgi&sig=-duwBEFl9kqMvurFNWLmcRexpHk&hl=pt-BR&sa=X&ved=0CCUQ6AEwAWoVChMI85Plp5qFxlVE-6ACh3zTAB5#v=onepage&q=hamamelis&f=false>>.

World Health Organization. WHO Policy Perspectives on Medicines [Internet]. Genebra: WHO; 2002b [acesso 201 16 mai]. [Tradicional Medicine- growing needs and potencial; nº2]. Disponível em:<[http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO\\_EDM\\_2002.4\\_spa.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_2002.4_spa.pdf?ua=1)>.

Zanin SMW, Miguel MD, Barreira SMW, Nakashima T, Cury CD, Costa CK. Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. *Visão Acadêmica*. 2007 Jan-Jun;8(1):19-24.

**ANEXO A – Certificado de Análise do Extrato Glicólico de *Hamamelis virginiana* L.**



**CERTIFICADO DE ANÁLISE  
EXT. GLIC. HAMAMELIS 50 LT**

OP: 018621  
Fabricação: 03/12/14  
Origem: Brasil  
Nomenclatura INCI: Hamamelis virginiana leaf extract  
Parte utilizada: Folha  
Planta utilizada: Hamamelis virginiana L.

Lote: PROD011621  
Validade: 03/11/17  
Procedência: Extra  
No CAS: 8469-11-3

**Parâmetros**

Densidade (g/cm<sup>3</sup>)  
pH (sol a 10%)  
Aparência  
Bolores e Levaduras  
Cumbos Focais  
Coliformes Totais  
Contagem total  
Cor  
Odor  
Solubilidade

**Especificações**

Entre 1,000 e 1,010  
Entre 2,50 e 4,50  
Líquido  
Ausente  
Ausente  
Max. 100 UFC/g  
Levemente amarelado a âmbar  
Característico  
Solúvel em etanol, propilenoglicol, glicerina, sorbitol e água

**Resultados**

1,010  
3,95  
De acordo  
<10  
De acordo  
De acordo  
<10  
De acordo  
De acordo  
De acordo

Monografia: METODOLOGIA INTERNA

Armazenamento: Acondicionar em recipiente hermetico, ao abrigo de calor e de luz solar direta. Com o tempo pode sofrer turvação e/ou precipitação.

OBS: \*\* Poderá haver alteração de cor por modificação dos componentes coloridos da planta ou de acordo com o lote/safra utilizada.

USO: Externo

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal.

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus  
Farmacológico Bioquímico  
CRF - SP 14.851

Ana Carolina Massarani Ramos  
Farmacêutica  
CRF - SP 35.022

Departamento técnico

17/03/15

Data de emissão

**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**