



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, NATUREZA E
DESENVOLVIMENTO

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DE EXTRATOS
DE PRIPRIOCA (*CYPERUS ARTICULATUS*) VISANDO POTENCIAL
APLICAÇÃO NO COMBATE À DOENÇA CÁRIE**

DANIELA VIEIRA DE CASTRO MACAMBIRA

**Santarém - PA
Abril - 2024**

DANIELA VIEIRA DE CASTRO MACAMBIRA

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DE EXTRATOS
DE PRIPRIOCA (*CYPERUS ARTICULATUS*) VISANDO POTENCIAL
APLICAÇÃO NO COMBATE À DOENÇA CÁRIE**

ORIENTADOR: PROF. DR. LAURO EUCLIDES SOARES BARATA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. WALDINEY PIRES DE MORAES

Tese apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento.

Santarém - PA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, NATUREZA E DESENVOLVIMENTO

ATA DE DEFESA DE TESE

Ao dia dois do mês de abril do ano de 2024, às 9 horas, no auditório Alter do Chão (sala 212 -BMT), na unidade Tapajós da Ufopa, instalou-se a banca examinadora de tese de doutorado da discente **Daniela Vieira de Castro Macambira** do PPGSND/UFOPA. A banca examinadora foi composta pela Dr. Lauro Euclides Soares Barata, PPGSND/UFOPA, orientador e presidente da banca, e pelos professores Dr. Daniel Berretta Moreira Alves, IESPES (examinador externo), Dra. Nicole Patrícia de Lima Vinagre da Ponte, UEPA (examinadora externa), Dr. Bruno Alexandre da Silva, PPGCSA/UFOPA (examinador interno), Antônio Humberto Hamad Minervino, PPGSND/UFOPA (examinador interno). Deu-se início à abertura dos trabalhos, por parte do professor Lauro Euclides Soares Barata, que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou à candidata que iniciasse a apresentação da tese, intitulada **“ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DE PRIPRIOCA (CYPERUS ARTICULATUS) VISANDO SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NO COMBATE À DOENÇA CÁRIE”** informando ao discente que possui de 30 a 60 minutos para a apresentação. Concluída a exposição, o Prof. Lauro Euclides Soares Barata, presidente da banca, passou a palavra a examinadora externa, Nicole Patrícia de Lima Vinagre da Ponte, para arguir a candidata, e, em seguida, aos professores examinadores Daniel Berretta Moreira Alves, Bruno Alexandre da Silva e Antônio Humberto Hamad Minervino para que fizessem o mesmo, nesta ordem. Após o término das arguições o orientador solicitou que o público se retirasse da sala para que ocorra a reunião exclusiva entre os membros da banca para o julgamento do trabalho. Após a deliberações da banca examinadora, o orientador convocou a candidata e o público ouvinte de volta para divulgação do resultado. A banca examinadora decidiu por unanimidade pela **aprovação** da candidata, conforme as normas vigentes na Universidade Federal do Oeste do Pará. A versão final da tese deverá ser entregue ao programa, no prazo de trinta dias após a defesa, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora. Nada mais havendo por constar, lavrou-se e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, Presidente da Banca e Doutoranda. Santarém (PA), segundo dia do mês de abril do ano de dois mil e vinte e quatro, às nove horas.

Documento assinado digitalmente
 LAURO EUCLIDES SOARES BARATA
Data: 12/04/2024 07:58:04 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Lauro Euclides Soares Barata
PPGSND/UFOPA
Presidente da banca

Documento assinado digitalmente
 DANIEL BERRETTA MOREIRA ALVES
Data: 15/04/2024 15:44:15 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Daniel Berretta Moreira Alves
IESPES

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO
Data: 15/04/2024 11:52:39 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Antônio Humberto Hamad Minervino
PPGSND/UFOPA

Documento assinado digitalmente
 BRUNO ALEXANDRE DA SILVA NICARETTA
Data: 15/04/2024 13:25:21 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Bruno Alexandre da Silva
PPGCS/UFOPA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, NATUREZA E DESENVOLVIMENTO



Documento assinado digitalmente
NICOLE PATRÍCIA DE LIMA VINAGRE DA PONTE
Data: 15/04/2024 22:39:19-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Nicole Patrícia de Lima Vinagre da Ponte
UEPA



Documento assinado digitalmente
DANIELA VIEIRA DE CASTRO MACAMBIRA
Data: 11/04/2024 15:20:42-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Daniela Vieira de Castro Macambira
Discente PPGSND/UFOPA

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

M114e Macambira, Daniela Vieira de Castro
Estudos pré-clínicos de eficácia e segurança de extratos de priprioca (*Cyperus articulatus*) visando potencial aplicação no combate a doença cárie./Daniela Vieira de Castro Macambira. - Santarém, 2024.
122 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Lauro Euclides Soares Barata.

Coorientador: Waldiney Pires de Moraes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento.

1. *Cyperus articulatus*. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Fitoterapia. I. Barata, Lauro Euclides Soares, *orient.*. II. Moraes, Waldiney Pires de, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 615.321

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,
À Deus e à Nossa Senhora,
a quem sempre busquei apoio
espiritual,

Aos meus pais Sérgio
Roberto G. de Castro e Maria
Albina Vieira T. de Castro,

Ao meu esposo Jullien B.
Macambira, aos meus filhos
Juliana C. Macambira e Daniel C.
Macambira,

A todos os meus amigos
que se fizeram presentes e me
deram apoio para concluir o
doutorado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus e a Nossa Senhora que me concederam sabedoria, perseverança e saúde. Ao meu esposo Jullien Bezerra Macambira e meus filhos Juliana C. Macambira e Daniel C. Macambira pelo amor, apoio e paciência. Ao meu pai, Sérgio Roberto G. de Castro, que sempre foi o meu maior incentivador e me ensinou desde cedo o privilégio do conhecimento e a minha mãe Maria Albina V. Tavares de Castro.

Ao professor Dr. Lauro Euclides Soares Barata, meu orientador, por ter me acolhido e depositado em mim sua confiança. Ao meu coorientador Waldiney Pires Moraes, por todo o incentivo e auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. Humberto Minervino pelas contribuições ao nosso grupo de pesquisa e apoio ao projeto e publicações.

Ao Prof. Dr. Daniel Berreta, Dra. Tania Moraes, Dr. Adilson Sartoratto, Dra. Sandra Layse Ferreira Sarrazin, Profa Claudia Fernandes de Magalhães Silveira, Dr. José Sousa de Almeida Júnior, Prof. Dr. Bruno Alexandre da Silva, pelo apoio e colaboração no desenvolvimento deste projeto de Tese.

Ao Biotério da Universidade Estadual do Pará, Campi Santarém, em nome do Prof. Dr. Tiago Silveira, Emanuele Ferreira Marinho e Olívia de Jesus Branches pela cessão de espaço para alojamento e experimentos com os animais e contribuição com nosso projeto.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Plantas Medicinais em nome de Taiara Picanço, pela cessão de espaço e materiais para a obtenção dos extratos, contribuindo dessa forma com o nosso projeto.

Ao laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, em nome de Profa Dra. Rosa Helena V. Mourão e Adenilson Sousa Barroso, pela cessão de espaço e materiais para a obtenção do óleo essencial, contribuindo com o nosso projeto.

Aos alunos de mestrado e graduação que me ajudaram no desenvolvimento dos testes laboratoriais deste projeto, Aline Moraes, Brayan Ferreira, Ana Beatriz Belo dos Santos, Jordan Alexandre Macambira, Raquel Coimbra.

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda.”

Joseph Addison

RESUMO

A doença bucal mais prevalente e consequente em todo o mundo é a cárie dentária que apresenta sérios encargos econômicos e de saúde, reduzindo significativamente a qualidade de vida das pessoas afetadas. Estudos etnofarmacológicos mostram que grupos populacionais utilizam há séculos extratos de plantas para o controle da cárie. Pesquisas científicas demonstram a eficácia de extratos de plantas medicinais contra microrganismos orais e, conseqüentemente, seus benefícios na saúde bucal de indivíduos. Dessa forma, o presente trabalho, visa estudos pré-clínicos de eficácia e segurança, preliminares ao desenvolvimento de um enxaguatório bucal fitoterápico, com ação antimicrobiana, a partir do óleo essencial e extratos etanólicos dos rizomas e do resíduo sólido provenientes de uma planta medicinal e aromática da Amazônia, a priprioca (*Cyperus articulatus*). Após a obtenção do óleo essencial, do extrato etanólico dos rizomas íntegros e do extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus* foi realizada a caracterização química por cromatografia gasosa (CG-MS) destes extratos e a atividade antimicrobiana foi definida pelo teste *in vitro* de Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre *Streptococcus mutans*. A toxicidade foi avaliada pelos testes *in vitro* de viabilidade celular sobre fibroblastos Balb/c 3T3 (MTT) e irritação ocular sobre a membrana córneo-alantóide do ovo de galinha (HET-CAM); e pelo teste de toxicidade oral aguda e irritação da mucosa oral em ratos. Os sesquiterpenos foram identificados como os principais constituintes do óleo essencial e dos extratos, mustacona como composto majoritário. O óleo essencial e o extrato dos rizomas íntegros de priprioca demonstraram forte atividade antimicrobiana nas concentrações de 0,46 mg/ml e 0,29 mg/ml, respectivamente, frente ao *S. mutans* e ausência de toxicidade para todas as substâncias testadas. Estes resultados podem validar o uso destes produtos naturais na Odontologia e credenciar os bioativos como potencial droga anticariogênica natural; buscando dessa forma, alternativas de prevenção em saúde bucal e reduzindo o índice de doença cárie na região.

Palavras- chave: *Cyperus articulatus*, *Streptococcus mutans*, fitoterapia.

ABSTRACT

The most prevalent and consequential oral disease worldwide is tooth decay, which presents serious economic and health burdens, significantly reducing the quality of life of those affected. Ethnopharmacological studies show that population groups have used plant extracts for centuries to control cavities. Scientific research demonstrates the effectiveness of extracts from medicinal plants against oral microorganisms and, consequently, their benefits on the oral health of individuals. Thus, the proposed study aims at pre-clinical efficacy and safety studies, preliminary to the development of an herbal mouthwash, with antimicrobial action, based on essential oil and ethanolic extracts from the rhizomes and solid residue originating from a medicinal plant and aromatic plant from the Amazon, pirioca (*Cyperus articulatus*). After obtaining the essential oil, the ethanolic extract from the intact rhizomes and the ethanolic extract from the solid residue of *C. articulatus*, we carried out chemical characterization by gas chromatography (GC-MS) of these extracts and the antimicrobial activity was defined by the in vitro concentration test. Minimum Inhibitory Control (MIC) on *Streptococcus mutans*. Toxicity was assessed by in vitro cell viability tests on Balb/c 3T3 fibroblasts (MTT) and ocular irritation on chicken egg chorio-allantoic membrane (HET-CAM); and by testing acute oral toxicity and irritation of the oral mucosa in rats. Sesquiterpenes were identified as the main constituents of the essential oil and extracts, mustacone as the main compound. The essential oil and extract from intact pirioca rhizomes demonstrated strong antimicrobial activity at concentrations of 0.46 mg/ml and 0.29 mg/ml, respectively, against *S. mutans* and lack of toxicity for all substances tested. These results can validate the use of these natural products in Dentistry and accredit the bioactives as a potential natural anticariogenic drug; In this way, seeking prevention alternatives in oral health and reducing the rate of caries disease in the region.

Keywords: *Cyperus articulatus*, *Streptococcus mutans*, phytotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolução do índice CPO-D para 12 anos por região no Brasil 7
- Figura 2.** Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos de *C. articulatus*. A – Órgãos subterrâneos e aéreos, B – Secção transversal do tubérculo, c = córtex, cat = catafilo, es = escapo, fo = folha, r = rizoma, rv = região vascular, t = tubérculo 26
- Figura 3.** Fluxograma dos estudos experimentais. 40
- Figura 4.** Extração do óleo essencial de *C.articulatus* por hidrodestilação SR - Sistema de Refrigeração; C - Condensador; TS - Tubo Separador; TR - Tubo de Retorno; BV - Balão Volumétrico; MA - Manta Aquecedora 42
- Figura 5.** Equipamento de extração do tipo “Soxhlet. SI – Sifão; MS – Material Sólido; BV – Balão Volumétrico; MA – Manta Aquecedora 43
- Figura 6.** Procedimento experimental em sequência para desenvolvimento do método HET-CAM. 49
- Figura 7.** Fluxograma da Toxicidade Aguda 51
- Figura 8.** Principais compostos voláteis presentes no óleo essencial de *C. articulatus*.56
- Figura 9.** Principais compostos voláteis presentes nos extratos etanólico dos rizomas íntegros e resíduo sólido de *C. articulatus* 58
- Figura 10.** Distribuição gráfica e comparação dos grupos para os percentuais de viabilidade celular, nas diferentes diluições do estudo, no tempo de 1 dia. 61

| | |
|---|----|
| Figura 11. Distribuição gráfica e comparação dos grupos para os percentuais de viabilidade celular, nas diferentes diluições do estudo, no tempo de 3 dias. | 61 |
| Figura 12. Distribuição gráfica e comparação dos grupos para os percentuais de viabilidade celular, nas diferentes diluições do estudo, no tempo de 7 dias. | 61 |
| Figura 13. Corte histológico da mucosa oral do rato 3 evidenciando infiltrado leucocitário grau 1 após aplicação de propilenoglicol 1% (aumento 40X)..... | 66 |
| Figura 14. Corte histológico da mucosa oral do rato 3 evidenciando congestão vascular grau 2 após aplicação de propilenoglicol 1% (aumento 10X)..... | 66 |
| Figura 15. Corte histológico da mucosa oral do rato 4 evidenciando congestão vascular grau 2 após aplicação de propilenoglicol 1% (aumento 10X)..... | 67 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Compostos ativos mais utilizados como antissépticos bucais.. | 12 |
| Tabela 1: Esquema de pontuação para teste de irritação com o teste HET-CAM..... | 50 |
| Tabela 2: Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM..... | 50 |
| Tabela 3: Sistema de classificação para reações orais..... | 53 |
| Tabela 4: Sistema de classificação para exame microscópico para reação tecidual oral..... | 53 |
| Tabela 5: Índice de irritação..... | 54 |
| Tabela 6: Composição química do óleo essencial de <i>Cyperus articulatus</i> de Santarém (Estado do Pará, Brasil) por CG-MS..... | 55 |
| Tabela 7: Composição química do extrato etanólico dos rizomas íntegros de <i>Cyperus articulatus</i> de Santarém (Estado do Pará, Brasil) por CG-MS..... | 56 |
| Tabela 8: Composição química do extrato etanólico do resíduo sólido de <i>Cyperus articulatus</i> de Santarém (Estado do Pará, Brasil) por CG-MS..... | 57 |
| Tabela 9: Concentração Inibitória Mínima em mg/ml do óleo essencial de <i>C. articulatus</i> , do extrato etanólico do resíduo sólido de <i>C. articulatus</i> e do extrato etanólico dos rizomas íntegros de <i>C. articulatus</i> e gluconato de clorexidina frente a bactéria <i>Streptococcus mutans</i> | 59 |

Tabela 10: Valores de média (desvio-padrão) e comparação entre os grupos experimentais para a viabilidade celular nos diferentes tempos de avaliação do estudo60

Tabela 11: Índice e classificação de irritação no teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET – CAM).62

Tabela 12: Teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas \pm Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (salina 0,9% e propilenoglicol) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg 63

Tabela 13: Repetição do teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas \pm Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e propilenoglicol) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg 64

Tabela 14: Escores das reações teciduais orais ocorridos após aplicação das substâncias testes na mucosa oral de ratos e classificação destas quanto ao grau de irritação após avaliação histológica64

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 6 |
| 2.1. A saúde bucal no Brasil | 6 |
| 2.2. Etiologia da cárie dentária | 7 |
| 2.3. Métodos de prevenção da doença | 10 |
| 2.3.1. Controle mecânico..... | 10 |
| 2.3.2. Enxaguatórios bucais..... | 11 |
| 2.3.3. Plantas medicinais..... | 14 |
| 2.4. Fitoterápicos Amazônicos de uso Odontológico | 17 |
| 2.4.1. Copaíba | 18 |
| 2.4.2. Unha de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>)..... | 20 |
| 2.4.3. Sacaca (<i>Croton cajucara</i>) | 22 |
| 2.4.4. Jucá (<i>Libidibia ferrea</i>)..... | 23 |
| 2.4.5. Própolis..... | 24 |
| 2.4.6. Priprioca (<i>Cyperus articulatus</i>)..... | 25 |
| 2.4.6.1. Estudos químicos e propriedades biológicas de <i>C. articulatus</i> | 26 |
| 2.5. Desenvolvimento de fitoterápicos..... | 31 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 37 |
| 4. OBJETIVO | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 5. MATERIAL E MÉTODOS..... | 40 |
| 5.1. Desenho experimental..... | 40 |
| 5.2. Aprovação do comitê de ética | 40 |
| 5.3. Coleta de material vegetal | 41 |
| 5.4. Extração do óleo essencial | 41 |
| 5.4.1. Descrição do processo de extração em aparelho Clevenger para obtenção do óleo essencial | 41 |
| 5.5. Descrição do processo de extração para obtenção dos extratos | 42 |
| 5.5.1. Extrato etanólico dos rizomas íntegros da priprioca | 42 |
| 5.5.2. Extrato etanólico do resíduo sólido de priprioca..... | 43 |
| 5.5.2.1. Descrição do funcionamento do aparelho do tipo Soxhlet para obtenção dos extratos etanólicos. | 43 |
| 5.6. Análise cromatográfica do óleo essencial..... | 44 |
| 5.7. Análise cromatográfica dos extratos | 44 |
| 5.8. Teste antimicrobiano <i>in vitro</i> | 45 |
| 5.8.1. Microrganismo e condições de cultivo..... | 45 |
| 5.8.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).45 | |
| 5.9. Ensaio de Toxicidade..... | 46 |
| 5.9.1. Citotoxicidade <i>in vitro</i> | 46 |
| 5.9.1.1. Cultura de fibroblastos. | 46 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.9.1.2. | Avaliação da viabilidade celular/metabolismo pelo ensaio MT | 47 |
| 5.9.1.3. | Análise de dados. | 47 |
| 5.9.2. | Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda <i>in vitro</i> | 48 |
| 5.9.2.1. | Ovos embrionados | 48 |
| 5.9.2.2. | Delineamento experimental | 48 |
| 5.9.3. | Toxicidade oral aguda <i>in vivo</i> | 50 |
| 5.9.4. | Teste de irritação da mucosa oral <i>in vivo</i> | 51 |
| 5.9.4.1. | Avaliação macroscópica | 53 |
| 5.9.4.2. | Avaliação histológica | 53 |
| 6. | RESULTADOS | 55 |
| 6.1. | Análise da composição química do óleo essencial de pirioca | 56 |
| 6.2. | Análise da composição química do extrato etanólico dos rizomas íntegros. | 57 |
| 6.3. | Análise da composição química do extrato etanólico do resíduo sólido | 58 |
| 6.4 | Avaliação antimicrobiana - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) | 59 |
| 6.5 | Avaliação da Citotoxicidade – MTT | 60 |
| 6.6 | Avaliação irritação/corrosão ocular aguda – HET-CAM | 63 |
| 6.7 | Avaliação da toxicidade oral aguda | 64 |
| 6.8 | Avaliação da irritação da mucosa oral | 66 |

| | |
|--|-----------|
| 7. DISCUSSÃO..... | 68 |
| 8. CONCLUSÃO | 76 |
| 9. REFERÊNCIAS. | 77 |
| 10. Anexo 1- Certificado da Comissão de ética no uso de animais | 93 |
| 11. Apêndice 1- Artigo publicado..... | 94 |

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 2,4 bilhões de pessoas são acometidas por cárie dentária, o que representa 1/3 da população mundial. Nas últimas décadas, a cárie se tornou a doença bucal mais comum entre crianças de todo o mundo, onde a cárie não tratada foi a décima condição mais prevalente afetando mais de 621 milhões de crianças. No Brasil, 43,5% das crianças até aos 12 anos de idade apresentam a doença cárie na dentição permanente, da mesma forma que crianças brasileiras de até 5 anos de idade manifestam aproximadamente 2,43 dentes com experiência de cárie (CHEN et al., 2019; PITTS et al, 2017; BRASIL, 2012).

As disparidades regionais em saúde bucal observadas desde o inquérito de 1986 perpetuam as marcantes desigualdades, especialmente entre crianças e adolescentes, onde as regiões Norte e Nordeste apresentam recorrentemente os piores indicadores de saúde bucal. Além dos maiores valores de prevalência de cárie, a região Norte, apresentou também as maiores proporções de dentes cariados, ou seja, ainda não tratados, em relação aos dentes obturados e perdidos (BRASIL, 2012). A redução das desigualdades socioeconômicas e o incremento das medidas de saúde pública direcionadas a comunidades mais carentes, constituem ainda um desafio para os dirigentes e profissionais de saúde no país (LIMA et al., 2020).

A cárie dentária é, portanto, uma doença bucal de alta prevalência e a sua etiologia está relacionada a presença de um hospedeiro suscetível, um biofilme microbiano e dieta cariogênica (INNES et al., 2016), e dentre os principais microorganismos responsáveis pela formação do biofilme oral, podemos destacar o *Streptococcus mutans*, considerado o agente etiológico da cárie em humanos e responsável pelo início da doença (MILHO et al., 2021).

As doenças bucais, quando não tratadas, levam na maioria das vezes, a dor incessante, sepse, qualidade de vida reduzida, dias de escola perdidos, interrupção da vida familiar e diminuição da produtividade do trabalho. Deste modo, torna-se pertinente e importante a implementação de métodos de prevenção, haja vista que, os custos do tratamento de doenças bucais impõem grandes encargos econômicos às famílias e aos

sistemas de saúde (PERES et al., 2019)

Dentre os métodos de prevenção da cárie, o método mecânico que consiste na correta higienização através de escovação e uso do fio dental, é o método mais eficaz na remoção do biofilme dental, capaz de desagregar e remover depósitos microbianos aderidos nos dentes (SILVA et al., 2011; WORTHINGTON et al., 2019). Porém, esse método sozinho pode não ser totalmente eficaz, pois depende da habilidade e destreza manual dos indivíduos para realização da escovação dentária e limpeza interdental de qualidade, sendo assim, é importante associar procedimentos químicos para controlar a formação do biofilme (CHAN et al., 2022).

Como o biofilme é uma associação organizada, composto por saliva, bactérias e seus produtos, fluido gengival, sangue e restos alimentares capaz de aderir aos dentes e causar alterações patológicas na cavidade oral, sua desagregação é indicada o quanto antes (LOBO et al., 2019). Por isso, é importante associar procedimentos químicos e mecânicos para controlar sua formação (MOTALLAEI, 2021).

Existem evidências científicas de que os enxaguatórios bucais, que são considerados métodos químicos, desempenham papel chave e de valor significativo como coadjuvantes dos métodos mecânicos para prevenção e tratamento das doenças bucais. Entretanto, em nenhum caso devem substituir os métodos mecânicos de remoção da placa, e sim atuar como auxiliares do mesmo, atuando como auxiliar na complementação da higiene bucal por agirem sobre os microrganismos patogênicos, dificultando a adesão e proliferação desses microrganismos nas superfícies orais e a ação de suas enzimas (OLIVEIRA et al., 2018).

Entre os compostos ativos mais utilizados em antissépticos bucais temos a clorexidina. Inúmeros estudos demonstraram a eficácia do digluconato de clorexidina 0,12% na redução e formação do biofilme oral. Entretanto o uso diário desta solução apresenta efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa oral; além disso, o uso prolongado pode desenvolver cepas microbianas resistentes (MARINHO; ARAÚJO, 2007; KULIK et al., 2015).

A necessidade de medicar e a disponibilidade de plantas mescladas no processo civilizatório constituíram os primórdios do ato de curar, remontando à antiguidade o uso de vegetais como medicamentos (MARINHO; ARAÚJO, 2007). Estudos tem comprovado que plantas medicinais são uma rica fonte de compostos bioativos, ou bionutrientes, que estão presentes em sementes, raízes, folhas, flores ou mesmo em toda a planta, assumindo-se assim como importantes fontes de compostos com características de aditivos alimentares, aromatizantes e no tratamento de diversas doenças, a nível industrial. A utilização destas e/ou fitoterápicos traz grandes vantagens no processo de promoção da saúde, pois seus compostos biologicamente ativos podem suprimir patógenos e prevenir a progressão de doenças, destacando-se dessa forma, como alternativa promissora e interessante aos compostos sintéticos (MILHO et al., 2021; REN et al., 2016; MARINHO; ARAÚJO, 2007; ROCHA et al., 2020).

O uso de antimicrobianos fitoterápicos podem se tornar alternativas viáveis para o controle da placa bacteriana, contribuindo no controle do crescimento desordenado da microbiota oral, contornando transtornos proporcionados por cepas resistentes devido ao uso indiscriminado dos antimicrobianos sintéticos, facilitando o acesso das populações mais carentes aos enxaguatórios bucais, podendo ser utilizado como estratégia na redução do índice de cárie na população (MARINHO; ARAÚJO, 2007).

Na região Amazônica, existe uma grande biodiversidade de plantas medicinais utilizadas de maneira empírica, contudo, algumas com potencial antiinflamatório e antimicrobiano já comprovados cientificamente (CONDE et al., 2015; FERREIRA, 2018a; KASPER et al., 2020). Dentre estas espécies utilizadas para fins terapêuticos podemos citar *Cyperus articulatus*, planta aromática conhecida popularmente como pirioca. Esta espécie nativa ocorre naturalmente no Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil.

A espécie produz um óleo volátil amarelo intenso, com valor econômico para a produção de perfumes e fragrâncias na indústria cosmética (FLORA DO BRASIL, 2019);

Dentre as finalidades terapêuticas desta espécie vegetal, várias já foram comprovadas por diversos autores, como a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e leveduras (FREIRES et al. 2015;

GALVÃO et al, 2012; OLADOSU et al., 2011; KASPER et al., 2018), propriedade anticonvulsivante (NGO BUM et al., 2003), atividade antiparasitária (METUGE et al., 2014; SILVA et al., 2019), atividade antioxidante (DESMACHELIER et al., 1997) e anti-inflamatória (FERREIRA, 2018). Em pesquisa feita por Bersan et al. (2014) os resultados confirmam ação efetiva do óleo essencial de *C. articulatus* sobre microrganismos orais estudados (*Candida albicans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*), com capacidade de controlar a formação de biofilme. Entretanto, estudos que comprovem a aplicabilidade dessa planta na Odontologia são escassos, justificando a importância deste estudo.

Do mesmo modo, não são encontradas pesquisas relacionadas aos resíduos oriundos do processo de extração de óleo essencial e assim como a maioria das plantas, a priprioca apresenta baixo rendimento de óleo essencial, o que exige grande quantidade de material vegetal, ocasionando a produção de grande volume de resíduo vegetal. Durante o processo de obtenção do óleo essencial dos rizomas de *C. articulatus* L., um resíduo sólido é gerado e descartado, embora comprovada a presença de substâncias bioativas nesse subproduto, tornando-o candidato a matéria-prima de produtos sustentáveis (SILVA et al., 2021; KASPER et al., 2020; ASSIS et al., 2020).

Pesquisas mostraram que muitas plantas medicinais possuem substâncias agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas respeitando os riscos toxicológicos (PINHEIRO et al., 2020). Assim, os medicamentos fitoterápicos devem ser considerados com o mesmo rigor que os medicamentos sintéticos conforme resolução da ANVISA (2014b). A fiscalização e a obediência às instruções normativas devem ocorrer nas etapas de extração, no processamento, na conservação e no armazenamento, de modo, a evitar contaminação microbiana com consequente perda das suas propriedades, diminuindo com isso os riscos a pacientes ou consumidores desses produtos. O controle de qualidade engloba uma série de ensaios e testes que vão desde a identificação botânica da planta até o doseamento dos princípios ativos, passando por análises microbiológicas, onde se analisa a contaminação por micro-

organismos (sobretudo bactérias e fungos) que podem provocar diversos prejuízos à saúde do consumidor (ANVISA, 2014b).

No tocante à saúde bucal a fitoterapia ainda é negligenciada. Entretanto, os produtos de higiene oral com ativos de origem vegetal tem sido sendo cada vez mais estudados com protocolos mais modernos para comprovar a eficácia da utilização de determinadas plantas no tratamento das doenças bucais com benefícios à população (BERSAN et al., 2014; SEVERO et al., 2023).

Dessa forma este estudo teve por objetivo realizar estudos pré-clínicos de eficácia e segurança, preliminares ao desenvolvimento de um enxaguatório bucal fitoterápico, com ação antimicrobiana, a partir do óleo e extratos de priprioca (*Cyperus articulatus*). Realizar a obtenção, caracterização química e ensaios pré-clínicos de eficácia da atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Streptococcus mutans*; ensaios pré-clínicos de segurança: atividade citotóxica e irritação ocular *in vitro*; toxicidade oral aguda e irritação da mucosa oral *in vivo* (ratos) de óleo essencial, extratos etanólicos de rizomas íntegros e do resíduo sólido de *C. articulatus*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Saúde Bucal no Brasil

A implantação do Sistema Único de Saúde (SUS) em 1990, e da Política Nacional de Saúde Bucal - Brasil Sorridente em 2004, ampliou o acesso aos cuidados em saúde bucal na atenção primária e especializada incluindo aí a água tratada e fluoretada, contribuindo para o fortalecimento das ações de promoção e prevenção em saúde bucal no Brasil. Essas iniciativas, por sua vez, resultaram na melhoria das condições de saúde bucal da população brasileira, ilustrada pela condição de prevalência de cárie, que mudou de moderada, em 2003, para baixa em 2010, segundo critério adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Porém, a carga de doenças e os impactos que comprometem a qualidade de vida dos indivíduos ainda permanecem elevados, sobretudo nos grupos sociais menos favorecidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O índice CPOD (índice de dentes cariados, perdidos e obturados), formulado por Klein e Palmer (1937) é usado pela Organização Mundial de Saúde, para avaliar a prevalência da cárie dentária em diversos países. No Brasil, o Ministério da Saúde, realiza o levantamento epidemiológico de saúde bucal em nível nacional desde 1986, onde o CPOD encontrado foi 6,7 o que é considerado muito alto pela OMS (Organização Mundial da Saúde). Em 2010 no último levantamento epidemiológico realizado, o valor correspondente a 2,1 colocou o Brasil no grupo de países com baixa prevalência de cárie. Esta expressiva diminuição na prevalência geral da doença foi alcançada através de políticas públicas voltadas a prevenção e promoção de saúde bucal, inclusão de ações odontológicas no PSF (Programa de Saúde da Família), aumento do acesso à água fluoretada e ao dentifrício fluoretado (BRASIL, 2012; AGNELLI, 2015).

Entretanto, considerando as cinco regiões brasileiras, em quatro houve redução do índice no período que vai de 2003 a 2010, de acordo com a pesquisa, porém, na região Norte, não se verificou redução e sim um aumento neste índice (Figura 1). Além dos maiores valores de prevalência de cárie, a região Norte, apresentou também as maiores proporções de dentes cariados, ou seja, ainda não tratados, em relação aos dentes

obturados e os perdidos. Esse fato é um indicativo de que ocorre no Brasil, a polarização da cárie dentária, pois nas regiões brasileiras mais pobres este problema é consideravelmente maior. A redução das desigualdades socioeconômicas e o incremento das medidas de saúde pública direcionadas a comunidades mais carentes, constituem ainda um desafio para os dirigentes e profissionais de saúde no país (BRASIL, 2012; AGNELLI, 2015; VERAS et al., 2022).

Figura 1. Evolução do índice CPO-D para 12 anos por região no Brasil.



Fonte: BRASIL 2012.

2.2 Etiologia da cárie dentária

Descrito pela primeira vez na literatura em 1634, o vocábulo Cárie Dentária é derivado do latim e foi inicialmente utilizado para descrever “buracos” nos dentes, sem conhecimento aprofundado tanto da etiologia como da patogênese da doença. Atualmente, é definida como uma patologia de alta prevalência e multifatorial que envolve um hospedeiro suscetível, um biofilme microbiano e dieta cariogênica. Assim, ocorre uma alteração dos microrganismos da doença cárie, que antes eram equilibrados e de baixa cariogenicidade, para uma população de microrganismos desequilibrada de alta cariogenicidade (INNES et al., 2016; YANG et al., 2018; KARCHED et al., 2019).

As superfícies dos dentes são cobertas por um filme condicionador de proteínas e glicoproteínas (a película adquirida) que são derivadas principalmente da saliva, mas também contém componentes de bactérias e seus produtos, fluido gengival, sangue e restos alimentares; dessa forma, a película adquirida, fornece locais de ligação para adesão dos primeiros colonizadores bacterianos da superfície do dente, levando à formação do biofilme dental (LOBO et al., 2019).

Os principais colonizadores bacterianos que aderem à superfície do dente pertencem aos gêneros *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Veillonella* e *Neisseria*. No entanto, a presença dessas colônias microbianas recobrimo as superfícies dentárias, por si só não são suficientes para causar a doença, as interrelações existentes entre microrganismos, substrato, hospedeiro e tempo são os principais fatores que levam ao desgaste contínuo de minerais promovendo o aparecimento de lesões cariosas (BALHADDAD et al., 2019). Estas lesões, podem comprometer o esmalte, a dentina e/ou o cimento, progredindo lentamente até a total destruição do dente conforme a atividade de cárie e o tempo deste processo, podendo alterar de semanas, meses e até anos. A doença torna-se autolimitante à medida que o biofilme - que recobre a superfície dentária - é desorganizado de forma mecânica e regular (FEJERSKOV et al., 2017).

Dentre os *Streptococcus* que iniciam a construção do biofilme dental, o principal é o *Streptococcus mutans* - cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos, acidogênicos e acidúricos capazes de formar polissacarídeos extracelulares - altamente cariogênicos devido à sua capacidade de colonizar superfícies duras - essa característica deve-se à presença de adesinas, as quais permitem a adesão à superfície dos dentes e a outros microrganismos encontrados no biofilme. Por esse motivo, são considerados os principais agentes etiológicos da cárie em humanos e responsáveis pelo início da doença (JAKUBOVICS et al., 2005; MILHO et al., 2021).

Quando expostos a uma dieta rica em açúcar, estes microrganismos metabolizam carboidratos e produzem ácidos que desmineralizam a estrutura dentária. Os carboidratos são fermentados de modo direto, mas,

na presença de grandes quantidades, são armazenados na forma de polissacarídeos intra (PIC) e extracelulares (PEC), estes auxiliam na sua aderência ao biofilme dental e aqueles agem como reservas energéticas (MILHO et al., 2021).

As enzimas glicosiltransferases produzidas por *Streptococcus mutans* foram reconhecidas como fatores de virulência na patogênese da cárie dentária. Estas convertem sacarose em polímeros insolúveis, os glucanos, que promovem a adesão e o acúmulo de outras bactérias na superfície do dente e desempenham um papel essencial no desenvolvimento da placa dentária patogênica relacionada à atividade de formação de cárie. Em conjunto, as bactérias ligadas localmente produzem ácidos orgânicos persistentes através da glicólise, que alteram o ambiente ácido ao redor da superfície do dente, levando assim à desmineralização (NAM e HWANG, 2021). Por esse motivo, o mecanismo de virulência do *S. mutans* tem sido o mais estudado e conhecido quando comparado às outras espécies (LOBO et al., 2019).

A presença do ácido láctico oriundo do metabolismo dos microrganismos, promovem o decréscimo do pH, o que aumenta a solubilidade dos minerais dos dentes, iniciando o processo de desmineralização. Dessa maneira, as lesões cariosas são advindas do desequilíbrio fisiológico entre o conteúdo mineral do substrato e os fluidos do biofilme e da cavidade oral (BALHADDAD et al., 2019).

Por isso, enquanto o pH for maior que 5,5 a tendência é que – por difusão – o dente receba os íons cálcio e fosfato, uma vez que a saliva está saturada desses íons, evitando que as estruturas dentárias se dissolvam. Em contrapartida, quando existe a presença do ácido láctico oriundo do metabolismo dos microrganismos, ocorre a diminuição do pH para níveis considerados críticos, sendo menor do que 5,5, ocasionando, assim, a dissolução dos cristais de hidroxiapatita. Assim, no processo desmineralização-rem mineralização (DES-RE) ocorre uma maior perda de mineral do que uma reposição de íons, o que acarreta na progressão das lesões cariosas (BALHADDAD et al., 2019).

Além dos fatores determinantes para a doença já citados anteriormente, como: interação entre hospedeiro, dieta, biofilme e tempo,

evidências atuais sugerem que a estrutura social, determinantes culturais, econômicos, ambientais e relacionados ao sistema de saúde, são fatores intrínsecos envolvidos na etiologia da cárie dentária (FRAZÃO et al., 2012).

2.3 Métodos de prevenção da doença

As doenças bucais quando não tratadas, levam na maioria das vezes, a dor incessante, sepse, qualidade de vida reduzida, dias de escola perdidos, interrupção da vida familiar e diminuição da produtividade do trabalho. Pensando nisso, torna-se pertinente e importante a implementação de métodos de prevenção, haja vista que os custos do tratamento de doenças bucais impõem grandes encargos econômicos às famílias e aos sistemas de saúde (PERES et al., 2019).

2.3.1 Controle mecânico

O controle mais eficaz do biofilme dental é a correta higienização através de escovação e uso do fio dental. A escovação é o recurso mais utilizado, com a função de desagregar e remover os depósitos microbianos aderidos, através da ação mecânica das cerdas da escova. O fio dental por sua vez, tem como função remover o biofilme dental dos espaços interproximais dos dentes, contribuindo para a prevenção de cáries, gengivite e halitose. Este pode ser utilizado com auxílio de passa ou porta fio dental, por pacientes portadores de aparelhos ortodônticos ou de próteses fixas. Outro recurso a ser utilizado são os limpadores de língua, que são específicos para a higienização desta área da boca, removendo a saburra lingual que é comparável ao biofilme dental, promovendo uma higienização adequada e removendo a camada branca amarelada, deixando a língua com aspecto saudável e apresentando uma coloração avermelhada (SILVA et al., 2011).

A instrução de higiene oral deve ser adequada individualmente para cada paciente com base nas suas necessidades pessoais e em outros fatores. O paciente deve estar envolvido no processo de educação/motivação, visando à mudança de comportamento necessária à manutenção e recuperação de sua saúde bucal (SILVA et al., 2011). Substâncias evidenciadoras de placa, são imprescindíveis na orientação da escovação ou uso do fio dental, pois revelam as áreas envolvidas pelos

depósitos microbianos, constituindo um complemento ideal para higiene bucal eficaz (EMMI, 2006).

2.3.2 Enxaguatórios bucais

Vimos que, suprimir e evitar o acúmulo de biofilme é essencial para a prevenção da doença cárie, e a maneira mais eficiente é por meio do controle mecânico. Porém, esse método sozinho pode não ser totalmente eficaz, pois depende da habilidade e destreza manual dos indivíduos para realização da escovação dentária e limpeza interdental de qualidade. Como o biofilme é uma associação organizada, capaz de aderir aos dentes e causar alterações patológicas na cavidade oral, sua desagregação é indicada o quanto antes (WORTHINGTON et al., 2019). Considerando a importância dessa dissociação, é importante associar procedimentos químicos e mecânicos para controlar sua formação (CHAN et al., 2022).

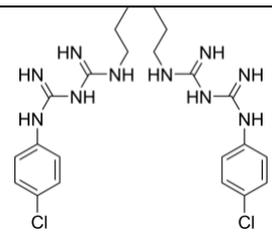
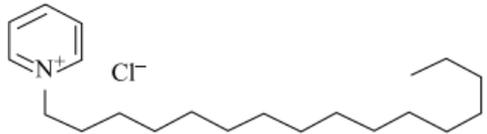
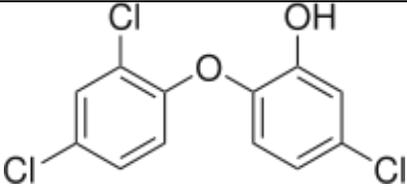
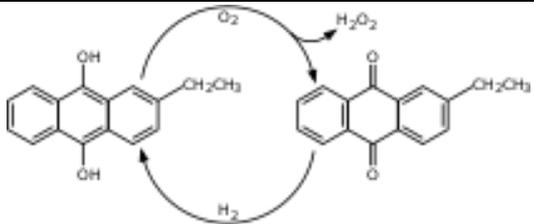
Existem evidências científicas de que os enxaguatórios bucais, que são considerados métodos químicos, desempenham papel chave e de valor significativo como coadjuvantes dos métodos mecânicos para prevenção e tratamento das doenças bucais. Entretanto, em nenhum caso devem substituir os métodos mecânicos de remoção da placa, e sim atuar como auxiliares do mesmo, eles atuam como auxiliar na complementação da higiene bucal por agirem sobre os microrganismos patogênicos, dificultando a adesão e proliferação desses microrganismos nas superfícies orais e a ação de suas enzimas (OLIVEIRA et al., 2018).

Atualmente, o mercado odontológico apresenta ampla variedade de enxaguantes bucais, com diferentes ingredientes e princípios ativos em sua composição (Quadro 1). Entre os compostos ativos mais utilizados em antisépticos bucais temos a clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, triclosan, além de produtos naturais como os óleos essenciais, que são substâncias voláteis extraídas de plantas pela técnica de arraste a vapor com grande aplicação como coadjuvantes terapêuticos (ARAÚJO, 2012).

Além destes, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) tem sido utilizado como enxaguatório bucal de primeira geração para diminuir a formação de placa bacteriana e controlar doença periodontal, exercendo efeitos antimicrobianos através da liberação de oxigênio contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Estudos anteriores apontam que

enxaguatórios bucais com H₂O₂ de baixa concentração ($\leq 1,5\%$) são seguros, inclusive quando usados por longo prazo, em contrapartida, quando utilizados em concentração de 3% foram encontrados efeitos colaterais, como ulcerações orais (KAMOLNARUMETH et al., 2021).

Quadro 1: Compostos ativos mais utilizados como antissépticos bucais

| Composto | Fórmula | Estrutura química |
|---------------------------|---|--|
| clorexidina | C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ |  |
| cloreto de cetilpiridínio | C ₂₁ H ₃₈ ClN |  |
| triclosan | C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂ |  |
| peróxido de hidrogênio | H ₂ O ₂ |  |

A clorexidina é utilizada em diferentes fórmulas para o controle da placa dental. No Brasil, é mais frequentemente encontrada em enxaguatórios na concentração de 0,12%, mas também pode ser usada na concentração de 0,20%. Considerada um dos biocidas mais utilizados em formulações antissépticas age principalmente sobre bactérias gram-positivas, além de leveduras e dermatófitos (MARINHO; ARAÚJO, 2007). A clorexidina (C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀) é um antibacteriano de largo espectro, do grupo químico das biguanidas, com propriedade catiônica, alto poder desinfetante, que controla a placa bacteriana em humanos. É uma molécula simétrica e estável, tendo afinidade com as bactérias, agindo

através da interação eletrostática de sua carga positiva com a negativa da parede celular bacteriana, o que aumenta a permeabilidade desta parede, ocorrendo a ruptura e precipitação do citoplasma, causando a morte do microorganismo (RECHE, 2005).

Inúmeros estudos demonstraram a eficácia do digluconato de clorexidina 0,12% na redução e formação do biofilme oral. Entretanto o uso diário desta solução apresenta efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa oral; além disso, o uso prolongado que pode desenvolver cepas microbianas resistentes (MARINHO; ARAÚJO, 2007; KULIK et al., 2015).

O cloreto de cetilpiridínio ($C_{21}H_{38}ClN$), é um composto de amônio quaternário, apresenta atividade antimicrobiana relacionada a parte catiônica da molécula, e de modo semelhante ao mecanismo de ação da clorexidina, age sobre bactérias Gram-positivas e leveduras (MARINHO; ARAÚJO, 2007). Entretanto apresenta algumas desvantagens, tais como a liberação rápida e a possibilidade de ser neutralizado. Seu uso prolongado, da mesma forma que ocorre com a clorexidina, pode promover a sensação de queimação, descoloração dentária e da língua, ulceração da mucosa e aumento na formação de tártaro em função de este composto promover o aumento dos níveis de cálcio e fósforo (SIMÕES et al., 2011)

Já o triclosan ($C_{12}H_7Cl_3O_2$) tem sua ação baseada na desorganização da membrana celular e inibição inespecífica de enzimas da membrana. Esta molécula possui amplo espectro antimicrobiano, com atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Porém estudos *in vivo* têm demonstrado que a eficácia antiplaca e substantividade do triclosan sozinho são limitadas, técnicas diferentes são então adotadas para aumentar a sua ação. A primeira consiste em aumentar a retenção oral e diminuir o índice de liberação através da adição de um copolímero comercialmente conhecido como Gantrez e a segunda consiste em potencializar o seu efeito adicionando citrato de zinco (MARINHO; ARAÚJO, 2007).

Enxaguatórios naturais apresentam em sua composição óleos essenciais. Embora sejam normalmente utilizados como flavorizantes, os

óleos essenciais podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do produto devido à presença de compostos fenólicos como seus principais constituintes, os quais agem principalmente sobre bactérias gram-positivas e leveduras (NIKSERESHT et al., 2019; ALVIANO et al., 2005). Além do óleo, extratos de folha e/ou casca de algumas plantas, confirmaram atividades antimicrobianas frente a microorganismos cariogênicos da cavidade bucal, evidências que podem ser fundamentadas pela presença de metabólitos secundários, como os flavonoides e saponinas, que conferem essa atividade antimicrobiana (ROCHA et al, 2020).

O uso de antimicrobianos fitoterápicos naturais pode contribuir no controle do crescimento desordenado da microbiota oral contornando transtornos proporcionados por cepas resistentes devido ao uso indiscriminado dos antimicrobianos convencionais. Os resultados dos estudos com enxaguatórios bucais fitoterápicos mostram a importância e a necessidade de se avaliar meios alternativos e economicamente viáveis para o controle da placa bacteriana, facilitando o acesso das populações mais carentes aos enxaguatórios bucais, podendo ser utilizado como estratégia na redução do índice de cárie na população (MARINHO; ARAÚJO, 2007).

2.3.3 Plantas medicinais

Plantas medicinais são utilizadas pela sociedade desde os tempos remotos, o que ainda acontece atualmente, por ser uma atividade cultural ou por estar relacionado a dificuldade de acesso aos sistemas convencionais de saúde (ILDEFONSO JÚNIOR; MONTEIRO, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, planta medicinal é qualquer vegetal que possui compostos que possam ser empregados para fins terapêuticos seja *in natura* ou formulados como fitoterápicos. Os fitoterápicos, por outro lado, são medicamentos tecnicamente formulados e obtidos unicamente a partir de produtos de origem natural, utilizados como terapias artesanais, na forma de chás, soluções e/ou comprimidos (BRASIL, 2014).

Plantas medicinais são uma rica fonte de compostos bioativos, ou bionutrientes, que estão presentes em sementes, raízes, folhas, flores ou mesmo em toda a planta, assumindo-se assim como importantes fontes de

compostos com características de aditivos alimentares, aromatizantes e no tratamento de diversas doenças, a nível industrial. A utilização destas e/ou fitoterápicos traz grandes vantagens no processo de promoção da saúde, pois seus compostos biologicamente ativos podem suprimir patógenos e prevenir a progressão de doenças, destacando-se dessa forma, como alternativa promissora e interessante aos compostos sintéticos (MILHO et al., 2021).

Em 2006, por meio da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, o uso de plantas medicinais e a fitoterapia foram introduzidos no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006). No entanto, na odontologia brasileira, apenas em 2008 a fitoterapia foi reconhecida e regulamentada como prática integrativa e complementar à saúde bucal pelo Conselho Federal de Odontologia, no dia 19 de novembro de 2008, pela Resolução nº 082/2008-CFO.

Apesar da regulamentação do exercício da fitoterapia, o desconhecimento sobre indicações e cuidados no uso de plantas medicinais ainda é grandemente desconhecida e não acreditada entre os profissionais de saúde. De acordo com d'Ávila et al. (2021), na odontologia a utilização de plantas medicinais para tratar patologias bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais ainda é pouco explorada. No entanto, seu uso nessa área vem sendo cada vez mais frequente devido a várias propriedades nelas presentes, destacando-se a elevada atividade terapêutica e melhor biocompatibilidade cientificamente comprovadas, quando comparados aos medicamentos convencionais. Dentre os fitoterápicos mais utilizados na Odontologia, que apresentam ação consubstanciada por testes clínicos e laboratoriais são: o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), a camomila (*Matricaria recutita* L.), a malva (*Malva sylvestris*), a romã (*Punica granatum*), a unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) e o própolis (*Apis mellífera*) (GOMES et al., 2020).

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) é cultivado em várias partes do mundo, incluindo o Brasil, a partir dele se extrai o eugenol, um óleo essencial com ação antimicrobiana, utilizado em consultórios na preparação de cimentos e pasta, é utilizado também no tratamento de odontalgias, aftas, mau hálito, estomatites e no tratamento de canal, dado

o seu potencial anti-inflamatório, analgésico e antisséptico. A Camomila (*Matricaria recutita* L.) é utilizada na formulação de dentifrícios com o objetivo de combater a halitose e a gengivite (GOMES et al., 2020).

A romã (*Punica granatum*), que tem o tanino como seu principal constituinte, já teve ação comprovada sobre bactérias do biofilme oral. Assim como, a unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) que apresenta componentes como: alcaloides oxíndoles, triterpenos, esteroides vegetais, compostos fenólicos, glicosídeos, tanino e flavonoides tiveram ação comprovada sobre os patógenos endodônticos *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Na Odontologia a própolis (*Apis mellifera*) é utilizada como agente antimicrobiano, podendo ser usada como irrigante intracanal, como agente cariostático e no tratamento da periodontite e candidoses. A ação anti-inflamatória é possível pela presença de flavonoides e ácido cafeico (GOMES et al., 2020).

Os medicamentos fitoterápicos possuem como principais vantagens, fácil manuseio, grande disponibilidade de matéria-prima, aceitação popular e trazem grandes benefícios para a saúde de quem os utiliza. Para isso, é indispensável que ocorra um diagnóstico prévio e preciso da doença, além da escolha da planta apropriada, de acordo com suas propriedades e indicação (ALELUIA et al., 2015).

O Brasil tem um grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia pois possui a maior diversidade vegetal do mundo tendo aproximadamente 55.000 espécies vegetais catalogadas (BRASIL, 2006; WHO, 1998), dessa forma é de grande importância o estudo dos princípios ativos de cada planta medicinal com potencial terapêutico, colaborando com a descoberta de insumos farmacêuticos e moléculas ativas farmacológicas, uma vez que o espectro de utilização destes produtos naturais é o mais diverso possível como exemplificado pelo uso de plantas medicinais como antibiótico, analgésico, anti-inflamatório, antimalárico, dentre outras (GOMES et al., 2020; PEREIRA et al., 2018).

A fitoterapia através dos estudos com extratos de plantas medicinais tem avançado na Odontologia, pela busca da prevenção e tratamento para diversas afecções bucais e pelas diversas aplicabilidades e ações terapêuticas e possibilidade de uso para o controle dos microrganismos do

biofilme dental.

Alguns desses estudos estão focados na investigação da capacidade de produtos derivados de plantas em inibir a formação de biofilmes na cavidade oral, interferindo e reduzindo a adesão de patógenos microbianos a diferentes superfícies orais, o que constitui o primeiro passo na formação de placa dentária e na progressão para cáries e doenças periodontais. Foi demonstrado que extratos vegetais brutos e fitoquímicos purificados podem atuar como bactericidas, inibindo um ou todos os estágios de formação de placa, interferindo na adesão/agregação/formação de biofilme ou inibindo a produção de ácido glicolítico em bactérias cariogênicas (MILHO et al., 2021)

Muitos compostos, como catequinas, flavonóides, alcalóides, terpenóides, oligômeros de proantocianina e alguns outros compostos derivados de plantas, inibem os GTFs (Glicosiltransferase) de *Streptococcus mutans* um dos fatores cruciais de virulência dessa bactéria. Como estratégia para inibir a virulência de microorganismos cariogênicos a inibição de GTFs (Glicosiltransferase) representa uma abordagem de grande potencial para prevenir a cárie dentária (REN et al., 2016).

2.4 Fitoterápicos Amazônicos de uso Odontológico

O uso diário de extratos vegetais e seus produtos se torna uma alternativa promissora aos compostos sintéticos no controle de doenças bucais, uma vez que o interesse popular e institucional em terapias alternativas e/ou complementares vem crescendo nos últimos anos, assim como, o estudo e a validação científica dessa diversidade vegetal (SILVA et al., 2022).

Na região Amazônica, existe uma grande biodiversidade de plantas medicinais utilizadas de maneira empírica, porém com indicações consolidadas por séculos de interação cultural (BORRÁS et al., 2003). Sua extensão territorial chega a medir cerca de 5 milhões de km², com 33.000 espécies de plantas superiores catalogadas e pelo menos 10.000 destes vegetais são considerados aromáticos e/ou terapêuticos (FERREIRA; BARATA, 1998)

Dentre muitas plantas medicinais existentes na Amazônia algumas já tiveram suas propriedades antimicrobianas sobre microorganismos formadores de biofilme oral comprovadas cientificamente como o jucá (*Libidibia férrea*), crajiru (*Arrabidaea chica*), alfavaca (*Ocimum micranthum*), copaiba (*Copaifera multijuga*) e pirioca (CONDE et al., 2015; BERSAN et al., 2014; GALVÃO et al., 2012). O potencial antimicrobiano das plantas medicinais utilizadas na medicina popular na região amazônica justificam o estudo dessas plantas e sua atuação contra as bactérias presentes na boca para comprovação científica do efeito dessas plantas ou substâncias delas derivadas como agentes antimicrobianos em Odontologia (CONDE et al., 2015; FERREIRA, 2018b).

A seguir descreveremos fitoterápicos da Amazônia com maior número de registros na literatura.

2.4.1 Copaíba

A *Copaifera multijuga* Hayne (*Leguminosae*) é uma árvore de origem amazônica, e é uma das 43 espécies de *Copaifera*., habitualmente encontrada na Amazônia, mais especificamente nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso. Em seu tronco, é encontrado um óleo-resina que possui ação cicatrizante e anti-inflamatória. Usada por indígenas desde os tempos da chegada dos portugueses, a copaíba é um dos fitoterápicos mais usados e conhecido pela população até hoje (COSTA et al., 2006).

O óleo de copaíba tem sido utilizado por mais de 500 anos na medicina tradicional popular, com uma grande diversidade de aplicações. Alguns trabalhos têm sido realizados com o objetivo de determinar a composição deste, algumas outras pesquisas têm se direcionado para a comprovação das atividades medicinais atribuídas ao óleo e a indicação científica deste à terapêutica de várias doenças (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Segundo alguns autores, os principais sesquiterpenos encontrados no óleo-resina da copaíba são β -cariofileno (CRAVEIRO et al., 1981), que possui comprovada ação antiinflamatória (RAMOS, 2006), antibacteriana, antifúngica e antiedêmica, o β -bisaboleno com propriedades descritas como antiinflamatórias, analgésicas, antiviral, anti-úlceras e abortivo, β -

elemento anticâncer, entre outros (OLIVEIRA et al., 2006; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

Pesquisas realizadas nas últimas duas décadas apontam o óleo de copaíba para o campo da Odontologia, comprovando seu uso como anti-inflamatório em processos agudos e após procedimentos cirúrgicos; no tratamento endodôntico como curativo de demora associado a hidróxido de cálcio e em tratamento de alveolites. Além disso, estudos comprovam a ação antimicrobiana da copaíba sobre bactérias formadoras da placa e cárie dental (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; MONTEIRO, 2014; DE BARI et al., 2016; SIMÕES et al., 2016; VALADAS et al., 2019).

Em busca de avaliar a ação antimicrobiana contra vários patógenos orais, Bardají et al. (2016) investigaram a atividade antimicrobiana do oleorresina de *C. reticulata* contra alguns microrganismos que causam cárie dentária e periodontite, como: *Streptococcus sobrinus*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei*, *S. salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* e ainda os isolados clínicos de *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei*, *S. salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces viscosus* e *Prevotella buccae*. Como resultado alcançado, observaram que o oleorresina de *C. reticulata* não apresentou atividade antibacteriana frente à *L. casei* e os isolados clínicos, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella buccae*, *P. gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Para os outros microrganismos testados, os resultados mostraram-se promissores, pois a atividade antibacteriana foi em concentrações iguais ou inferiores a 100 µg/mL. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem o produto vegetal estudado como composição de um enxaguatório bucal uma vez que essa oleorresina interfere diretamente na interação entre os microrganismos, impedindo a formação de placas dentárias. Essa associação pode minimizar os efeitos colaterais dos produtos para lavagem bucal e melhorar sua ação antimicrobiana, anti-inflamatórias e, imunomodulatórias, através de efeito sinérgico no tratamento da periodontite. Tal efeito farmacológico pode ser atribuído aos diterpenos ácido ent-copálico, éster ent-agático-15-metilico e ácido ent-

polialítico que interage com a membrana celular da bactéria e aumenta a permeabilidade, se ligando a constituintes vitais aos patógenos e alterando o pH bacteriano (BARDAJÍ et al., 2016).

Em estudo realizado por Almeida Júnior (2023), a utilização do óleo-resina de *C. reticulata* demonstrou-se seguro após ensaios pré-clínicos de avaliação *in vitro* e *in vivo*, assim como demonstrou atividade antimicrobiana. Apresentando os compostos sesquiterpenos β -cariofileno, β -bisaboleno, α -humuleno e os diterpenos ácido cauranoico e ácido caurenico como constituintes majoritários.

O óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne demonstrou ser um material promissor no preparo de restaurações e cimentos provisórios na clínica odontológica, por ser biocompatível e possuir um potencial irritativo menor que o eugenol - agente muito utilizado na Odontologia no preparo de pastas e cimentos - e apresentar atividade antibacteriana frente ao *S. mutans* e *S. sanguinis*, após a sua associação com óxido de zinco e hidróxido de cálcio (RIBEIRO, 1989; VASCONCELOS et al., 2008).

Barboza et al. (2017), relatou a eficiência das propriedades físico-químicas e antimicrobianas do cimento endodôntico contendo óleo de copaíba. A literatura comprova a atuação antimicrobiana em 24h em todas as concentrações testadas, comparadas com as opções sintéticas.

2.4.2 Unha de Gato (*Uncaria tomentosa*)

A *Uncaria tomentosa*, também conhecida pela sinonímia de “unha-de-gato”, é uma planta indígena da floresta amazônica, está presente também na América do Sul e América Central. Os estudos científicos com a unha de gato se iniciaram nos anos 70 com Klaus Keplinger, responsável por organizar o primeiro trabalho definitivo com a *U. tomentosa* (MOREIRA; PEIXOTO; MARCHIONNI, 2020; PAIVA et al., 2009).

A *U. tomentosa* apresenta como componentes os alcalóides oxindólicos, triterpenos, esteróides, compostos fenólicos, glicosídeos, taninos e flavonoides. Estudos mostram que tais compostos estão relacionados às suas propriedades anti-inflamatórias, antineoplásicas, imunoestimulantes, antioxidantes e antimicrobiana (JÚNIOR; MONTEIRO, 2020). Assim é utilizada para tratar abscessos, inflamações, febre, infecções bacterianas e fúngicas (HERRERA et al., 2010).

Cahuana-Vasquez et al. (2007), realizaram estudo clínico onde verificou-se que a *U. tomentosa* micropulverizada em uma concentração mínima de 3% inibiu em 52% cepas de *Streptococcus mutans*, considerado principal agente etiológico da cárie. Já nas concentrações de 4% e 5% a ação inibitória subiu para 56% e 60%. Nesse estudo, a *U. tomentosa* micropulverizada em até 5% (50mg/ml) não inibiu o crescimento do *Candida albicans*, fungo responsável pela candidíase oral.

Paiva et al. (2009) realizaram um estudo com pessoas acometidas com candidíase oral, os pacientes foram submetidos a terapia antifúngica, no qual foram divididos em dois grupos, ao 1º grupo (grupo- teste), constituído por 10 pacientes foi administrado a *U. tomentosa* (Imuno-Max) na forma de gel, em bisnagas contendo 10 g, em quantidade suficiente para cobrir toda a área atingida, três vezes ao dia, durante duas semanas, conforme indicações do fabricante. O 2º grupo (controle-positivo), com 10 pacientes utilizou o Miconazol (Daktarin) a 4% na forma de gel, em bisnagas contendo 30 g, três vezes ao dia e por duas semanas. Em ambos os grupos pode-se observar o desaparecimento da sintomatologia após 14 dias de tratamento. Um dado importante da pesquisa foi que nenhum paciente do grupo-teste mencionou reações adversas durante tratamento, sendo considerado uma vantagem do fitofármaco em relação ao Miconazol, já que (40%) pacientes do grupo-controle relataram ter tido reações adversas como náuseas e dor epigástrica no decorrer do tratamento. Após o tratamento foi realizado exames micológicos que mostraram eficácia da *U. tomentosa* superior ao do Miconazol, uma vez que 60% dos pacientes do grupo-teste obtiveram resultados negativos no micológico pós terapia medicamentosa, enquanto no grupo-controle (Miconazol), 50% apresentaram resultados negativos. Em razão da amostra do estudo ter sido pequena, os autores informam que seria necessário continuidade nas pesquisas sobre este fitofármaco, porém os resultados obtidos foram promissores, mostrando que a *U. tomentosa* pode ser uma opção de fitofármaco de uso fúngico na odontologia.

Herrera et al. (2010), avaliaram as propriedades antimicrobiana *in vitro* da unha de gato diante de patógenos endodônticos (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*). Foram utilizados

quatro produtos para auxiliar no estudo, o gel de clorexidina a 2% (como controle positivo, a clorexidina por ser potente atividade antimicrobiana na endodontia e na forma de gel por conta da efetividade na remoção de detritos orgânicos), o gel de unha-de-gato a 2% (obtido a partir de um extrato liofilizado), o gel contendo clorexidina e unha-de-gato a 2% e o gel de hidroxietilcelulose a 1% (como controle negativo). Os resultados mostraram que o gel com clorexidina e unha de gato a 2% foi a substância mais eficaz perante os patógenos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Assim, os autores concluíram que extratos formulados com *U. tomentosa* em associação com a clorexidina tem efeito potencializado contra patógenos endodônticos.

2.4.3 Sacaca (*Croton cajucara* Benth)

Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae), popularmente conhecido como sacaca, é um arbusto comum que cresce na região amazônica comumente usado na medicina popular como chá para doenças como diarreia, diabetes e distúrbios gastrointestinais.

Alviano et al. (2005) verificaram que o óleo essencial de *C. cajucara* tem atividade antibacteriana significativa contra *Candida albicans*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus mutans* bactérias associadas a doenças da cavidade oral. Nesta análise, a proliferação das células bacterianas foi inibida por moléculas não caracterizadas, e o linalol foi confirmado como o componente antifúngico do óleo essencial. Os efeitos do linalol na biologia celular de *C. albicans* foram avaliados por microscopia eletrônica, que mostrou que o linalol induziu redução no tamanho das células e germinação anormal.

2.4.4 Jucá (*Libidibia ferrea* L)

A espécie *Libidibia ferrea* L., comum na Amazônica conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro vem sendo muito usada na medicina popular. A partir de porções da planta como a casca do caule e vagem, popularmente são realizadas preparações que possuem ação cicatrizante e propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antimicrobiana e cicatrizante já verificadas por diversos estudos (SAMPAIO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2014; CONDE et al., 2015). Além disso, a análise do perfil

fitoquímico do extrato hidroalcolólico de *Libidibia ferrea* L. em estudos de identificação por cromatografia líquida, demonstrou a presença de componentes isolados pertencentes ao grupo dos esteroides, flavonoides, saponinas, cumarinas e taninos, sendo os taninos os principais componentes químicos relacionados as propriedades terapêuticas do Jucá, (FALCÃO et al., 2019; PEREIRA et al., 2012; PEDROSA et al., 2016).

Conde et al. (2015), pesquisaram triagem de espécies amazônicas quanto à ação antimicrobiana sobre microorganismos formadores de biofilme dental e concluíram após ensaio *in vitro*, que o extrato da vagem de jucá obteve atividade antimicrobiana e inibiu a aderência em todas as cepas testadas.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados por Oliveira et al. (2021), referente ao potencial citotóxico de uma formulação de pomada orabase de *Libidibia ferrea*, a ser utilizada para fins terapêuticos sobre úlceras traumáticas, foi possível concluir que o extrato do caule do jucá utilizado na formulação assim como o seu veículo e adjuvantes, não se apresentaram citotóxicos quando em contato com hemácias e fibroblastos em cultura de células. Em contrapartida o enxaguatório à base de *Libidibia ferrea* proposto por Oliveira Marreiro et al. (2021), apresentou-se citotóxico frente ao teste de cultura celular com fibroblastos; no entanto, o resultado para o teste de hemólise apresentou-se pouco tóxico com baixa taxa de hemólise.

Em estudo anterior, o extrato etanólico do jucá demonstrou ser seguro após ensaios pré-clínicos farmacológicos e eficaz sobre as bactérias *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*. Atividade antimicrobiana possivelmente relacionada a presença de metabólitos secundários presentes no extrato vegetal, como taninos (representado pelo ácido gálico e ácido elágico), flavonoides e alcaloides (ALMEIDA JÚNIOR, 2023).

2.4.5 Própolis

A própolis é uma substância pegajosa composta de resina, cera e óleos essenciais preparados por abelhas a partir de exsudatos de árvores e flores para preencher os espaços em suas colmeias. Desde a antiguidade, é bem conhecida na medicina popular como um importante

complemento alimentar bioativo e um excelente conservante com atividade antibacteriana e antifúngica. Embora os constituintes ativos da própolis sejam diferentes de acordo com a fonte geográfica, ainda existem grandes classes comuns em preparações de própolis, como ácidos fenólicos e flavonóides, que são considerados os principais constituintes biologicamente ativos (DAS NEVES et al., 2016).

Pinocembrina e galangina, seguidas de crisina, foram os principais flavonoides identificados na amostra de própolis utilizada por Arafa et al., (2018), que podem ter contribuído para a sua potente atividade bacteriana, em filmes oromucoadesivos, preparados para tratar úlcera aftosa oral recorrente. Os autores concluíram neste estudo que, filmes oromucoadesivos contendo própolis contribuíram na redução do tamanho das úlceras aftosas, duração prolongada do alívio da dor, além da redução do tempo de cicatrização da úlcera.

Além de atividade antimicrobiana, a própolis também possui atividades anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, anestésica, cicatrizante e antisséptica. Na odontologia, a própolis é dispensada na forma de creme dentais, enxaguatórios bucais, pastilhas e pó, e é utilizada no tratamento de vários acometimentos da cavidade bucal. Como antimicrobiano, ela pode ser usada como irrigante intracanal, como agente cariostático e no tratamento da periodontite e candidíase. A ação anti-inflamatória é possível pela presença de flavonoides e ácido cafeico, pois estes inibem a produção de ácido araquidônico, e assim, a síntese de prostaglandinas (FRANCISCO, 2010; ALELUIA et al, 2015; BARRIENTOS et al., 2013; GOMES et al., 2020).

Além das espécies vegetais já citadas, extratos de cráju (*Arrabidaea chica*) e alfavaca (*Ocimum micranthum*) mostraram atividade antimicrobiana sobre microorganismos formadores de biofilmes orais, assim como, extrato de jambu (*Spilanthes acmella*) e o óleo de andiroba (*Carapa guianense*) inibiram a aderência em todas as cepas ensaiadas. (CONDE et al., 2015).

Além de serem utilizadas por sua ação antisséptica e antibacteriana, as plantas medicinais de origem Amazônica, tem outras aplicações na Odontologia, como é o caso do açaí (*Euterpe oleracea*) que produz um

evidenciador de placa dental (ontocianina) com eficiência de 90% superior a produtos sintéticos comercializados tais como Replak® (corante azul/vermelho alimentício) e Plakstesim® (fucsina básica) (EMMI, 2006). Assim como, *Acmella oleacera* L., *Aniba roseadora* Ducke, *Astronium fraxinifolium* Schott, *Canna gigantea* Desf., *Erythrina corallodendron* L., *Piper geniculatum* Sw., *Protium icariba*, utilizadas para o alívio da dor de origem dental (MORS et al., 2000).

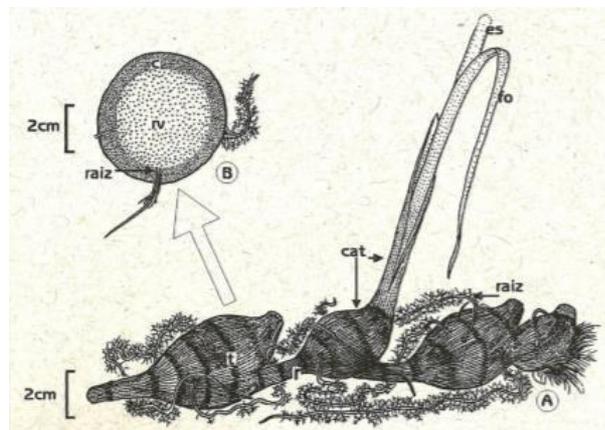
2.4.6 Priprioca (*Cyperus articulatus*)

Na região amazônica, *Cyperus articulatus* (Cyperaceae), planta aromática conhecida popularmente como priprioca, destaca-se entre as espécies utilizadas para fins terapêuticos. Esta espécie nativa ocorre naturalmente no Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil. A espécie produz um óleo volátil amarelo intenso, com valor econômico para a produção de perfumes e fragrâncias na indústria cosmética (FLORA DO BRASIL, 2019);

O gênero *Cyperus* é formado por aproximadamente 550 espécies que ocorrem preferencialmente em ambientes alagados, margens de estradas, campos e campinas. No estado do Pará, devido ao clima favorável, há a ocorrência de inúmeras espécies, tais como: *C. aggregatus* (Willd.) Endl., *C. articulatus* L. (var. *articulatus* e var. *nodosus*), *C. diffusus* Vahl, *C. distans* L. f., *C. elegans* L., *C. giganteus* Vahl., *C. ligularis* L., *C. luzulae* (L.) Rottb. Ex Retz.,, *C. sphacellatus* Rottb. ex Retz, *C. prolixus* Kunth, *C. rotundus* L., *C. sphacellatus* Rottb e *C. surinamensis* Rottb. Portanto é importante a identificação correta da espécie em estudo, pois a composição química das espécies diferem entre si (ZOGHBI et al., 2008).

Os órgãos aéreos da planta são escapos e folhas, enquanto órgãos subterrâneos são rizomas, tubérculos e raízes (Figura 2). A altura da planta varia de 30 a 250 cm. As células oleíferas estão presentes exclusivamente nos rizomas e tubérculos, como é comum na família Cyperaceae, no entanto, devido a ampla utilização do termo rizoma, este trabalho considerará rizoma a junção de tubérculos e rizomas (ROCHA, 2008; SANTOS et al., 2012).

Figura 2: Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos de *C. articulatus*. A – Órgãos subterrâneos e aéreos, B – Secção transversal do tubérculo, c = córtex, cat = catafilo, es = escapo, fo = folha, r = rizoma, rv = região vascular, t = tubérculo.



Fonte: Santos et al., 2008.

2.4.6.1 Estudos químicos e propriedades biológicas de *C. articulatus*

Os principais estudos sobre a espécie *C. articulatus* são os de Zoghbi et al. (2006) e posteriormente Kasper et al. (2018a, 2018b e 2020); ambos caracterizaram os compostos majoritários do óleo de rizomas de *C. articulatus* cultivados no Pará, por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas identificando o α -pineno, trans-pinocarveol, mirtenol, verbenona, α -copaeno, β -selineno, óxido de cariofileno, aristolona, mustacona, 7-isopropenil-1,4a-dimetil- 4,4a,5,6,7,8-hexahidro-3H-naftalen-2-ona e ledol. Diferença geográfica da localização da amostra, como condições do solo, idade da planta, época de colheita, fatores ambientais podem influenciar a composição química dos óleos essenciais (KASPER et al., 2018a).

A espécie foi implantada nos municípios paraenses de Santarém e Belterra. Em Santarém, em 2012, na Comunidade de Tabocal I (-54°71'71,02"W e - 02°62'85,33"S) na propriedade do senhor Moreira e um ano depois na comunidade Tabocal II (-54°74'04,59"W e - 02°62'38,48"S) na propriedade da família Galo. No município de Belterra, em 2012, na área experimental da EMBRAPA (-54°54'00,90"W e - 0 2°41'17,00"S) (ARÉVALO, 2021).

Dos rizomas de *C. articulatus* é extraído óleo essencial de coloração amarelo forte e odor característico. O odor agradável do óleo essencial dos

rizomas de *priprioca* é recorrente da complexa composição química dos metabólitos secundários da espécie. Substâncias sesquiterpênicas das classes dos patchulanos, eudesmanos, cariofilanos e rotundanos são predominantes nos óleos essenciais e extratos apolares das espécies de *Cyperus*. O óleo de *C. articulatus* difere do óleo de *C. prolixus* e *C. rotundus* graças a maior porcentagem de α -pineno e β -pineno e a presença de mustacona (ZOGHBI et al., 2008).

Na Amazônia, rizomas de *priprioca* são utilizados na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades como enxaqueca, dor de estômago, febre, malária e por suas propriedades contraceptivas e abortivas segundo Silva et al. (2019). Dentre as finalidades terapêuticas, várias já foram comprovadas por diversos autores, como a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e leveduras (FREIRES et al. 2015; OLADOSU et al., 2011; KASPER et al., 2018a), propriedade anticonvulsivante (NGO BUM et al., 2003), atividade antiparasitária (METUGE et al., 2014; SILVA et al., 2019), atividade antioxidante (DESMACHELIER et al., 1997) e anti-inflamatória (FERREIRA, 2018a).

Segundo Rakotonirina e colaboradores (2001) o extrato aquoso do rizoma de *C. articulatus* não apresentou efeitos anestésicos ou paralisantes, entretanto a atividade motora espontânea em camundongos foi significativamente reduzida. Quando comparado ao diazepam, o extrato não demonstrou o efeito de relaxamento muscular, embora quando associado ao tiopental de sódio ou ao diazepam, facilitou a indução e aumentou o tempo total do sono sem nenhum efeito analgésico concomitante. Sendo assim, concluiu que *C. articulatus* possui propriedades farmacológicas semelhantes à dos sedativos conhecidos, induzindo o sono.

De acordo com Rukunga et al. (2008) os sesquiterpenos corimbolona e mustacona, isolados do extrato clorofórmico dos rizomas de *C. articulatus* apresentaram atividade antiplasmódica significativa, onde o sesquiterpeno mustacona mostrou-se mais eficiente. Silva et al. (2019) também afirmaram a atividade antimalárica do óleo essencial de *C. articulatus*.

Óleos essenciais de *C. articulatus* oriundos da Nigéria, mostraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e citotoxicidade *in vitro* contra células causadoras de câncer de mama (KAVAZ et al., 2019). Da mesma forma, Desmarchelier (1996) estudou a decocção de rizomas de *C. articulatus* coletados na área do rio Tambopata, em Madre de Dios, Peru e os testes antimicrobianos revelaram que *Staphylococcus aureus* foi totalmente inibida pela decocção de *C. articulatus*, não apresentando efeito inibitório contra *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*.

Estudos que comprovem a aplicabilidade dessa planta na Odontologia são escassos. Em estudo feito por Bersan et al. (2014), óleos essenciais obtidos de vinte plantas aromáticas e medicinais brasileiras foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana sobre os patógenos orais *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*. A maioria dos óleos essenciais apresentou atividade antimicrobiana moderada a forte contra estes microrganismos. Entretanto, o óleo de *C. articulatus* apresentou os melhores resultados e maior capacidade de controlar a formação de biofilme, inibindo 63,96% da formação de biofilme de *S. sanguis*. A análise química do óleo essencial de *C. articulatus* utilizado neste estudo mostrou a presença dos sesquiterpenos mustacona e α -copaeno, e do monoterpeneo trans-pinocarveol como componentes majoritários. Os autores associaram a atividade antimicrobiana a possíveis mecanismos de ação apresentado pelos componentes químicos α e β -pineno, que mostraram ser capazes de destruir a integridade celular, além de inibir a respiração e os processos de transporte de íons, levando à morte celular (CARSON et al., 2002; BERSAN et al., 2014).

Em estudo feito para avaliar a atividade anti-*candida* de óleos essenciais e extratos etanólicos de folhas e/ou raízes de 35 plantas medicinais comumente utilizadas no Brasil, extratos etanólicos não foram eficaz em nenhuma das concentração testadas, no entanto, os resultados indicaram forte atividade contra *Candida albicans* para óleos essenciais de *Achillea millefolium*, *Mikania glomerata* e *Stachys byzantina* (CIM- 0,25 mg/ml) e moderada para *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon*

martinii, *Cyperus articulatus*, *Cyperus rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* (DUARTE et al., 2005). Em estudo similar, óleos essenciais de 20 plantas medicinais brasileiras foram testados quanto a atividade antimicrobiana sobre *S. mutans*. De acordo com os resultados da pesquisa todos os óleos mostraram atividade antimicrobiana sobre a bactéria testada, dentre estes, o óleo essencial de *C. articulatus* com valor de CIM de 250 µg/ml. No entanto, de acordo com metodologia pré-estabelecida pelos autores, os melhores resultados (CIM < 250 µg/ml), foram atribuídos aos óleos essenciais de *A. gratissima*, *B. dracunculifolia*, *C. sativum* e *L. sidoides*; que também foram capazes de romper a formação de biofilme criado por *S. mutans* (GALVÃO et al., 2012).

Ao avaliar o efeito antifúngico de *Cyperus articulatus* sobre fungos fitopatogênicos, autores concluíram que o óleo essencial dessa espécie apresentou atividade antifúngica sobre *Aspergillus niger* e *Aspergillus parasiticus*, havendo diferença de inibição nos dois períodos estudados (chuvoso e seco); O óleo essencial do período seco foi mais eficiente frente a *A. niger*, enquanto o óleo de pripioca extraído no período chuvoso proporcionou maior controle de *A. parasiticus*. A mustacona foi a substância majoritária do óleo essencial de *C. articulatus* neste trabalho, em concentração relativa de 11% no período seco e chegando à 14% no período chuvoso (KASPER et al., 2018a). Da mesma forma, Kasper et al., (2018b) avaliaram a atividade antifúngica do hidrolato de pripioca, revelando seu efeito fungistático sobre o fitopatógeno *Colletotrichum musae*.

Grandes quantidades de rizomas de pripioca são extraídos anualmente, gerando toneladas de resíduo sólido (massa vegetal após a retirada de óleo essencial) e muitos litros de hidrolato (resíduo líquido obtido da destilação de plantas aromáticas). O resíduo sólido costuma ser queimado para alimentar as caldeiras do sistema de arraste à vapor e o hidrolato é descartado em rios. Entretanto, ambos os resíduos possuem substâncias orgânicas remanescentes do processo de extração de óleo essencial, e resíduo sólido contém ainda substâncias que não são extraídas no arraste à vapor (KASPER, 2016). Segundo Kasper (2016), os compostos majoritários identificados no hidrolato de pripioca foram a

verbenona e mustacona, e a caracterização fitoquímica do resíduo sólido revelou a presença de sesquiterpenos, tais como a mustacona e corimbolona, ácidos graxos e esteroides. Ainda, segundo a mesma autora, essas substâncias apresentam grande potencial do ponto de vista biológico, químico, econômico e tecnológico, constituindo matéria-prima para indústria de produtos cosmeceuticos.

Machado et al. (2020), avaliaram o efeito larvicida do hidrolato dos rizomas de *C. articulatus* contra larvas de *Aedes aegypti* e observaram a redução da sobrevivência destas larvas, os compostos químicos majoritários identificados neste hidrolato foram: verbenona, o trans-sabinol e o mirtenol.

Constatou-se ainda a propriedade inseticida de *C. articulatus* no estudo realizado por Abubakar et al. (2000) no qual o extrato metanólico dos rizomas da espécie apresentou ação repelente contra o besouro *Tribolium castaneum* Hbst. O extrato metanólico dos rizomas de *C. articulatus* também apresentou efeito hepatoprotetor comprovado por Datta et al (2013), no qual ratos intoxicados com paracetamol foram tratados com o extrato metanólico e apresentaram arquitetura celular do fígado mantida normal, em comparação aos ratos do grupo controle.

Estudos realizados por Metuge et al. (2014) mostraram que o extrato hexânico dos rizomas íntegros de *C. articulatus* foi ativo contra vermes adultos do parasita bovino *Onchocerca ochengi*, concluindo-se que os compostos isolados mustacona e ácido linoleico foram capazes de matar o parasita. O extrato metanólico deste vegetal também foi avaliado em diversas pesquisas, revelando potencial antiinflamatório, inseticida e hepatoprotetor (MITTAS et al., 2022; ABUBAKAR et al., 2000; DATTA et al., 2013).

A partir dos ensaios realizados em trabalho feito por Ferreira (2018), os resultados demonstraram que o tratamento de macrófagos com o óleo essencial *Cyperus articulatus* (OECA) foi capaz de reduzir de maneira significativa parâmetros inflamatórios *in vitro* como a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), síntese do óxido nítrico e produção do eicosanóide PGE2, o que pode estar relacionado com a composição química do óleo essencial da espécie estudada.

É importante notificar que não basta que uma planta medicinal tenha eficácia em determinada ação farmacológica, é absolutamente necessário que ensaios de segurança conforme preconiza a ANVISA (ANVISA, 2012) sejam realizados. Além do mais, pesquisas tem mostrado que muitas plantas medicinais não são inócuas, possuem substâncias agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas respeitando os riscos toxicológicos (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Neste sentido, após pesquisa realizada por Silva et al. (2019) o uso do óleo essencial de *C articulatus* mostrou-se seguro em doses superiores a 2.000 mg/ kg após avaliação de toxicidade aguda *in vivo*, e ausência de efeitos citotóxicos para fibroblastos pulmonares humanos pelo ensaio de viabilidade celular com MTT foram encontrados.

Como podemos observar, os óleos essenciais são amplamente estudados, tendo sido registrado em vários trabalhos a composição química e a atividade biológica destes. No entanto, os resíduos sólidos que consistem na massa vegetal esgotada de óleo essencial gerados pelo processo de extração dos óleos essenciais, são pouco estudados. Esse resíduo, ainda é descartado, embora comprovada a presença de substâncias bioativas nesse subproduto, principalmente sesquiterpenos, com propriedades fungicida, antimalárica e redução de células cancerígenas (SILVA et al., 2021; KASPER et al., 2020; ASSIS et al., 2020).

2.5 Desenvolvimento de fitoterápicos

A fitoterapia consiste na terapia baseada no uso de fitoterápicos com produtos farmacêuticos de origem vegetal, devidamente avaliados quanto à sua qualidade, eficácia e segurança de uso, sendo eles preparações vegetais padronizados que consistem em uma mistura complexa de uma ou mais substâncias presentes na planta e precisam ser devidamente preparados e prescritos em obediência à legislação vigente (BETTEGA et al., 2011).

Nos anos 80, os fitoterápicos passaram a ter uma maior relevância e visibilidade, o que levou as indústrias a se aprofundarem nas pesquisas com a finalidade de comprovar a eficácia terapêutica destes. Este fato auxiliou a busca e desenvolvimento de novos fitoterápicos, pois, observou-

se que eles poderiam trazer benefícios a partir das suas propriedades curativas, sempre que houvesse efeito terapêutico semelhante ou igual à fármacos produzidos de forma sintética além de baixo riscos de efeitos adversos quando comparados às drogas alopáticas (BETTEGA et al., 2011).

Como argumentos que justificam o uso dos produtos naturais com atividades farmacológicas, podem-se citar vários, como a dificuldade na aquisição das drogas sintéticas, a proximidade das pessoas que moram em países em desenvolvimento com a natureza e sua adaptação aos recursos disponíveis no ambiente e amplo espectro de utilização terapêutica (BORGES et al., 2019; CHEUKA et al., 2017; IBIAPINA et al., 2014; SÜNTAR, 2020). Um exemplo de região de acesso remoto é a Amazônia, que possui algumas áreas com acessibilidade complicada e que em algumas vezes o único produto terapêutico presente nessas localidades são os recursos oriundos da natureza (PIRIZ et al., 2014).

Como já vimos anteriormente, são inúmeros os trabalhos desenvolvidos sobre plantas, que comprovam suas ações terapêuticas e descobertas de novos compostos que podem dar origem a novos medicamentos fitoterápicos e as maiores fontes de matérias-primas para o mercado global de fitoterápicos são as florestas tropicais, que estão localizadas em países em desenvolvimento, como por exemplo o Brasil, o qual é detentor de aproximadamente um terço da flora mundial (KLEIN et al., 2009). No entanto, os países desenvolvidos estão na cadeia de produção dos fitoterápicos como os maiores fabricantes do setor e os que mais investem na inovação farmacêutica alopática e fitoterápica. Para o desenvolvimento de um produto fitoterápico, o altíssimo investimento chega a se equiparar aos dos medicamentos alopáticos (KLEIN et al., 2009).

Dessa forma, no intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo na área de plantas medicinais e fitoterápicos, elaborou-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que se constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de

promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (BRASIL, 2006).

No entanto, deve-se levar em consideração que a segurança e a eficácia de fitoterápicos podem sofrer influência de fatores, sejam eles físicos, químicos e/ ou biológicos, e que com o aumento da demanda integrado a falta de fiscalização no processo de produção pode resultar em medicamentos em condições inadequadas de uso, impossibilitando a garantia de qualidade, e sobretudo segurança e eficiência, que são imprescindíveis para a recuperação e manutenção da saúde do usuário (FARIA et al., 2012).

Dessa forma, existem critérios para o registro de novos medicamentos fitoterápicos. Isto é realizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que faz este controle através da RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. Com essa medida, a portaria visa a aprovação de regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária (ANVISA, 2014b).

De acordo com a IN N° 04, de 18 de junho de 2014, ficou definido que os medicamentos fitoterápicos são aqueles produtos fabricados com emprego exclusivo de matéria-prima vegetal ativa e que tenha a segurança e eficácia baseadas em estudos clínicos, caracterizados pela constância de sua qualidade e é passível de registro ou registro simplificado. Já os produtos tradicionais fitoterápicos também são produzidos com emprego de matérias-primas vegetal ativa, entretanto, sua segurança e eficácia são baseadas em tempo de uso por meio de resultados em literaturas técnico-científica publicados, e que sejam contemplados para utilização sem a vigilância médica para fins de diagnóstico, prescrição ou de monitorização. Este tipo de produto não pode conter excipientes ou substâncias que sejam consideradas tóxicas, não pode ser administrado por via oftálmica ou intravenosa, não podem se referir a doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves e é passível de registro, registro simplificado ou sistema de notificação pela ANVISA (ANVISA, 2014a).

Os medicamentos fitoterápicos devem ser considerados com o mesmo rigor que os medicamentos sintéticos. A fiscalização e a obediência às instruções normativas devem ocorrer nas etapas de extração, de

processamento, de conservação e do armazenamento, de modo, a evitar contaminação microbiana com conseqüente perda das suas propriedades, diminuindo com isso os riscos a pacientes ou consumidores desses produtos. O controle de qualidade engloba uma série de ensaios e testes que vão desde a identificação botânica da planta até o doseamento dos princípios ativos, passando por análises microbiológicas, onde se analisa a contaminação por micro-organismos (bactérias e fungos) que podem provocar diversos prejuízos à saúde do consumidor (ANVISA, 2014b).

No tocante à saúde bucal a fitoterapia ainda é negligenciada. Entretanto, os produtos de higiene oral com ativos de origem vegetal estão sendo cada vez mais estudados com protocolos mais modernos que comprovem a eficácia da utilização de determinadas plantas no tratamento das doenças bucais com benefícios à população (DUARTE et al., 2005; BERSAN et al., 2014)

Os enxaguatórios bucais correspondem ao meio mais simples para veiculação de substâncias antissépticas. Estes veículos são empregados como facilitadores da disseminação de compostos medicamentosos ativos destinados ao tratamento de afecções específicas, como a cárie e a doença periodontal, além de serem coadjuvantes dos procedimentos mecânicos de escovação (BAUROTH et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2008).

No Brasil, os enxaguatórios bucais são classificados como produtos de higiene pessoal e cosméticos. As formulações que apresentam indicações específicas como antissépticos, antiplacas e de uso infantil são classificadas como produtos de grau 2 e demandam a comprovação da sua segurança e eficácia antimicrobiana (ANVISA 2012).

No desenvolvimento de novos produtos ou biomateriais, existem níveis de estudo para avaliação da biocompatibilidade, segundo organizações responsáveis pela padronização de testes como a American National Standard Institute (ANSI), a International Organization for Standardization (ISO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Inicialmente devem ser realizados os testes pré-clínicos como os testes *in vitro* e *in vivo*, no intuito de obter informações referentes a segurança da substância a ser testada. No que se refere aos experimentos *in vivo* sobre biocompatibilidade dos materiais de uso odontológico, o

emprego de ratos como animal experimental é bastante relatado. Após a realização desses testes preliminares, pode-se objetivar a aplicação no tecido a que se destina o material com maior segurança, através de testes clínicos em seres humanos (ANVISA, 2012).

No processo de avaliação e validação de um produto é necessário comprovar os benefícios de seu uso, sua efetividade como medicamento e seus riscos à saúde humana. Portanto, é fundamental a realização de ensaios toxicológicos para avaliar a segurança e o risco/benefício do possível uso terapêutico deste novo produto. Dessa forma, o relatório de segurança e eficácia (SE) dos medicamentos fitoterápicos, as ações biológicas devem ser justificadas através de ensaios não clínicos e clínicos de segurança e eficácia (ANVISA, 2014b).

Em substituição aos testes prescritos pelo “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, a Resolução Normativa 04 de 24 de setembro 2014 flexibiliza a utilização de métodos alternativos *in vitro* em substituição aos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente (BRASIL, 2014).

A investigação da irritação ocular de um produto torna-se importante para produtos cosméticos e de higiene pessoal, visto que a substância preparada poderá atingir acidentalmente os olhos do indivíduo. Existem estudos que propõem a utilização de métodos alternativos para a determinação da irritabilidade oftálmica, tais como o teste de membrana cório-alantóide do ovo de galinha (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane - HET-CAM) e ensaio de permeabilidade e opacidade corneal bovina (BCOP). Até então, a forma usual de avaliar o poder de irritação e corrosão ocular era através do método estabelecido por Draize (1944) que preconizava o uso dos produtos com aplicação dermatológica deveriam ser testados nos olhos exclusivamente dos coelhos, por conta de sua sensibilidade e apresentar melhores resultados em comparação com outros animais (CHORILLI et al., 2009).

No entanto, o método HET-CAM foi eleito o método de escolha para pesquisa de irritação/corrosão ocular aguda *in vitro*, pois é capaz de reduzir e refinar o uso de animais nos testes de irritação ocular quando comparado

com o método *in vivo* de Draize (1944), de simples execução e de baixo custo quando comparado ao BCOP (CHORILLI et al, 2009).

O teste HET-CAM investiga na forma semi-quantitativa a capacidade de irritação de produtos solúveis, emulsões, géis ou óleos sobre a membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha no décimo dia de incubação (Chorilli et al, 2009; CCVAM, 2012). Além do mais, este teste é reconhecido pela ANVISA através do Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2012) e é baseado no Journal Officiel de la Republique Française (1996).

3 JUSTIFICATIVA

O último levantamento epidemiológico realizado em 2012 pelo Ministério da Saúde, colocou o Brasil no grupo de países com baixa prevalência de cárie, esta expressiva diminuição na prevalência geral da doença, foi alcançada, através de políticas públicas voltadas a prevenção e promoção de saúde bucal. Porém, de acordo com a pesquisa, a região Norte obteve os maiores valores de prevalência de cárie quando comparada às outras regiões do País. Esse fato é indicativo do que ocorre no Brasil, onde nas regiões brasileiras mais pobres este problema é ainda maior. Dessa forma, fica claro que a redução das desigualdades socioeconômicas e o incremento das medidas de saúde pública direcionadas a comunidades mais carentes, parece ser o caminho para a prevenção e promoção de saúde bucal.

O uso de plantas medicinais para prevenção e promoção de saúde bucal é uma possibilidade real para a mitigação deste problema em áreas de baixo IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) como a Amazonia.

A região Amazônica apresenta a maior biodiversidade mundial com enorme potencialidade terapêutica, podendo contribuir de forma biossustentável no desenvolvimento de novos fármacos, cosméticos e bioprodutos produzidos com matéria-prima vegetal. A priprioca, planta aromática nativa da região, produz um óleo volátil amarelo intenso, usada para a produção de perfumes e fragrâncias na indústria cosmética. Rizomas e tubérculos desta espécie são utilizados na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades como enxaqueca, dor de estômago, febre, malária, além de propriedades contraceptivas e abortivas, a espécie demonstra especial atividade antimicrobiana.

A extração do óleo essencial por arraste a vapor da priprioca produz 99% de um resíduo sem destinação correta, que eventualmente é queimado para produzir vapor para caldeiras. Nosso Grupo de pesquisa realizou a composição química deste resíduo e mostrou que extratos tem propriedade farmacológicas e microbiológicas, podendo constituir matéria-prima para indústrias de cosmecêuticos.

Tendo em vista o potencial desta espécie e a escassez de estudos que comprovem a aplicabilidade dessa planta na Odontologia e sobretudo

visando a agregação de valor ao resíduo, avistamos a possibilidade de realizar uma pesquisa sobre a eficácia e segurança do óleo essencial, do extrato etanólico dos rizomas íntegros e do resíduo sólido da pripioca com possíveis efeitos contra cárie. Desta forma, com um resultado consistente, este estudo poderá corroborar com pesquisas que investigam novas substâncias bioativas, que produza um biofármaco de origem biosustentável promissor no tratamento de doenças que afetam a cavidade oral.

4 OBJETIVO

Objetivo geral

- Realizar estudos pré-clínicos de eficácia e segurança preliminares ao desenvolvimento de um enxaguatório bucal fitoterápico com ação sobre bactéria causadora de cárie, a partir do óleo, extrato etanólico dos rizomas e do resíduo da priprioca (*Cyperus articulatus*).

Objetivos específicos

1. Realizar a obtenção e caracterização química do óleo essencial, do extrato etanólico de rizomas íntegros e do extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus*.

2. Realizar ensaios pré-clínicos de eficácia da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial, do extrato etanólico de rizomas íntegros e do extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus* sobre *Streptococcus mutans*.

3. Realizar ensaios pré-clínicos de segurança: atividade citotóxica e irritação ocular e *in vitro*, toxicidade oral aguda e irritação da mucosa oral *in vivo* (ratos) do óleo essencial, do extrato etanólico de rizomas íntegros e do extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Desenho Experimental

Após a coleta e extração dos materiais vegetais, foi realizado a caracterização química dos produtos naturais. Em seguida, foi realizado a pesquisa da atividade antimicrobiana e depois, procedeu-se aos ensaios de toxicidade pré-clínico *in vitro* e *in vivo*. Conforme o fluxograma a seguir (Figura 3).

Figura 3: Fluxograma dos estudos experimentais.



Fonte: Arquivos pessoais da autora.

Aprovação comitê de ética

Foram utilizados ovos embrionados de galinha no décimo dia de incubação, adquiridos de granja localizada na zona rural de Santarém (Pará) pesando em média 50 – 60 g e ratos albinos *Wistar* de ambos os sexos, com idade inicial de 60 dias e com peso médio entre 160 e 250 gramas de massa corporal, provenientes do Biotério da UEPA - Universidade do Estado do Pará, Campus Santarém.

Os ensaios que utilizam animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará (Ufopa) sob o protocolo número 1120220228. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Ética em

Cuidados com Animais (CONCEA) e Lei nº 11.794/2008 para o devido cuidado e uso de animais experimentais.

Coleta de material vegetal

Tubérculos, rizomas e raízes foram coletados em uma propriedade rural (54°43'00.10"W; 02°37'41.10"S) no município de Santarém, Pará, Brasil. O material botânico foi identificado pelo Dr. Antônio Elielson Sousa da Rocha, e um espécime depositado sob registro MG – 207174 no herbário do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG) (Belém, Pará).

Extração do óleo essencial

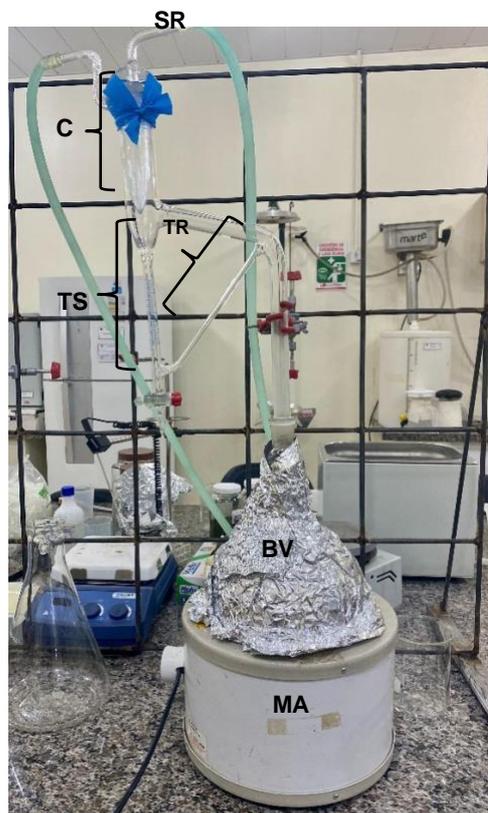
Após a coleta, o material vegetal (rizomas, tubérculos e raízes) foi lavado em água corrente e seco em estufa a 35° C por 72h, moído em moinho de facas e 300g do material vegetal extraído em duplicata em aparelho de Clevenger por hidrodestilação durante 6 horas (Figura 3). Após extração o óleo essencial foi armazenado em frasco mantido sobre refrigeração a 10° C.

Descrição do processo de extração em aparelho Clevenger para obtenção do óleo essencial

300g do material vegetal foram inseridos num balão volumétrico (BV) com 2L de água destilada. O balão foi adaptado ao extrator e levado à manta aquecedora (MA). Ao condensador, foi conectado o sistema de refrigeração (SR) e em seguida, foi ligada a manta aquecedora, regulada à temperatura de ebulição da água, em mistura com a biomassa, dando início ao processo de extração de óleo essencial. Quando a mistura de água e biomassa entra em ebulição, os vapores de água e os voláteis da planta são conduzidos em direção ao condensador (C), onde é realizada a troca de calor, condensando os vapores com a água de refrigeração em operação denominada de destilação. Nessa etapa, podem ser visualizadas, no tubo separador do extrator (TS), as formas líquidas do óleo essencial e da água, com esta retornando para o balão através do tubo de retorno (TR) e o óleo essencial, extraído da biomassa, por ser mais leve que a água, mantendo-se no tubo separador (Figura 4). Esse ciclo se repete

continuamente até que a operação atinja o tempo de 6 horas, quando então o sistema é desligado.

Figura 4: Extração do óleo essencial de *C.articulatus* por hidrodestilação. SR - Sistema de Refrigeração; C - Condensador; TS - Tubo Separador; TR - Tubo de Retorno; BV - Balão Volumétrico; MA - Manta Aquecedora.



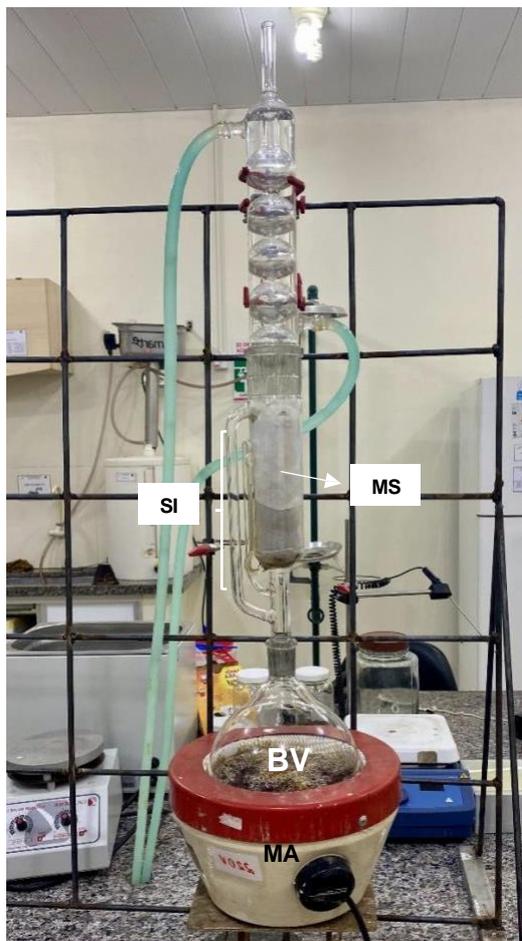
Fonte: Arquivos pessoais da autora.

Descrição do processo de extração para obtenção dos extratos de priprioca

Extrato etanólico dos rizomas íntegros da priprioca

85g de rizomas íntegros foram triturados e extraídos em duplicata em sistema Soxhlet (Figura 5) por 8h com etanol previamente purificado por destilação em NaOH. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo a pressão reduzida a temperatura de 50° C. Após completa evaporação do solvente, os extratos foram acondicionados em frascos estéreis mantidos sob refrigeração a 10° C. Os rendimentos das extrações foram calculados em função da massa de produto obtido em razão da massa vegetal extraída multiplicada por 100.

Figura 5: Equipamento de extração do tipo “Soxhlet”. SI – Sifão; MS – Material Sólido; BV – Balão Volumétrico; MA – Manta Aquecedora.



Fonte: Arquivos pessoais da autora.

Extrato etanólico do resíduo sólido de pripioca

85g do resíduo sólido (subproduto obtido no processo da hidrodestilação) foram submetidos a extração com etanol dos metabólitos remanescentes em equipamentos de Soxhlet (Figura 5) por 8h, em duplicata. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura aproximada 50° C. Após eliminação do solvente, os extratos do resíduo sólido foram armazenados em frascos estéreis e mantidos sobre refrigeração a 10° C. Os rendimentos das extrações foram calculados em função da massa de produto obtido em razão da massa vegetal extraída multiplicada por 100.

Descrição do funcionamento do aparelho do tipo Soxhlet para obtenção dos extratos etanólicos

85 g do material sólido (MS) - rizoma ou resíduo - foi colocado em um cartucho de papel filtro e o solvente (etanol) no balão volumétrico (BV) que entra em ebulição. Ao evaporar, o solvente é condensado e fica armazenado dentro do soxhlet em contato com o cartucho, dissolvendo o composto desejado. Quando o sifão (SI) enche completamente, o solvente com o composto desejado dissolvido desce para o balão de destilação novamente. Esse ciclo continua se repetindo por oito horas. Em seguida, o balão volumétrico com o extrato etanólico e levado ao rotaevaporador, para evaporação do solvente.

Análise cromatográfica do óleo essencial

A análise da composição química do óleo essencial de *C. articulatus* foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector seletivo de massas, utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 250°C, coluna = 80°C, taxa de aquecimento de 5°C/min até 280°C (20 min) e detector = 300°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste numa vazão de 1mL/min e detector seletivo de massas operando a 70 eV, m/z =30 a 500 u.m.a. O OECA foi solubilizado em acetato de etila na concentração de 20 mg/ml e a identificação dos compostos do óleo foi realizada através da comparação com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-11).

Análise cromatográfica dos extratos

Os compostos voláteis presentes nos extratos etanólicos foram analisados em cromatógrafo a gás Agilent modelo 5977E MSD + 7820A Cromatografia a gás-espectrometria de massas (GC-MS), equipado com coluna capilar HP-5MS (30m×0,25 mm×0,25µm).

A análise foi realizada nas seguintes condições: temperatura do injetor de 270° C, temperatura inicial de 60° C, rampa de temperatura de 3° C/min, atingindo a temperatura final de 240° C e mantendo-a por 60 minutos (tempo total de execução). O gás hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. O detector de massa seletivo operou a 70 eV e faixa m/z de 50–400. Para aprimorar a análise, os extratos

passaram por um processo de derivatização da amostra por metilação. A preparação envolveu a adição de 0,2 g de amostra a 5 mL de hexano, seguido da adição de 0,5 µL de metanol e uma solução de hidróxido de sódio (0,5 L). Os compostos identificados foram comparados com bibliotecas eletrônicas do equipamento, incluindo NIST, KAAPI e FFNSC.

Teste antimicrobiano *in vitro*

Microrganismo e condições de cultivo

Cepas liofilizadas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175 – PrLabor®, Cascavel, Pr, Brasil) foram reativados por cultivo em caldo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO) para obtenção de suspensões bacterianas.

Sequencialmente, alíquotas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha), e incubados em estufa bacteriológica, sob atmosfera aeróbica, temperatura de 37°C, por um período de 48h. Os inóculos foram preparados através da inoculação direta de colônias em 1 mL de solução salina estéril, e ajustados ao padrão 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (NCCLS/CLSI, 2006). O ajuste da escala foi obtido com utilização do equipamento MCF500 (MS Tecnopon Instrumentação – Piracicaba, SP, Brasil).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, a concentração inicial testada do óleo essencial foi de 15 mg/ml e do extrato etanólico dos rizomas íntegros e resíduo sólido de pripioca foi de 150 mg/mL. Propilenoglicol foi utilizado como solução solvente. A partir desta solução, as demais concentrações foram igualmente preparadas por diluição em série (fator de diluição 1:1) usando BHI como diluente.

Simultaneamente, suspensões de microorganismos foram inicialmente ajustadas ao padrão 0,5 da escala de MacFarland, com posterior diluição em solução salina estéril (fator de diluição de 1:10), para obtenção da concentração final de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL da concentração específica dos extratos, 90 µL de BHI estéril e 10 µL do inóculo.

Gluconato de clorexidina 0,12% (PerioGard, Colgate®, S.B. Campo, SP) foi utilizado como padrão positivo, testado na concentração inicial de 0,6 mg/ml. O controle de viabilidade das cepas, o controle de esterilidade do meio e o controle de atividade do solvente, foram realizados simultaneamente. As microplacas foram encubadas em estufa bacteriológica, sob temperatura controlada de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24h. Finalizado o período de incubação, a inibição do crescimento dos microorganismos foi revelada por adição de solução aquosa do corante resazurina (Sigma-Merck, Darmstadt, Alemanha) (20 μL , 0,02%, p/v), com posterior reincubação por mais 3h. A CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de microorganismos, foi determinada pela permanência de coloração azul nos poços. A visível mudança da coloração azul para rosa (em função da redução da resazurina à refazurina) indica o crescimento de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata (NCCLS/CLSI, 2004).

Ensaio de Toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados com base nas diretrizes da The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD); Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RCD) nº 07, de fevereiro de 2015; Guia de Controle de Qualidade de produtos cosméticos -Anvisa, 2008; ISO (International Organization for Standardization)10.993 – Parte 10, 2010. (ISO, 2010; OECD, 2001; OECD, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; ANVISA, 2012; ANVISA 2014b).

Citotoxicidade *in vitro*

Culturas celulares de fibroblastos Balb/c 3T3 foram testadas quanto a viabilidade celular utilizando o ensaio MTT (brometo de 3- 4,5-dimetiltiazol-2-il -2,5-difeniltetrazólio). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado, e sua concentração, determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro (GUERREIRO et al., 2021).

Cultura de fibroblastos

Para os ensaios de citotoxicidade, fibroblastos Balb/c 3T3 foram cultivados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços, mantidos em DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) com 5% de soro fetal bovino completo, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os ensaios foram realizados por meio do cultivo das células em placas de cultura de 96 poços, mantidas em incubadora por 24 h para a adesão das células. As células foram então incubadas com as substâncias em teste (óleo essencial, extrato etanólico dos rizomas e do resíduo sólido de priprioca) por períodos de 1, 3 e 7 dias. O meio de cultura DMEM foi utilizado como controle (células não expostas). Os ensaios foram feitos com base na metodologia de Guerreiro et al. (2021).

Avaliação da viabilidade celular/metabolismo pelo ensaio MTT
Fibroblastos Bal/c 3T3 foram incubados em placas de cultura de 96 poços com óleo essencial, extrato etanólico dos rizomas íntegros, extrato etanólico do resíduo sólido de priprioca (concentração inicial - 4,68mg/ml e final – 0,29 mg/ml) o controle (meio de cultura) por 1, 3 e 7 dias. Após esse período, o sobrenadante foi removido e adicionados 100µl da solução de MTT (Sigma-Aldrich) a 0,5 mg mL. As células foram então incubadas por 4 h em uma incubadora com 5% de CO₂ e 95% de umidade, a 37 °C. A solução foi descartada e 100 µL de álcool isopropílico acidificado (HCl: álcool isopropílico, 0,04 N) foram adicionados ao extrato para solubilizar os cristais de formazan. As densidades ópticas das soluções foram medidas utilizando um espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda de 570 nm (em triplicata). As leituras de absorbância foram normalizadas pelas células expostas ao DMEM, representando a atividade do succinato desidrogenase (metabolismo celular).

5.9.1.3. Análise de dados

Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados no software estatístico IBM SPSS (versão 26.0, IBM Corporation, Armonk, New York, USA). Os valores de viabilidade celular obtidos foram comparados entre os grupos experimentais pelo teste ANOVA One-way, com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey e, em seguida, para cada um dos grupos, comparou-se os valores de viabilidade ao longo do

tempo de prospecção (1 dias, 3 dias e 7 dias) pelo teste ANOVA com medidas repetidas e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Os gráficos de distribuição dos percentuais de viabilidade celular foram construídos utilizando o software estatístico GraphPad Prism (versão 9.0.0, GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Para todos os testes adotou-se um nível de significância de 5%.

Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda *in vitro*

O método de escolha para a pesquisa de irritação/corrosão ocular aguda *in vitro* foi o HET-CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane) que é capaz de reduzir e refinar o uso de animais nos testes de irritação ocular, reduzir o tempo necessário para avaliar uma substância e investigar na forma semi-quantitativa a capacidade de irritação de produtos solúveis, emulsões, géis ou óleos sobre a membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha no décimo dia de incubação (CHORILLI et al., 2009; CCVAM, 2012).

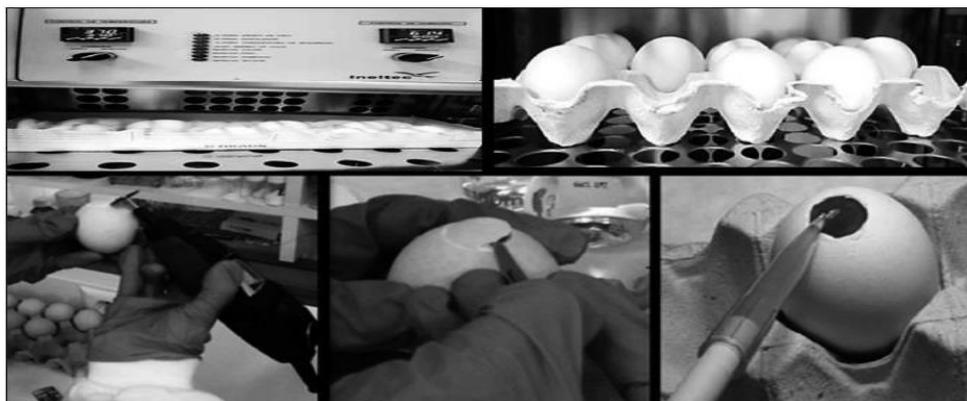
Ovos embrionados

Para a realização do teste, foram utilizados ovos embrionados de frango de corte recolhidos no primeiro dia da fertilização, adquiridos em uma granja localizada na zona rural da cidade de Santarém (Pará), com peso médio de 50 – 60 gramas, mantidos em incubadora a temperatura de $38,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 70%, durante 9 dias.

Delineamento experimental

Após o período de incubação, foi retirado a casca ao redor da câmara de ar, evidenciando a membrana interna umedecida com solução salina e retirada com bastante cuidado, para revelar a membrana cório-alantóide (Figura 6). Em seguida, foi aplicado 0,3 ml das formulações diretamente na CAM, observando as reações durante um período de 300s. O tempo para o aparecimento dos eventos (pontos finais) foram anotados, monitorados e registrados (filmado), em segundos (DA SILVA et al., 2021; FREIRE et al., 2015; ICCVAM, 2010).

Figura 6: Procedimento experimental em seqüência para desenvolvimento do método HET-CAM.



Fonte: FERNÁNDEZ-FERREIRO et al (2014).

Os seguintes grupos foram testados: NaCl 0,9% (controle negativo), propilenoglicol 1% (solvente); NaOH a 0,1 mol/L (controle positivo); 10 mg/ml do óleo essencial de *C. articulatus*; 10 mg/ml do extrato etanólico de rizomas de *C. articulatus* e 10 mg/ml do extrato etanólico proveniente do resíduo sólido de *C. articulatus*. Com o objetivo de garantir resultados reprodutíveis e com alta confiabilidade, utilizamos fotografias de referência para todos os pontos finais. Os três pontos finais a serem observados são hemorragia (sangramento dos vasos), lise vascular (desintegração do vaso sanguíneos) e a coagulação (desnaturação proteica intra e extravascular) (DA SILVA et al., 2021; DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017; FREIRE et al., 2015; ICCVAM, 2010).

A avaliação tem como base o surgimento de cada um dos três pontos de extremidade do HET-CAM em intervalos de tempo fixos de 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos. O tempo para lise, hemorragia e coagulação recebem uma pontuação específica de acordo com o tempo em que cada evento acontece (DA SILVA et al., 2021; DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017). Esta relação pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de pontuação para teste de irritação com o teste HET-CAM.

| Efeitos | Pontuação | | |
|------------|--------------|-------------|-------------|
| | 0,5min (30s) | 2min (120s) | 5min (300s) |
| Lise | 5 | 3 | 1 |
| Hemorragia | 7 | 5 | 3 |
| Coagulação | 9 | 7 | 5 |

Fonte: ICCVAM, 2010, DEROUICHE et al., 2017 (Adaptado)

Em seguida, as pontuações foram somadas obtendo um valor numérico único, evidenciando a capacidade de irritação da formulação testada em uma escala comum que varia de 0 a 21, demonstrada na Tabela 2 (ICCVAM, 2010). O teste foi realizado em triplicata e com os resultados obtidos, determinou-se uma média (entre 0 e 21), indicado às categorias irritantes e não-irritante (Tabela 2) (DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017).

Tabela 2. Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM.

| Faixa de pontuação | Categoria de irritação |
|--------------------|------------------------|
| 0 a 0,9 | Não rotulado |
| 1 a 4,9 | Ligeira irritação |
| 5 a 8,9 | Irritação moderada |
| 9 a 21 | Irritação grave |

Fonte: ICCVAM, 2010; DEROUICHE et al; 2017 (adaptado)

Toxicidade oral aguda *in vivo*

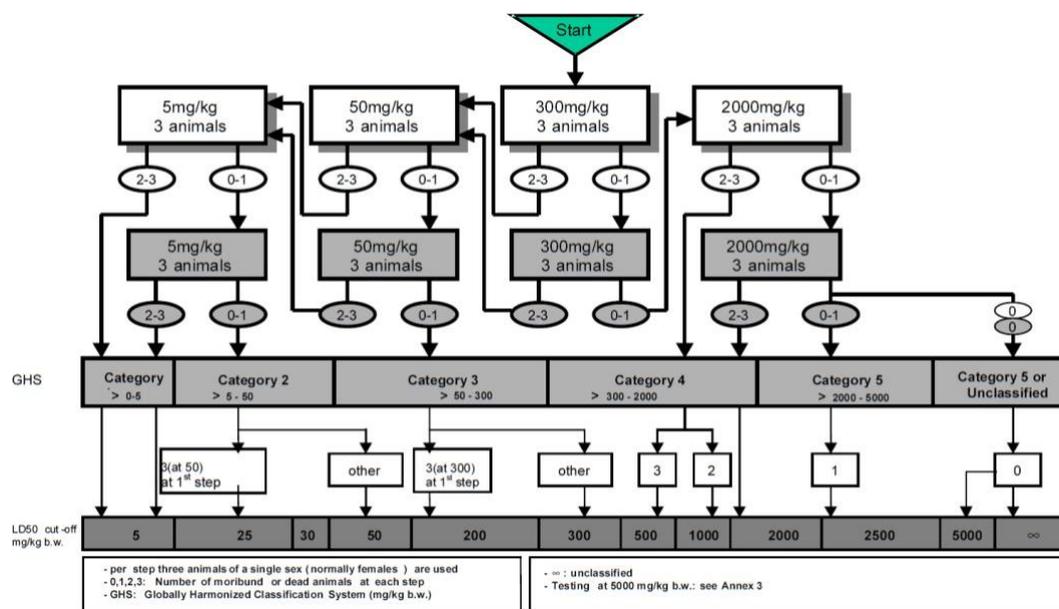
Para a condução deste teste foram utilizados 24 ratos *Wistar* (fêmeas) pesando em média 160 – 250g divididos em 4 grupos experimentais, totalizando 6 animais por grupo: G1- óleo essencial de priprioca; G2 – extrato etanólico dos rizomas íntegros de priprioca; G3 – extrato etanólico do resíduo sólido do mesmo vegetal e G4 – controle.

Os animais receberam o óleo essencial, extrato etanólico dos rizomas e do resíduo sólido de priprioca todos diluídos em solução salina 0,9% e propilenoglicol por via oral na dose de 2000 mg/Kg peso corpóreo. Os animais do grupo controle receberam somente solução salina com propilenoglicol.

O teste de toxicidade aguda seguiu as diretrizes da The Organization for Economic Co-operation and Development OECD-423/2001 (OECD, 2001), que consiste em ensaios para a classificação de toxicidade de substâncias em teste utilizando ratos, preferencialmente fêmeas devido sua maior sensibilidade em relação aos machos. Dependendo do número de mortalidade dos animais na primeira etapa, os testes deverão ser ou não dado continuidade, chegando a ser realizados 2 a 4 etapas posteriormente. O método é capaz de classificar as substâncias, semelhantes a outros métodos, como o método que estabelece a DL-50, e

se baseia na avaliação biométrica com doses fixas para a classificação e riscos no qual o indivíduo será submetido ao receber a substância em estudo (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma da Toxicidade Aguda



Fonte: OECD 2001

Esta metodologia consiste na administração do extrato diluído no trato digestório dos animais através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem). Após a administração da dose do extrato diluído, os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez a cada 30 minutos nas quatro primeiras horas, periodicamente durante as primeiras 24 horas, e diariamente a partir de então até um total de 14 dias. Os animais foram avaliados quanto a sua atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reflexo, contorção, ataxia, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte. Todos os animais foram pesados antes da administração, no 7º e 14º dia.

Teste de Irritação da Mucosa Oral (*in vivo*)

Este teste baseou-se na aplicação do produto diluído na mucosa oral de ratos através de seringa de insulina sem agulha (ISO, 2010; MARREIRO et al., 2021).

Foram realizadas 4 aplicações de óleo essencial, extrato etanólico

dos rizomas íntegros, extrato etanólico do resíduo sólido de piriococa na concentração de 2,34 mg/ml e propilenoglicol 1% com intervalo de 1 hora entre estas, num único dia. O produto (0,5 mL) foi aplicado na região de mucosa oral direita de cada animal por quatro vezes, com intervalo de 1 hora entre cada aplicação. Antes de cada aplicação, a mucosa de cada animal foi examinada macroscopicamente e as alterações ocorridas na mucosa foram registradas para o controle do ensaio. A observação de lesões severas nesse exame inviabiliza o prosseguimento do teste. Um grupo controle (N=4) permaneceu sem tratamento. Vinte quatro horas após o término do tratamento realizou-se a última leitura macroscópica e os animais foram então eutanasiados e amostras representativas da mucosa foram retiradas e fixadas em formalina a 10% e encaminhadas para exame histológico (ISO, 2010; MARREIRO et al., 2021).

Avaliação macroscópica

O exame macroscópico consiste na descrição da aparência das mucosas para cada animal e as reações da superfície da mucosa para eritema classificadas de acordo com o sistema dado na Tabela 3 para cada animal em cada intervalo de tempo e os resultados registrados para o relatório de teste.

As notas (Tabela 3) para cada observação foram somadas e a soma dividida pelo número de observações para determinar a nota média por animal.

Obs. 1 Essas observações podem auxiliar na avaliação histológica.

Obs. 2 As observações iniciais feitas antes da primeira aplicação do material de teste não são incluídas na nota.

Avaliação histológica

Os efeitos irritantes ocorridos na mucosa oral foram avaliados microscopicamente por um único patologista. O patologista classificou cada tecido de acordo com o sistema dado na Tabela 4.

Tabela 3: Sistema de classificação para reações orais.

| Reação | Graduação numérica |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Eritema e formação de escara | |

| | |
|-------------------------|---|
| Sem eritema | 0 |
| Eritema leve | 1 |
| Eritema bem definido | 2 |
| Eritema moderado | 3 |
| Eritema severo (escara) | 4 |

Fonte: International Organization for Standardization (ISO), 2010.

Tabela 4: Sistema de classificação para exame microscópico para reação tecidual oral.

| Reações | Graduação numérica |
|--------------------------------|---------------------------|
| Epitélio | |
| Normal, intacto | 0 |
| Degeneração celular | 1 |
| Metaplasia | 2 |
| Erosão Local | 3 |
| Erosão Generalizada | 4 |
| Infiltrado Leucocitário | |
| Ausente | 0 |
| Mínimo (menos que 25) | 1 |
| Médio (26 a 50) | 2 |
| Moderado (51 a 100) | 3 |
| Marcante (maior que 100) | 4 |
| Congestão vascular | |
| Ausente | 0 |
| Mínimo | 1 |
| Médio | 2 |
| Moderado | 3 |
| Marcante | 4 |
| Edema | |
| Ausente | 0 |
| Mínimo | 1 |
| Médio | 2 |
| Moderado | 3 |
| Marcante | 4 |

Fonte: International Organization for Standardization (ISO), 2010.

Os escores encontrados na avaliação microscópica de todos os animais foram somados e divididos pelo número de observações para se obter a média de cada grupo de animais (controle e teste). A pontuação máxima é 16. Uma pontuação total superior a nove para a avaliação microscópica na bolsa da bochecha de controle pode indicar patologia subjacente ou, em um animal de controle, pode indicar trauma na dosagem.

O índice de irritação (Ii) foi obtido subtraindo a média dos escores dos animais tratados pela média dos escores dos controles [Ii = (Média dos animais tratados) – (Média do controle)]. O teste da irritação da mucosa oral em ratos permite as seguintes classificações: não irritante (NI = 0,0 a

0,99), irritante mínimo (IMin = 1,0 a 4,99), irritante leve (IL = 5,0 a 8,99), irritante moderado (IM = 9,0 a 11,99) ou irritante severo (12,0 a 16,0) (Tabela 5).

Tabela 5: Índice de irritação.

| Média dos escores | Classificação |
|--------------------------|----------------------|
| 0 | Não irritante |
| 1 a 4 | Mínimo |
| 5 a 8 | Leve |
| 9 a 11 | Moderado |
| 12 a 16 | Severo |

Fonte: International Organization for Standardization (ISO), 2010.

6. RESULTADOS

6.1 Análise da composição química do óleo essencial de *prprioica*

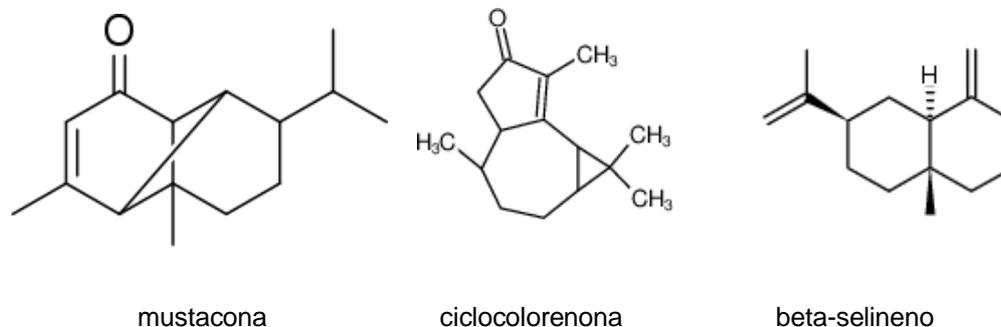
O rendimento do óleo essencial de *Cyperus articulatus* foi de 0,8%. A caracterização química por CG-MS levou à identificação de 27 compostos (Tabela 6). Os compostos majoritários encontrados no óleo foram: mustacona (14,08%), ciccolorenona (9,45%) e beta-selineno (9,20%) (Figura 8).

Tabela 6. Composição química do óleo essencial de *Cyperus articulatus* de Santarém (Estado do Pará, Brasil) por CG-MS

| t_R (min) | IR | Identificação | % rel. |
|----------------------------|-----------|-----------------------|---------------|
| 5,65 | 934 | alfa-pineno | 2,93 |
| 6,18 | 954 | tuja-2,4(10)-dieno | 0,79 |
| 6,81 | 977 | beta-pineno | 1,64 |
| 8,27 | 1025 | para-cimeno | 0,43 |
| 12,44 | 1137 | nopinona | 0,75 |
| 12,52 | 1139 | trans-pinocarveol | 4,26 |
| 13,47 | 1163 | pinocarvona | 0,61 |
| 13,66 | 1167 | alfa-felandren-8-ol | 1,72 |
| 14,07 | 1178 | 4-terpineol | 0,55 |
| 14,64 | 1192 | alfa-terpineol | 0,74 |
| 14,87 | 1197 | mirtenol | 5,09 |
| 15,40 | 1210 | verbenona | 6,58 |
| 22,00 | 1367 | ciclosativeno | 0,80 |
| 22,37 | 1376 | alfa-copaeno | 7,90 |
| 23,33 | 1399 | cipereno | 4,57 |
| 25,72 | 1458 | rotundeno | 2,20 |
| 26,47 | 1477 | gama-muuroleno | 1,70 |
| 26,85 | 1486 | beta-selineno | 9,20 |
| 28,31 | 1524 | trans-calameneno | 1,12 |
| 29,07 | 1543 | alfa-calacoreno | 1,93 |
| 30,61 | 1583 | óxido de cariofileno | 8,17 |
| 30,94 | 1592 | beta-copaen-4-alfa-ol | 1,63 |
| 31,59 | 1609 | humuleno epóxido II | 1,90 |
| 34,17 | 1679 | mustacona | 14,08 |
| 34,73 | 1694 | ciperotundona | 3,51 |
| 35,28 | 1709 | cis-tujopsenal | 5,75 |
| 36,70 | 1750 | ciccolorenona | 9,45 |
| Total (%) | | | 100 |

tr=tempo de retenção; ir= índice de retenção; % rel = porcentagem relativa (em relação ao composto total encontrado na análise CG-MS).

Figura 8. Principais compostos voláteis presentes no óleo essencial de *C. articulatus*



6.2 Análise da composição química do extrato dos rizomas íntegros de priproica

O extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus* renderam 13%. A análise da composição química do extrato etanólico destes rizomas de *C. articulatus* realizada através Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), revelou a presença de 43 compostos, sendo a mustacona o composto que aparece em maior porcentagem (11,36%), seguido do gurjuneno (9,32%) (Tabela 7) (Figura 9).

Tabela 7: Composição química do extrato etanólico dos rizomas íntegros de *Cyperus articulatus* de Santarém (Estado do Pará, Brasil) por CG-MS

| Constituintes | TR | % |
|-----------------------------|-------|------|
| (E)-Pinocarveol | 12.02 | 0.17 |
| Verbenol | 12.29 | 0.42 |
| (1R)-(-)-Myrtenal | 14.22 | 0.11 |
| Myrtenol | 14.44 | 0.27 |
| Verbenone | 14.77 | 0.40 |
| alpha-copaene | 21.64 | 0.13 |
| Cyperene | 22.57 | 0.12 |
| Cyperadiene | 22.86 | 0.71 |
| alpha.-Guaiene | 26.11 | 0.53 |
| trans-Calamenene | 27.62 | 0.17 |
| 9,10-dehydro-Isolongifolene | 28.06 | 0.20 |
| alpha-calacorene | 28.39 | 1.03 |
| Caryophyllene oxide | 29.90 | 2.34 |
| Ledene oxide-(II) | 30.18 | 1.29 |
| Calarene epoxide | 31.18 | 0.25 |
| β-Atlantol | 31.36 | 0.78 |
| Tumerone | 31.65 | 0.93 |
| Valencene | 32.17 | 0.33 |
| Pogostol | 32.68 | 2.30 |
| β-Selinene | 32.79 | 1.71 |

| | | |
|------------------------------------|-------|--------------|
| 9-epi-(E)-Caryophyllene | 32.89 | 1.54 |
| Alloaromadendrene | 33.08 | 0.18 |
| Cedrol | 33.19 | 0.59 |
| Isogermacrene D | 33.29 | 1.09 |
| Mustakone | 33.50 | 11.36 |
| Isoaromadendrene epoxide | 33.75 | 2.94 |
| Cyperotundone | 34.04 | 6.84 |
| Eremophilene | 34.91 | 1.02 |
| (-)-Spathulenol | 35.05 | 0.96 |
| Myristic acid | 35.22 | 1.51 |
| Gurjunene | 36.06 | 9.32 |
| Premnaspirodiene | 36.31 | 0.44 |
| cis-Z-.alpha.-Bisabolene epoxide | 36.41 | 0.52 |
| Anhydro-.beta.-rotunol | 36.80 | 1.91 |
| 2-epi-(E)- β -Caryophyllene | 36.99 | 1.50 |
| Thujopsenal | 37.41 | 0.23 |
| trans-Z-.alpha.-Bisabolene epoxide | 38.03 | 0.65 |
| Cyperadione | 38.90 | 0.39 |
| Corymbolone | 40.84 | 3.94 |
| Palmitic acid | 42.05 | 4.75 |
| Linoleic acid | 47.27 | 2.43 |
| Oleic acid | 47.47 | 6.71 |
| Stearic acid | 48.28 | 1.24 |
| Oxygenated monoterpenes | | 1.36 |
| Sesquiterpene hydrocarbons | | 18.99 |
| Oxygenated sesquiterpenes | | 39.23 |
| Fat acids | | 16.63 |
| Others unidentified | | 20.11 |
| Total (%) | | 96.32 |

TR: tempo de retenção por minuto; %: porcentagem relativa (em relação ao composto total encontrado na análise CG-MS).

6.3 Análise da composição química do extrato do resíduo sólido de priprioca

O extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus* renderam 21% em extratos. A análise da composição química do extrato etanólico deste resíduo sólido realizada através Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), revelou a presença de oito componentes majoritários. Sendo o ácido oleico o composto que aparece em maior porcentagem, seguido da mustacona em concentrações próximas (18,26% e 17,38% respectivamente) (Tabela 8) (Figura 9).

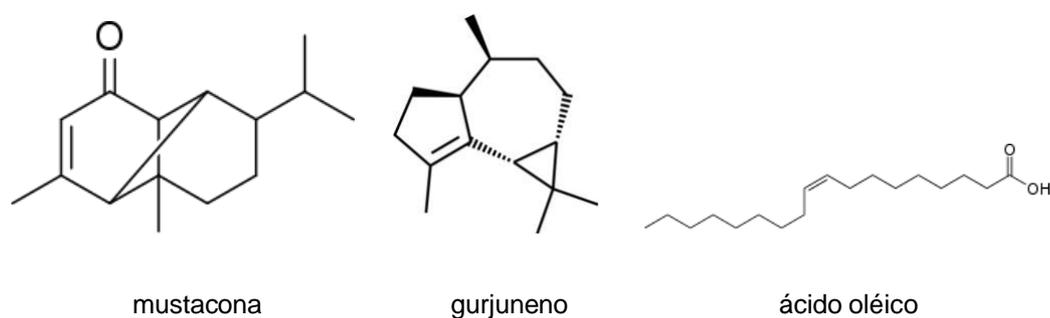
Tabela 8: Composição química do extrato etanólico do resíduo sólido de *Cyperus articulatus* de Santarém (Estado do Pará, Brasil) por CG-MS

| Constituintes | TR | % |
|-----------------|-------|-------|
| Citronellal | 12.47 | 3.69 |
| Mustakone | 33.47 | 17.38 |
| Rotundone | 34.60 | 6.63 |
| Dehydrofukinone | 36.03 | 15.31 |
| Corymbolone | 40.82 | 14.27 |

| | | |
|---------------------------|-------|--------------|
| Palmitic acid | 42.05 | 11.04 |
| Oleic acid | 47.47 | 18.26 |
| Stearic acid | 48.28 | 4.28 |
| Oxygenated monoterpenes | | 3.69 |
| Oxygenated sesquiterpenes | | 53.59 |
| Fat acids | | 33.58 |
| Others unidentified | | 6.41 |
| Total (%) | | 97.27 |

TR: tempo de retenção por minuto; %: porcentagem relativa (em relação ao composto total encontrado na análise GC-MS).

Figura 9. Principais compostos voláteis presentes nos extratos etanólico dos rizomas íntegros e resíduo sólido de *C. articulatus*.



6.4 Avaliação antimicrobiana - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Tanto óleo essencial, quanto os extratos de *Cyperus articulatus*, assim como a clorexidina, apresentaram atividade antimicrobiana frente ao microorganismo testado. Porém, quando comparamos os extratos, observamos que o extrato etanólico dos rizomas de *C. articulatus* foi capaz de inibir o crescimento de *S. mutans* em menor concentração (CIM=0,29 mg/ml) do que o extrato etanólico do resíduo sólido (CIM=2,34mg/ml). Já o valor de CIM para o óleo essencial (0,46 mg/ml) foi menor quando comparado ao valor de CIM do extrato etanólico do resíduo e maior quando comparado ao do extrato etanólico dos rizomas de pirioca (tabela 9).

Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima em mg/ml do óleo essencial de *C. articulatus*, do extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus* e do extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus* e gluconato de clorexidina frente a bactéria *S. mutans*.

| | Extr EtOH <i>C. articulatus</i> resíduo | OE <i>C. articulatus</i> | Extr EtOH <i>C. articulatus</i> | Clorexidina |
|--|--|-------------------------------------|--|--------------------|
| | CIM (mg/ml) | CIM (mg/ml) | CIM (mg/ml) | CIM (mg/ml) |
| <i>S. mutans</i> ATCC 25175 | 2,34 | 0,46 | 0,29 | 0,004 |

OE *C. articulatus*: óleo essencial de *C. articulatus*; Extr EtOH *C. articulatus* – resíduo: extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus*; Extr EtOH *C. articulatus*: extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus*; CIM: Concentração Inibitória Mínima expressa em mg/ml. Concentração inicial testada para óleo 15 mg/ml e ambos os extratos 150mg/ml e para clorexidina 0,6mg/ml.

6.5 Avaliação da Citotoxicidade – MTT

A análise de viabilidade resultou em diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, em cada um dos tempos de avaliação, exceto para as diluições 1:2 (tempo de 1 dia), diluição 1:4 (tempos de 1 e 3 dias), diluição 1:8 (tempo de 1 dia) e diluição 1:16 (tempos de 1 dia e 7 dias) ($p > 0,05$) (Tabela 10).

No tempo de 1 dia a viabilidade celular dos grupos G1 e G3 foram similares à do controle na concentração inicial (4,68 mg/ml) do composto estudado (Tabela 10; figura 10).

No tempo de 3 dias, na concentração inicial, todos os grupos foram similares e diferentes do controle; na diluição 1:2 os G1 e G2 diferiram do grupo controle e nas diluições 1:8 e 1:16 o G3 diferiu do controle (Tabela 10; figura 11).

No tempo de 7 dias, na concentração inicial e na diluição 1:2, todos os grupos foram similares e diferentes do controle; na diluição 1:4 o G3 foi diferente do controle e na diluição 1:8 os G2 e G3 foram similares e diferentes do controle (Tabela 10; figura 12).

Tabela 10. Valores de média (desvio-padrão) e comparação entre os grupos experimentais para a viabilidade celular nos diferentes tempos de avaliação do estudo.

| Diluição | Grupo | 1 dia | 3 dias | 7 dias | P* |
|------------------------------------|----------|---------------------|------------------|---------------------|--------|
| 1 (4,68 mg/ml) | Controle | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,000 |
| | G1 | 1,69 (0,51) A,a | 0,43 (0,20) B,b | 0,12 (0,03) B,b | 0,002 |
| | G2 | 0,32 (0,09) B,a | 0,20 (0,02) B,a | 0,08 (0,01) B,b | 0,005 |
| | G3 | 1,02 (0,07) AB,a | 0,54 (0,01) B,b | 0,10 (0,03) B,c | <0,001 |
| | P* | 0,009 | 0,002 | <0,001 | |
| 1:2 (2,34 mg/ml) | Controle | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,000 |
| | G1 | 0,94 (0,55) A,a | 0,81 (0,05) B,a | 0,12 (0,05) B,b | 0,042 |
| | G2 | 1,45 (0,19) A,a | 0,49 (0,12) B,b | 0,09 (0,02) B,c | <0,001 |
| | G3 | 1,05 (0,09) A,a | 0,88 (0,16) AB,a | 0,08 (0,00) B,b | <0,001 |
| | P* | 0,233 | 0,013 | <0,001 | |
| 1:4 (1,17 mg/ml) | Controle | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,000 |
| | G1 | 1,85 (0,14) A,a | 1,24 (0,23) A,a | 1,41 (0,98) AB,a | 0,474 |
| | G2 | 1,01 (0,48) A,a | 1,17 (0,23) A,a | 1,23 (0,18) AB,a | 0,699 |
| | G3 | 1,02 (0,12) A,a | 1,05 (0,23) A,a | 0,07 (0,01) B,b | <0,001 |
| | P* | 0,068 | 0,312 | 0,045 | |
| 1:8 (0,58 mg/ml) | Controle | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,000 |
| | G1 | 1,70 (0,26) A,a | 1,64 (0,37) A,a | 1,87 (0,73) A,a | 0,842 |
| | G2 | 2,24 (0,10) A,a | 1,87 (0,18) A,b | 0,09 (0,00) B,c | <0,001 |
| | G3 | 1,37 (0,16) A,a | 0,63 (0,27) B,b | 0,11 (0,05) B,c | 0,001 |
| | P* | 0,070 | 0,018 | 0,002 | |
| 1:16 (0,29 mg/ml) | Controle | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,62 (0,58) A,a | 1,000 |
| | G1 | 1,57 (0,33) A,a | 1,57 (0,10) A,a | 0,78 (0,77) A,a | 0,159 |
| | G2 | 1,15 (0,08) A,a | 1,80 (0,13) A,a | 1,43 (0,68) A,a | 0,225 |
| | G3 | 1,59 (0,26) A,a | 0,25 (0,06) B,b | 0,33 (0,35) A,b | 0,001 |
| | P* | 0,400 | 0,001 | 0,115 | |

Controle = Meio de cultura; G1 = Óleo essencial de *C. articulatus*; G2 = Extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus*; G3 = Extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus*. * Teste ANOVA One-way, com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (Comparação na coluna. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente

significante entre os grupos). ** Teste ANOVA One-way com medidas repetidas, com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (Comparação na linha. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos). Nível de significância = 5%.

Figura 10. Distribuição gráfica e comparação dos grupos para os percentuais de viabilidade celular, nas diferentes diluições do estudo, no tempo de 1 dia.

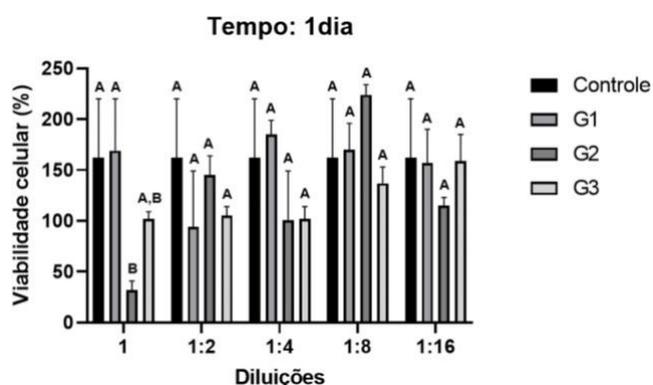


Figura 11. Distribuição gráfica e comparação dos grupos para os percentuais de viabilidade celular, nas diferentes diluições do estudo, no tempo de 3 dias.

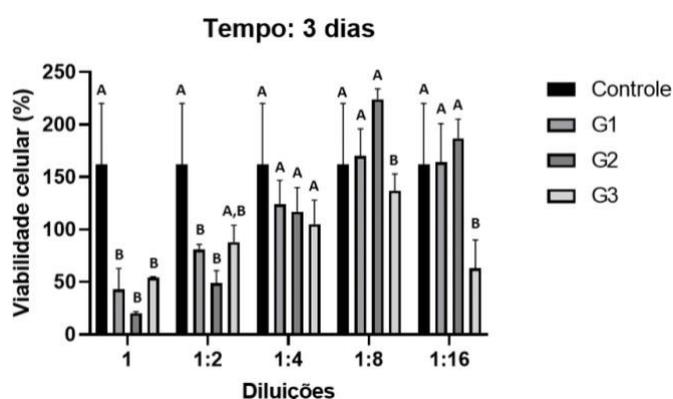
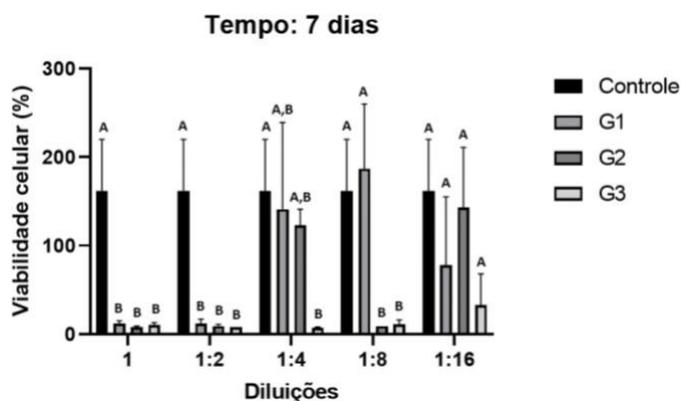


Figura 12. Distribuição gráfica e comparação dos grupos para os percentuais de viabilidade celular, nas diferentes diluições do estudo, no tempo de 7 dias.



6.6 Avaliação irritação/corrosão ocular aguda – HET-CAM

As substâncias testes analisadas, incluindo o óleo essencial, extrato etanólico dos rizomas íntegros, o extrato etanólico de resíduo sólido de *C. articulatus* e o propilenoglicol 1%, demonstraram ausência de alterações vasculares na membrana corioalantóide. Isso representa as primeiras alterações associadas à irritação da pele e mucosas e contrasta com o controle negativo de NaCl 0,9%. Conseqüentemente, essas substâncias, óleo, extratos e solvente, não demonstraram potencial irritante ou toxicidade e receberam índice de irritação "não marcado" (IS = 0), sem diferença estatística em relação ao grupo controle (Na Cl 0,9%). Já o hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L foi classificado como "Irritação grave" devido ao aparecimento dos três desfechos (lise, hemorragia e coagulação) após seu contato com a membrana corioalantóide de ovos de galinha embrionados, obtendo-se índice de irritação de 17,67, com diferença estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,0001$) (Tabela 11).

Tabela 11. Índice e classificação de irritação no teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET – CAM).

| Tratamento | IS (\pm Erro Padrão) | Classificação |
|---|-------------------------|-----------------|
| (NaOH) a 0,1 mol/L (controle positivo) | 17,67 (\pm 1,44)**** | Irritação grave |
| NaCl 0,9% (controle negativo) | 0 (\pm 0,0) | Ñ rotulado |
| Propilenoglicol 1% | 0 (\pm 0,0) | Ñ rotulado |
| OE <i>C. articulatus</i> (10 mg/ml) | 0 (\pm 0,0) | Ñ rotulado |
| Extr EtOH <i>C. articulatus</i> (10 mg/ml) | 0 (\pm 0,0) | Ñ rotulado |
| Extr EtOH <i>C. articulatus</i> - resíduo (10 mg/ml) | 0 (\pm 0,0) | Ñ rotulado |

OE *C. articulatus* (óleo essencial de *C. articulatus*); Ext EtOh *C. articulatus* (extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus*); Ext EtOh *C. articulatus* – resíduo (extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus*); IS (índice de irritação); **** Diferença estatística apresentada quando comparada com o grupo controle NaCl 0,9% ($p \leq 0,0001$). Resultados expressos em média (\pm erro padrão da média).

6.7 Avaliação da toxicidade oral aguda

No teste de toxicidade oral aguda, nenhum dos três animais expostos do grupo apresentaram alguma das alterações de intoxicação ou

mortalidade indicadas pelo protocolo OECD 423 (OECD, 2001) nas primeiras 4 h, somente sinais de sonolência nos grupos submetidos a administração do óleo essencial, extrato etanólico dos rizomas íntegros e do resíduo sólido de *priprioca*.

Quanto as observações durante os 14 dias experimentais, no acompanhamento da massa corporal quando aplicado o teste ANOVA não foram observadas diferenças significativas (Tabela 12), assim como não foram registrados nenhuma alteração clínica e nem mortalidade norteados pelo teste, ficando os animais ativos e saudáveis.

Por conseguinte, os experimentos foram repetidos a fim de confirmação do resultado anterior, com 3 animais por grupo, ratificando o resultado (Tabela 13).

Tabela 12. Teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas \pm Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (salina 0,9% e propilenoglicol) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.

| Teste 1 | | | |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Dia 0 | 7 dias | 14 dias |
| Controle | 189,00 \pm 26,51 | 194,33 \pm 27,30 | 200,67 \pm 25,42 |
| (propilenoglicol) | n=3 | n=3 | n=3 |
| OE <i>C. articulatus</i> | 178,00 \pm 31,18 | 193,00 \pm 21,63 | 202,33 \pm 22,59 |
| 2000 mg/ml | n=3 | n=3 | n=3 |
| Extr EtOH | 157,67 \pm 25,81 | 197,67 \pm 24,85 | 206,00 \pm 15,59 |
| <i>C. articulatus</i> | n=3 | n=3 | n=3 |
| 2000 mg/kg | | | |
| Extr EtOH | 198,00 \pm 19,97 | 226,00 \pm 7,07 | 241,50 \pm 9,19 |
| <i>C. articulatus</i> resíduo | n=3 | n=3 | n=3 |
| 2000mg/ml | | | |

OE *C. articulatus* (óleo essencial de *C. articulatus*); Ext EtOh *C. articulatus* (extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus*); Ext EtOh *C. articulatus* – resíduo (extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus*)

Tabela 13. Repetição do teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas \pm Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e propilenoglicol) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.

Teste 2

| | Dia 0 | 7 dias | 14 dias |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Controle | 202,00 ± 27,87 | 212,33 ± 26,50 | 214,67 ± 25,93 |
| (propilenoglicol) | n=3 | n=3 | n=3 |
| OE <i>C. articulatus</i> | 231,67 ± 17,39 | 234,67 ± 18,58 | 250,00 ± 20,78 |
| 2000 mg/ml | n=3 | n=3 | n=3 |
| Extr EtOH | 189,67 ± 2,89 | 211,67 ± 5,51 | 214,67 ± 3,06 |
| <i>C. articulatus</i> | n=3 | n=3 | n=3 |
| 2000 mg/kg | | | |
| Extr EtOH | 202,00 ± 27,87 | 212,33 ± 26,50 | 214,67 ± 25,93 |
| <i>C. articulatus</i> resíduo | n=3 | n=3 | n=3 |
| 2000mg/ml | | | |

OE *C. articulatus* (óleo essencial de *C. articulatus*); Ext EtOH *C. articulatus* (extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus*); Ext EtOH *C. articulatus* – resíduo (extrato etanólico do resíduo sólido de *C. articulatus*)

6.8 Avaliação da irritação da mucosa oral

No sistema de avaliação para alteração macroscópica da mucosa oral dos ratos, todas as substâncias testadas obtiveram classificação 0 (sem eritema). No entanto, 24 horas após a última aplicação do propilenoglicol a 1% na mucosa oral dos ratos 2 e 3 pertencentes a este grupo, pudemos observar a presença de um eritema leve/bem definido, de classificação 2. A mesma alteração macroscópica também pôde ser observada no rato 4 pertencente ao grupo do extrato etanólico do resíduo sólido de *prurioca* (2,34 mg/ml).

Tabela 14: Escores das reações teciduais orais ocorridos após aplicação das substâncias testes na mucosa oral de ratos e classificação destas quanto ao grau de irritação após avaliação histológica.

| Tratamento | ratos | Epi | Infiltrado | Congest. | Edema | Média | Classificação |
|---------------------------|-------|-----|------------|----------|-------|-------|---------------|
| | | | Leuco | vascular | | | |
| Controle (sem tratamento) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ñ irritante |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

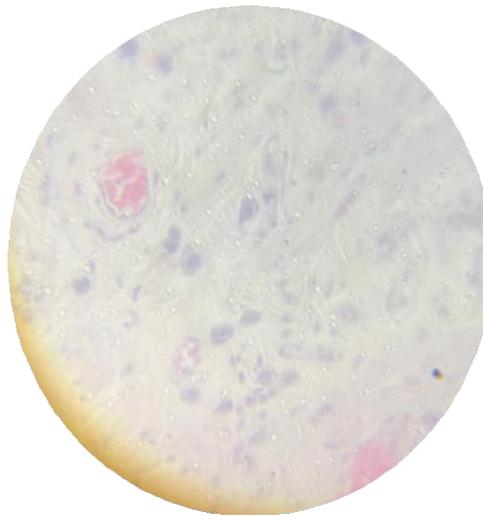
| | | | | | | | |
|--------------------|---|---|---|---|---|------|-------------|
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Prop. 1% | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,25 | Mínimo |
| | 3 | 0 | 1 | 2 | 0 | | |
| | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | | |
| OE C. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| <i>articulatus</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ñ irritante |
| (2,34 mg/ml) | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Extr EtOH C. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| <i>articulatus</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ñ irritante |
| (2,34 mg/ml) | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Extr EtOH C. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| <i>articulatus</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| resíduo | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | Ñ irritante |
| (2,34 mg/ml) | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

Tratamentos: Controle = animais que permaneceram sem tratamento; Prop. 1% = propilenoglicol a 1%; OE C. *articulatus* = óleo essencial de *C. articulatus* na concentração de 2,34 mg/ml; Extr EtOH C. *articulatus* = extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus* na concentração de 2,34 mg/ml; Extr EtOH C. *articulatus* resíduo = extrato etanólico do resíduo sólido de *prurioca* na concentração de 2,34 mg/ml. Reações teciduais: Epi = epitélio; Congest. vascular = congestão vascular.

Na avaliação microscópica do corte histológico da mucosa oral do rato 3 após aplicação de propilenoglicol 1%, fenômenos epiteliais como infiltrado leucocitário grau 1 e congestão vascular grau 2 puderam ser encontrados (Figuras 13 e 14). Da mesma forma, o corte histológico da mucosa oral do rato 4 após aplicação da mesma substância apresentou

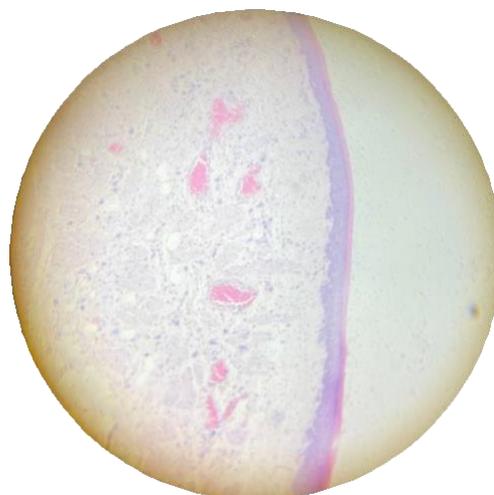
congestão vascular grau 2 (Figura 15). Classificando-o como uma substância com capacidade de irritação mínima. Em contrapartida nenhuma alteração foi evidenciada nos cortes histológicos da mucosa oral pertencente aos grupos: controle, óleo essencial e extratos etanólico dos rizomas íntegros e do resíduo sólido de *C. articulatus*.

Figura13: Corte histológico da mucosa oral do rato 3 evidenciando infiltrado leucocitário grau 1 após aplicação de propilenoglicol 1% (aumento 40X).



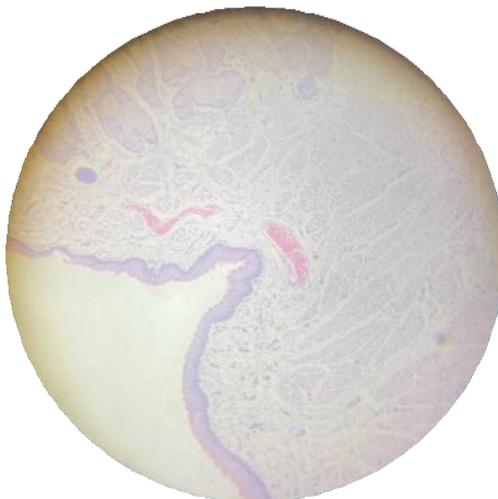
Fonte: Arquivos pessoais da autora.

Figura 14: Corte histológico da mucosa oral do rato 3 evidenciando congestão vascular grau 2 após aplicação de propilenoglicol 1% (aumento 10X).



Fonte: Arquivos pessoais da autora.

Figura 15: Corte histológico da mucosa oral do rato 4 evidenciando congestão vascular grau 2 após aplicação de propilenoglicol 1% (aumento 10X).



Fonte: Arquivos pessoais da autora.

O óleo essencial de pripioca a 2,34mg/ml e os extratos etanólicos dos rizomas e do resíduo de pripioca a 2,34 mg/ml foram classificados como não irritante ao exame microscópico dos cortes histológicos pois não foi observado nenhum fenômeno epitelial após aplicação destes produtos na mucosa oral de ratos.

7. DISCUSSÃO

A partir de escassas informações etnofarmacológicas de *C. articulatus* para doenças orais, avaliamos a atividade antimicrobiana do óleo essencial e de extratos etanólicos obtidos a partir dos rizomas e do resíduo sólido desta planta cultivada no município de Santarém- PA sobre o principal microorganismo relacionada ao desenvolvimento de cárie dental. A caracterização química, juntamente com a avaliação da atividade antimicrobiana e sua toxicidade, visa contribuir com o saber tradicional e corroborar com o estudo de suas propriedades farmacológicas (BERSAN et al., 2014; KASPER et al., 2018a; KASPER et al., 2018b; SILVA et al., 2019; SILVA et al., 2021).

Os rizomas são a matéria prima vegetal utilizada para extração do óleo essencial de pirioca, que possui alto valor comercial e desperta interesse econômico, principalmente para o setor de perfumaria (ROCHA, 2008; ZOGHBI et al., 2008). O odor agradável do óleo essencial dos rizomas de pirioca é recorrente da complexa composição química dos metabólitos secundários da espécie (ZOGHBI et al., 2008). Autores demonstraram diversas propriedades terapêuticas do óleo essencial de pirioca, tais como a atividade antimicrobiana (DESMACHELIER et al., 1996; KASPER et al., 2018a; OLADOSU et al., 2011); anticonvulsivante (NGO BUM et al., 2001), antiparasitária (METUGE et al., 2014), antioxidante, antiinflamatória (BEZERRA et al., 2022) e ação efetiva bactericida / fungicida contra microrganismos orais (GALVÃO et al., 2012), com capacidade de controlar a formação de biofilme (BERSAN et al., 2014).

O óleo essencial de *Cyperus articulatus* neste estudo, apresentou um rendimento de 0,8% e por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) - técnica de separação das substâncias de uma amostra por meio de sua distribuição ao longo da fase estacionária (sólida ou líquida) e móvel (gasosa), sendo muito utilizada para gases ou substâncias voláteis - revelou como compostos majoritários a mustacona, ciclocolorenona, beta-selineno, óxido de cariofileno e alfa-copaeno, onde a mustacona foi encontrada em porcentagem superior

(14,08%) quando comparada aos outros compostos, resultados que corroboram com estudos anteriores (KASPER et al., 2018b; MACHADO et al., 2020; SILVA et al., 2019; ZOGHBI et al., 2006). Pesquisas têm relatado a atividade biológica deste sesquiterpeno, como atividade antimalárica e atividade antioncocercose (METUGE et al., 2014; RUKUNGA et al., 2008). É importante ressaltar que a mustacona é o principal composto sesquiterpênico presente no óleo essencial de *C. articulatus* e esta molécula é o marcador biológico desta espécie vegetal (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). No entanto, existem fatores que modificam a composição química das plantas, tanto em relação ao conteúdo dos compostos químicos, quanto à sua presença ou ausência; dentre estes podemos citar: fatores genéticos, climáticos, edáficos, estágio de desenvolvimento, indução por estímulos mecânicos, ataque por patógenos, entre outros. Da mesma forma, o tipo de solvente e/ou método de extração utilizados afetam diretamente o rendimento e o conteúdo dos metabólitos presentes, o que pode interferir nas atividades biológicas e farmacológicas do produto testado (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HERZI et al., 2013).

Priprioica produz um baixo teor de óleo essencial de aproximadamente 0,45%. O processamento associado à extração de óleo essencial resulta em um volume substancial de resíduos vegetais que muitas vezes não são utilizados (KASPER et al., 2020). Pesquisas preliminares sugerem que esse resíduo sólido de priprioica contém compostos bioativos com propriedades antifúngicas e potenciais efeitos anticancerígenos (KASPER et al., 2020; SILVA et al., 2021). Portanto, paralelamente à avaliação das matérias-primas da planta (rizomas), também examinamos o extrato etanólico obtido a partir dos resíduos sólidos gerados após a extração do óleo essencial de *C. articulatus*.

Nossos resultados da análise química dos compostos voláteis em extratos de *C. articulatus* estão alinhados com investigações anteriores. A corimbolona e a mustacona foram relatados anteriormente como sesquiterpenos primários presentes tanto no rizoma quanto nos extratos de resíduos sólidos derivados de *C. articulatus* (METUGE et al., 2014; SILVA et al., 2021; RUKUNGA et al., 2008). Além disso, descobriu-se que a

ciperotundona, previamente detectada no extrato etanólico dos resíduos sólidos de *C. articulatus* (SILVA et al., 2021), é um importante constituinte do extrato etanólico derivado dos rizomas de *C. articulatus* (ZOGHBI et al., 2006). O ácido oleico foi encontrado neste estudo como o principal constituinte do extrato etanólico obtido dos resíduos sólidos, e também foi identificado em uma concentração mais baixa em um estudo semelhante (ASSIS et al., 2020).

Estudos anteriores detectaram corimbolona como principal composto encontrado no extrato etanólico de resíduos sólidos de *C. articulatus* cultivada em Santarém, PA (14,25%) (ASSIS et al., 2020). Este composto também esteve presente em quantidades relativamente menores no extrato etanólico do rizoma utilizado neste estudo (3,94%).

O óleo essencial de *C. articulatus* de Campinas-SP apresentou presença de verbenol, mirtenal, mirtenol, verbenona e e-pinocarveol, nas concentrações de 2,10%, 8,16%, 4,61%, 19,57% e 17,44%, respectivamente (DUARTE et al., 2005). Como esperado, esses compostos também foram encontrados em concentrações relativas mais baixas no óleo essencial e extrato etanólico dos rizomas de *C. articulatus*, utilizados neste estudo. Da mesma forma, os compostos alfa-copaeno (2,2–3,3%), cipereno (1,8–4,3%), ciperadieno (0,3%), trans-calameneno (0,5–0,8%), óxido de cariofileno (4,6–10,8%), isogermacreno D (0,9–1%) e mustakone (9,8–14,5%) identificados no óleo essencial de *C. articulatus* cultivado em áreas fluviais e costeiras do estado do Pará em pesquisas anteriores (ZOGHBI et al., 2008) também foram encontrados no óleo essencial e extrato etanólico do rizoma de *C. articulatus* neste estudo.

Nossos resultados estão de acordo com pesquisas anteriores, nas quais o óleo de *C. articulatus* analisado por GC-MS mostrou a presença de alfa-guaieno, β -selineno (BERSAN et al., 2014), alfa-calacoreno, po-gostol, ciperotundona, espatulenol e tujopsenal (SILVA et al., 2019). Estes compostos também foram encontrados como constituintes do óleo essencial e extrato etanólico do rizoma de *C. articulatus* neste estudo.

Nossa pesquisa é um dos primeiros relatos a investigar o efeito antimicrobiano dos extratos de *C. articulatus* contra bactérias orais. A força da atividade antimicrobiana de um material vegetal pode ser determinada

com base nos valores da CIM, que corresponde à concentração mais baixa de um antibiótico necessária para inibir o crescimento de um microrganismo específico, essencial para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas eficazes (DUARTE et al., 2005). Quando os valores de CIM são de até 0,5 mg/mL, a atividade antimicrobiana é considerada forte, enquanto valores entre 0,6; 1,5 mg/mL indicam atividade moderada e acima de 1,6 mg/ml atividade fraca (DUARTE et al., 2005; FERREIRA et al., 2018b). Assim, tanto o óleo essencial, extrato etanólico dos rizomas de *C. articulatus* quanto a clorexidina (controle positivo) demonstraram forte atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, com valores de CIM abaixo de 0,5 mg/mL e extrato etanólico do resíduo atividade fraca com valor de CIM maior que 1,6 mg/ml. Resultado que corrobora com estudo anterior no qual o óleo essencial de *C. articulatus* cultivado na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil, mostrou forte atividade contra *S. mutans* com valor de CIM menor 0,5 mg/mL, demonstrando que o óleo essencial estudado possui potencial para bioprospecção de biomoléculas ativas, podendo ser usadas como uma forma alternativa ou adjuvante no tratamento ou prevenção da doença cárie (GALVÃO et al., 2012).

Em outro estudo, óleos essenciais obtidos de vinte plantas aromáticas e medicinais brasileiras foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana sobre os patógenos orais *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*. A maioria dos óleos essenciais apresentou atividade antimicrobiana moderada a forte contra estes microrganismos com valores de CIM entre 0,007 e 1 mg/ml. Entretanto, o óleo de *C. articulatus* apresentou os melhores resultados, com valores de CIM entre 0,25 e 0,50 mg/ml e maior capacidade de controlar a formação de biofilme, inibindo 63,96% da formação de biofilme de *S. sanguis*. A análise química do óleo essencial de *C. articulatus* identificou a presença dos sesquiterpenos mustaona e α - copaeno, e do monoterpeneo trans-pinocarveol como componentes majoritários (BERSAN et al., 2014). Os autores associaram a atividade antimicrobiana a possíveis mecanismos de ação apresentado pelos componentes químicos também presentes na composição do óleo, α

e β - pineno, que mostraram ser capazes de destruir a integridade celular, além de inibir a respiração e os processos de transporte de íons, levando à morte celular (BERSAN et al., 2014; FREIRES et al., 2015). Substâncias estas também identificadas na composição química do óleo essencial de *C. articulatus* utilizado neste estudo.

Estudos preliminares avaliando o extrato de *C. articulatus* também identificaram altas concentrações de corimbolona e mustakone e demonstraram atividade antiplasmodial in vitro dessas substâncias (ASSIS et al., 2020; RUKUNGA et al., 2008). Da mesma forma, o ácido linoléico – composto identificado no extrato etanólico de rizomas de *C. articulatus* – foi isolado e associado à morte de vermes e microfilárias do parasita bovino *Onchocerca ochengi* (METUGE et al., 2014).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não é totalmente compreendida, mas acredita-se que seja devida à complexa mistura de componentes dos óleos, e não ao resultado da influência de um único produto químico. Foi sugerido que a combinação de componentes dos óleos essenciais tem uma relação sinérgica ou antagônica, o que pode causar diferenças em suas propriedades antimicrobianas (YANG et al., 2023). Assim, o mecanismo de ação antimicrobiana do óleo essencial e do extrato etanólico dos rizomas de *C. articulatus* testados neste estudo sobre *S. mutans* pode estar relacionado ao sinergismo desses compostos químicos.

Apesar da ampla utilização com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, pesquisas mostram que muitas plantas medicinais possuem substâncias agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas respeitando os riscos toxicológicos (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Dessa forma, para determinar a toxicidade do óleo essencial e dos extratos etanólicos de *prurioca* foram utilizados testes de citotoxicidade, irritação e toxicidade aguda que apresentam fundamental importância quando se busca avaliar a atividade biológica de produtos de origem vegetal, visto que substâncias candidatas a novas drogas podem promover efeitos colaterais (ANVISA, 2014b).

De acordo com os nossos resultados tanto o óleo essencial quanto os extratos etanólicos dos rizomas e dos resíduos sólidos de *C. articulatus* não

apresentaram atividade citotóxica *in vitro* sobre fibroblastos Balb/c 3T3 nas concentrações testadas (4,68mg/ml a 0,29mg/ml) no período de 1 dia; mantiveram células viáveis nas concentrações de 1,17mg/ml no período de 3 dias e no período de 7 dias mantiveram células viáveis na concentração de 0,29 mg/ml. Em estudo anterior utilizando a mesma metodologia *in vitro* (teste MTT), o extrato etanólico de resíduos sólidos de *C. articulatus* não demonstrou atividade citotóxica em macrófagos de ratos nas concentrações de 12,5, 25 e 50 mg/mL (SILVA et al., 2021). Da mesma forma óleo essencial da mesma planta apresentou baixa ação citotóxica para a linhagem de células Wi26VA-4 fibroblasto de pulmão humano IC₅₀> 100 µg/ml (SILVA et al., 2019). No entanto, o óleo essencial de *C. articulatus* testado por Metuge et al., (2014) foi considerado moderadamente tóxico em células de rins de macacos com o IC₅₀ de 93,7 µg/ml. Não se têm descrito na literatura testes de citotoxicidade com outras linhagens celulares normais com a espécie *C. articulatus*.

Em um estudo realizado por Kabbashi et al., (2015), utilizando extrato etanólico *Cyperus rotundus* L, do mesmo gênero da planta em estudo, os autores relataram ausência de citotoxicidade em linhagens de rins de macacos (IC₅₀> 100).

Outro método capaz de investigar na forma semi-quantitativa a capacidade de irritação de produtos solúveis, emulsões, géis ou óleos, consiste no emprego da substância teste sobre a membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha no décimo dia de incubação (HET-CAM) (CHORILLI et al., 2009; CCVAM, 2012). De acordo com o nosso estudo, *tanto* o óleo essencial (10 mg/ml), quanto os extratos etanólicos dos rizomas (10 mg/ml) e do resíduo sólido (10 mg/ml) de *C. articulatus* demonstraram ausência de alterações vasculares na membrana corioalantóide de ovos de galinha embrionados após 5 minutos de exposição, conforme o protocolo preconizado pela CCVAM (2012). Porém, nenhum estudo anterior avaliou a toxicidade dos extratos de *C. articulatus* utilizando o método empregado nesta pesquisa.

O uso do óleo essencial de *C. articulatus* mostrou-se seguro após estudo que demonstrou que a sua toxicidade aguda *in vivo* é superior a 2.000 mg/ kg. Foi observada a variação de peso positiva dos ratos *Wistar*

(fêmeas) tratados com o óleo essencial e extratos etanólicos dos rizomas e resíduo de pripioca e o controle (Tabela 10 e 11) no teste de toxicidade aguda com uma única dose. Não houve diferença estatística neste parâmetro, o que contribuiu para a classificação como altamente segura segundo a OECD (2011). A toxicidade aguda de drogas testes podem ser observadas através de alterações na pele, nos pelos, nos olhos, nas mucosas, no peso, na atividade somatomotora ou no comportamento. A alteração imediata visível mais comum de ação tóxica é a redução do peso do animal (LEMOS et al., 2018).

Segundo Rakotonirina e colaboradores (2001) o extrato aquoso do rizoma de *C. articulatus* não apresentou efeitos anestésicos ou paralisantes, entretanto a atividade motora espontânea em camundongos foi significativamente reduzida. Quando comparado ao diazepam, o extrato não demonstrou o efeito de relaxamento muscular, embora quando associado ao tiopental de sódio ou ao diazepam, facilitou a indução e aumentou o tempo total do sono sem nenhum efeito analgésico concomitante. Sendo assim, sugere-se que *C. articulatus* possui propriedades farmacológicas semelhantes à dos sedativos conhecidos, induzindo o sono. Resultados que corroboram com o nosso estudo, onde observamos sinais de sonolência nos ratos nas primeiras 4 horas após administração do óleo essencial, extrato etanólico dos rizomas e do resíduo de pripioca.

Singh et al. (2015) relataram que o extrato etanólico de *Cyperus rotundus*, quando administrado por via oral em camundongos, nas concentrações de 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg de peso corporal utilizando as diretrizes do protocolo 423 da OECD, não apresentou toxicidade aguda e nem mortalidade em nenhum grupo testado. Nosso resultado corrobora com o estudo descrito por esses autores quanto a toxicidade aguda do gênero *Cyperus*. Em estudos semelhantes de toxicidade aguda com óleo essencial de *C. articulatus*, na dose de 2000 mg/kg por via oral realizado por Metuge et al. (2014) e Silva et al. (2019), também não causou morte em camundongos BALB/c.

Outro teste pré-clínico realizado neste estudo para avaliar a biocompatibilidade, característica fundamental no estudo de novas

substâncias (ESTRELA, 2018; CAVALCANTI et al., 2013), foi o teste de irritação da mucosa oral *in vivo* após aplicação do óleo essencial e extratos etanólicos dos rizomas e resíduo de *C. articulatus*. Após a realização deste teste pudemos observar que o óleo essencial de priprioca a 2,34mg/ml e os extratos etanólicos dos rizomas e do resíduo de priprioca a 2,34 mg/ml foram classificados como não irritantes ao exame microscópico dos cortes histológicos pois não foi observado nenhum fenômeno epitelial após aplicação destes produtos na mucosa oral de ratos. Porém não há na literatura relatos da avaliação da toxicidade de *C. articulatus* empregando-se esta metodologia.

8. CONCLUSÃO

Óleo essencial e extratos etanólicos obtidos de rizomas íntegros e do resíduo sólido de *C. articulatus* cultivados em Santarém (PA), apresentaram sesquiterpenos como constituintes majoritários e mustacona em maior concentração.

Óleo essencial e extrato etanólico dos rizomas íntegros de *C. articulatus* tiveram forte ação antibacteriana contra *S. mutans*, já o extrato etanólico do resíduo apresentou atividade antibacteriana fraca frente a bactéria testada.

Óleo essencial e extratos etanólicos obtidos de rizomas íntegros e do resíduo sólido de *C. articulatus* não apresentaram atividade tóxica, podendo ser usados de forma segura.

Nossos resultados sugerem que a planta amazônica priprioca, tem potencial no desenvolvimento de produtos odontológicos contra infecções bucais. No entanto, são necessários estudos posteriores que possam levar ao desenvolvimento de potencial droga anticariogênica natural; buscando dessa forma, alternativas de prevenção em saúde bucal e reduzindo o índice de doença cárie na região

9. REFERÊNCIAS:

ABUBAKAR M.S., ABDULRAHMAN, E.M., HARUNA, A.K. The repellent and antifeedant properties of against *Tribolium castaneum* Hbst. **Phytotherapy Research**, v. 14, n.4, p. 281-283, 2000.

AGNELLI, P. B. Variação do índice CPOD do Brasil no período de 1980 a 2010. **Revista Brasileira de Odontologia**, 72(1/2):10-5, 2015.

ALELUIA, C. M.; PROCÓPIO, V. C.; OLIVEIRA, M. T. G.; FURTADO, P. G. S.; GIOVANNINI, J. F. G.; MENDONÇA, S. M. S. Fitoterápicos na odontologia. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**, 27(2): 126-34, 2015.

ALMEIDA JÚNIOR, J. S. Estudos pré-clínicos de segurança e eficácia da andiroba, copaíba e jucá para o desenvolvimento de um fitomedicamento. 191p. **Tese (Doutorado). Programa de Pós – Graduação em Sociedade Natureza e Desenvolvimento (PPSND). Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)**, Santarém, 2023.

ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, R. H.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial rico em linalol de *Croton cajucara* Benth sobre biofilmes artificiais e microrganismos planctônicos. **Microbiol Oral. Immunol.**, 20, 101-105, 2005.

ANTONINI, R.; CANCELLIER, K.; FERREIRA, G. K.; SCAINI, G.; STRECK, E. L. Fisiopatologia da doença periodontal. **Revista Inova Saúde**, Criciúma, vol. 2, n. 2, 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2ª ed. Brasília, 2012. On-line. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-para-avaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf/view>

ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 02 DE 13 DE MAIO DE 2014. Diário Oficial da União - DOU**Brasil, 2 maio 2014a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>>. Acesso em: 18 abr. 2023

ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 — Ministério da Saúde. Diário Oficial da União - DOU**, 13 maio 2014b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/orientacao-ao-prescritor/Publicacoes/resolucao-rdc-no-26-de-13-de-maio-de-2014.pdf/view>. Acesso em: 18 abr. 2023

ARAFI, M. G.; GHALWASH, D.; EL-KERSH, D. M.; ELMAZAR, M. M. Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical

trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. **Sci Rep** 8, 18056, 2018.

ARAÚJO, A. A. de.; SOARES L. A.L.; FERREIRA, M. R. A.; NETO, M. A. S.; SILVA, G. R.; ARAÚJO JR, de.; GUERRA, G. C. B.; MELO, M. C. M. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **J Ethnopharmacol**, 156, 88-96, 2014.

ARAUJO, D. B. D.; CAMPOS, E. D. J.; BASTOS, I. H. D. A.; PAULA, D. M. D.; TENÓRIO JÚNIOR, E. R.; ARAÚJO, R. P. C. D. Mouthrinses: active ingredients, pharmacological properties and indications. **RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)**, 60(3), 349-357, 2012.

ARÉVALO, M. R.; MACHADO, I. R.; SOUSA, A.; FERREIRA, K. C.; PONTE, M. X.; BARATA, L. E. S., & SARTORATTO, A. Produção Sustentável do Óleo Essencial de Priprioca (*Cyperus articulatus* var. *nodosus* L.) na Amazônia. **Biodiversidade Brasileira**, 11(3), 2021.

ASSIS, F.F.V.d.; SILVA, N.C.d.; MORAES, W.P.; BARATA, L.E.S.; MINERVINO, A.H.H. Chemical Composition and In Vitro Antiplasmodial Activity of the Ethanolic Extract of *Cyperus articulatus* var. *nodosus* Residue. **Pathogens** 2020, 9, 889.

BALHADDAD, A.A. et al. Toward dental caries: Exploring nano- particle-based platforms and calcium phosphate compounds for dental restorative materials. **Bioactive Materials**, Arábia Saudita, v. 4, p. 43-55, 2019.

BARATA, L. E. S.; QUEIROZ, S. R. R. Contribuição efetiva ou potencial do PADCT para o aproveitamento econômico sustentável da biodiversidade. Campinas: **Ministério da Saúde e Tecnologia**, 1995.

BARBOZA, A. S.; SCHNEIDER, L. R.; DOS SANTOS, D.C.; DAMIAN, M. F.; CUEVAS-SUÁREZ, C. E.; PIVA, E.; LUND RG. Atividade Antibacteriana e Propriedades Físico-Químicas de um Cimento Resinoso Contendo Compostos à Base de Óleo de Copaíba. **Journal Health Sciences**, 19(5), 234-234.35, 2017.

BARDAJÍ, D. K. R.; DA SILVA, J. J.; BIANCHI, T. C.; DE SOUZA, E. D.; DE OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO, L. F.; ROGEZ, H. L.; VENEZIANNI, R. C.; AMBROSIO, S. R.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. Copaifera reticulata oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18–27, 1 ago, 2016.

BARRIENTOS, L.; HERRERA, C. L.; MONTENEGRO, G.; ORTEGA, X.; VELOZ, J.; ALVEAR, M. et al. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Braz. J. Microbiol**, 2013.

BAROUTH K., CHARLES C. H., MANDOKI S. M., SIMMONS K, Zhao Q. & KUMAR L. D. (2003). The efficacy of an essential oil antiseptic mouthrinse

vs. dental floss in controlling interproximal gingivitis: a comparative study. **J Am Dent Assoc**, 134(3), 359-365.

BERNIMOULIN, J. P. Recent concepts in plaque formation. **J Clin Periodontol**, 30(Suppl 5):7–9, 2003.

BERSAN, S. M. F.; GALVÃO, L. C. C.; GOES, V. F. F.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G. M.; REHDER, V. L. G.; ALENCAR, S. M.; DUARTE, R. M. T.; ROSALEN, P. L.; & DUARTE, M. C. T. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14(1), 1–12, 2014.

BETTEGA, Patrícia Vida Cassi e col. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives Of Oral Research**, [s. L.], p.89-97, 2011.

BEZERRA, J. J. L.; PINHEIRO, A. A. V.; & OLIVEIRA, A. F. M. Cyperaceae species used for the treatment of inflammation: A review of ethnomedicinal, pharmacological, toxicological, and phytochemical evidence. **In South African Journal of Botany**, v. 150, 2022.

BORGES, A. K. M. et al. Natural remedies for animal health in latin America. **Ethnoveterinary Medicine: Present and Future Concepts**, p. 311–344, 1 jan. 2019.

BORRÁS, Maria Rosa Lozano. **Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágica? – Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa**. Editora Valer/Governo do Estado do Amazonas, Manaus-AM, 322p, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, **Departamento de Assistência Farmacêutica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs>

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006.

BRASIL, Sistema de Legislação da Saúde. Portaria n.º 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**. 2006; 84, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Passo a passo PSE: Programa Saúde na Escola: tecendo caminhos da intersetorialidade. **Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica**. Brasília, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SB Brasil 2010 - Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: principais resultados. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais

fitoterápicos, junto à **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Diário Oficial da União, 2014.

BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União (DOU), 9 out. 2008. Disponível em: <<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=11794&ano=2008&ato=57aQzYE5UNRpWT7e7>>. Acesso em: 22 fev. 2023

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 46(6), 1914–1920, 2002.

CASCON, V. Copaíba - *Copaifera* spp In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 480p, 2004.

CAVALCANTI JB, XIMENES RCC, COUTO GBL, PINHEIRO JT, EVÊNCIO LB, NASCIMENTO MLN, FREITAS PMN, SILVA GMP, CASTRO CMMB, ALMEIDA ER. (2013). Estudo de biocompatibilidade *in vivo* e *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides* L. - *Vitaceae* em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15(4), 467-473. <https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v15n4/a01v15n4.pdf>

CCAHUANA-VASQUEZ, R. A.; SANTOS, S. S. F.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. **Brazilian Oral Research [online]**. 2007, v. 21, n. 1 pp. 46-50, 2007.

CHAN, A. K. Y.; TAMRAKAR, M.; JIANG, C. M.; TSANG, Y. C.; LEUNG, K. C. M.; CHU, C. H. Clinical evidence for professionally applied fluoride therapy to prevent and arrest dental caries in older adults: A systematic review. **Journal of Dentistry**, 104273, 2022.

CHEUKA, P. M. et al. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 58, 31 dez. 2017.

CHEN, K.J. et al. Early childhood caries and oral health care of Hong Kong preschool children. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, Hong Kong, v. 11, p. 27-35, 2019.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, p. 19-30, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for yeast. **In Approved Standard CLSI**

document M27-A2. Volume 22. 2nd edition. Edited by FortWayne Ind USA; 2002.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. **In Approved Standard CLSI document M07-A6.** Volume 26. 6th edition. Edited by FortWayne Ind USA; 2005.

CONDE, N. C. O.; PEREIRA, M. S. V.; BANDEIRA, M. F. C. L.; VENÂNCIO, G. N.; COSTA, P., TONINI, H., KAMINSKI, P. E., TURCATEL, R. Copaíba (*copaifera L.*): taxonomia, morfologia, distribuição geográfica e usos. 1ª edição, Boa Vista, Roraima; **Embrapa Roraima**, 2006.

CONDE, N. C. O.; PEREIRA, M. S. V.; BANDEIRA, M. F. C. L.; VENÂNCIO, G. N.; OLIVEIRA, G. P.; SAMPAIO, F. C. *In vitro* antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm micro-organisms. **Rev Odonto Cienc.**, 30(4):179-183, 2015.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W. de; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza, CE: Editora UFC, 210p, 1981.

DAS NEVES, M. V. M., DA SILVA, T. M. S., DE OLIVEIRA LIMA, E., DA CUNHA, E. V. L.; DE JESUS OLIVEIRA, E. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **brazilian journal of microbiology** 47, 159–166, 2016.

DA SILVA, J. de O., PIMENTEL, K. G. B., DE OLIVEIRA SANTOS, E. B., DE OLIVEIRA, V. M. L., DE ALENCAR FERNANDES, F. H. Utilização do ensaio HET-CAM como alternativa para avaliação toxicológica de produtos oftálmicos. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, 17(2), 2021.

DATTA, S., DHAR, S., NAYAK, S. S., DINDA, S.C. Hepatoprotective activity of *Cyperus articulatus* Linn.against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Chemistry Pharmacology Research**, v. 5, p. 314-319, 2013.

D'ÁVILA, A. M. M. N.; CRUZ, J. H. A.; GUÊNES, G. M. T.; FILHO, A. A. O.; ANJOS, R. M. Interações medicamentosas: fitoterápicos utilizados na Odontologia e fármacos de uso contínuo dos pacientes. **Arch Health Invest.**, 10(3):468-473, 2021.

DE BARI, C. C.; SAMPAIO, F.; CONDE, N.; MOURA, L.; VEIGA, J.; BARBOSA, G.; VASCONCELLOS, M.; TODA, C.; VENÂNCIO, G.; BANDEIRA, M.F. Amazon emulsions as cavity cleansers: antibacterial activity, cytotoxicity in human tooth color. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 26, 497-501, 2016.

DE LUCA, M. P.; FREIRES, I. A.; GALA-GARCÍA, A.; SANTOS, V. R.; VALE, M. P.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The anti-caries activity and toxicity of an experimental propolis-containing varnish. **Braz. Oral Res.**,

31- 45, 2017.

DEROUICHE, M. T. T., & ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. **Toxicology in Vitro**, 45, 393–396, 2017.

DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50(2), p. 91–96, 1996.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, 97(2), 305–311, 2005.

EMMI D. P. Análise Comparativa da Eficácia de Evidenciadores de Placa Dental a base de Corantes Naturais x Sintéticos. **Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará (UFPA)**, Belém, 2006.

ESTRELA C. (2018). **Metodologia científica: Ciência, Ensino e Pesquisa**. (3a ed). Artes Médicas: Porto Alegre, cap. 28. p. 428.

ETO, F. S.; RASLAN, S. A.; CORTELLI, J. R. Características Microbianas na Saúde e Doença Periodontal. **Rev. biociênc**, Taubaté, 9(2): 45-51, 2003.

FALCÃO, T. R.; RODRIGUES, C. A. O.; ARAÚJO, A. A. de.; MEDEIROS, C. A. C. X. de.; SORES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; VASCONCELOS, R. C.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F. de.; SOUSA LOPES, M. L. D. de.; GUERRA, G. C. B. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complement Altern Med**. Feb., 12;19(1):47, 2019.

FARIA, S. de M.; NÓBREGA, H. do N.; FERREIRA, J. A. B.; MARIN, V. A. Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 549–556, 2012. DOI: 10.53393/rial.2012.v71.32463. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32463>. Acesso em: 19 out. 2022.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E. **Cárie dentária: fisiopatologia e tratamento**. 3a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

FERNÁNDEZ-FERREIRO, A.; GONZÁLEZ BARCIA, M.; GIL MARTÍNEZ, M.; BLANCO MENDEZ, J.; LAMAS DÍAZ, M. J.; OTERO ESPINAR, F. J. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM. **Farmacia Hospitalaria**, v. 38, n. 4, p. 300-304, 2014.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S. **MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL Equipe Principal**. Acad. Bras. Ciências ed. [s.l.] 1998.

FERREIRA, J. C. C. Avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória do óleo

essencial de *Cyperus articulatus* L. em macrófagos. **Dissertação de Mestrado em Biociências -Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará**, 2018a.

FERREIRA, G.L.S.; BEZERRA, L.M.D.; RIBEIRO, I.L.A.; MORAIS JÚNIOR, R.C.D.; CASTRO, R.D. Susceptibility of Cariogenic Microorganisms to Phytoconstituents. **Braz. J. Biol.**, 78, 691–696, 2018b.

FRANCISCO, K. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**; 4(1): 18-24, 2010.

FRAZÃO. P. Epidemiology of dental caries: when structure and context matter. **Braz. oral res.**; 26(1):108-114, 2012.

FREIRES, I. A.; BUENO-SILVA, B.; GALVÃO, L. C., et al. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. **Evid Based Complement Alternat Med.**: 871316, 2015.

FLORA DO BRASIL. *Cyperus* in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2019. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7174>).

GALVÃO, L. C. D. C.; FURLETTI, V. F.; BERSAN, S. M. F.; DA CUNHA, M. G.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. De; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; FIGUEIRA, G. M.; TEIXEIRA DUARTE, M. C.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; & ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

GARRIDO, A. D. B.; CARA, S. P. H. M.; MARQUES, M. M.; SPONCHIADO JR., E. C.; GARCIA, L. F. R.; SOUSA-NETO, M. D. Cytotoxicity evaluation of a copaiba oil-based root canal sealer compared to three commonly used sealers in endodontics. **Dent. Res. J. (Isfahan)**. 12, 121 -126, 2015.

GOBBO-NETO, L.; & LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **In Química Nova** (Vol. 30, Issue 2), 2007.

GOMES, M. S.; MENDONÇA, A. K. P.; CORDEIRO, T. O.; OLIVEIRA, M. M. B. Uso de plantas medicinais na odontologia: uma revisão integrativa. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**. João Pessoa-PB, 18(2): 118a-126, 2020.

GUERREIRO, J. C. M., OCHOA-RODRÍGEZ, V. M., RODRIGUES, E. M., CHAVEZ-ANDRADE, G. M., TANOMARU-FILHO, M., GUERREIRO-TANOMARU, J. M., & FARIA, G. (2021). Antibacterial activity, cytocompatibility and effect of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament on osteoblast biology. **International endodontic journal**, 54(7), 1155-1165.

HAMADA, S.; SLADE, H. D (1980). Biology, immunology, and cariogenicity

of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 44:331–384.

HERRERA, D. R.; TAY, L. Y.; REZENDE, E. C.; KOZLOWSKI JR, V. A.; SANTOS, E. B. *In vitro* antimicrobial of phytotherapeutic *Uncaria tomentosa* against endodontic pathogens. **Jornal of Oral Science**, vol. 52, No. 3, 473-476, 2010.

HERZI, N.; BOUJILA, J.; CAMY, S.; ROMDHANE, M.; & CONDORET, J. S. Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. **Food Chemistry**, 141(4), 2013.

IBIAPINA, W. V. et al. INSERÇÃO DA FITOTERAPIA NA ATENÇÃO PRIMÁRIA AOS USUÁRIOS DO SUS. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 60–70, 15 jun. 2014.

ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products, NIH Publication No. 10-7553, 2010.

INNES, N.P.T. et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. **Advances in dental research**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 49–57, 2016.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-10: biological evaluation of medical devices** — Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity, 2010.

JAKUBOVICS, N. S.; STROMBERG N.; VAN DOLLEWEERD, C. J.; KELLY, C. G.; JENKINSON, H. Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. **Mol Microbiol**; 55(5):1591- 605, 2005.

JUNIOR, J. I.; MONTEIRO, Á. B. Plantas medicinais e fitoterápicos úteis na odontologia clínica: uma revisão. **Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA**, 50(1), 47-56, 2020.

KABBASHI, A. S. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of ethanolic extract of *Cyperus rotundus* L. **Am J Pharmacy Pharmaceut Sci**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2015.

KARCHED, M; ALI, D; NGO, H. In vivo antimicrobial activity of silver diammine fluoride on carious lesions in dentin. **Journal of Oral Science**, Kuwait, p. 1-6, 2019.

KAMOLNARUMETH, K.; THUSSANANUTTIYAKUL, J.; LERTCHWALITANON, P.; RUNGTANAKIAT, P.; MATHURASAI, W.; SOOAMPON, S.; ARUNYANAK, S. Effect of mixed chlorhexidine and hydrogen peroxide mouthrinses on developing plaque and stain in gingivitis patients: a randomized clinical trial. **Clin Oral Invest**, 25, 1697–1704, 2021.

KASPER, A. A. M.; SOUSA, S. F.; MARTIN, B. S. S.; SATORATTO, A.; NUNES, K. M.; SOUSA JÚNIOR, J. J. V.; SILVA, S. K. R.; BARATA, L. E. S. Aproveitamento dos resíduos de priprioça (*Cyperus articulatus* L.) no controle alternativo de fungos fitopatogênicos. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.11, n.1, p.80-88, 2020.

KASPER, A. A. M.; SOUSA, S. F.; SAN MARTIN, B. S.; SOUSA JR. J. J. V.; SATORATTO, A.; ESCHER, S. K. S.; BARATA, L. E. S. Prospecção de produtos naturais obtidos de priprioça como agentes de controle de fungos fitopatogênicos de importância agrícola. **Agroecossistemas**, v.10, n.2, p.273-286, 2018a.

KASPER, A. A. M.; SOUSA, B. C. M.; LOURIDO, K.; SAN MARTIN, B.; BARATA, L. E. S.; LUSTOSA, D. Óleo essencial e hidrolato de *Cyperus articulatus* var. *nodosus* no controle de *Colletotrichum musae*, **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n.1, 2018b.

KASPER, A. A. M. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO RESÍDUO SÓLIDO E DO HIDROLATO DOS RIZOMAS DE PRIPRIOÇA (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*, Cyperaceae) CULTIVADA EM SANTARÉM-PA, BRASIL. 2016. 144 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais da Amazônia - **Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA**, Santarém, 2016.

KAVAZ, D.; IDRIS, M.; ONYEBUCHI, C. Physicochemical characterization, antioxidative, anticancer cells proliferation and food pathogens antibacterial activity of chitosan nanoparticles loaded with *Cyperus articulatus* rhizome essential oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, 123; 837–845, 2019.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, 1 set. 2009.

KOLEMBRANDER, P. E. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. **Int J Oral Sci**, 3(Suppl 2):49–54, 2011.

KULIK, E. M.; WALTIMO, T.; WEIGER, R.; SCHWEIZER, I.; LENKEIT, K.; FILIPUZZI- JENNY, E.; WALTER, C. Development of resistance of *mutans streptococci* and *Porphyromonas gingivalis* to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, *in vitro*. **Clinical oral investigations**, 19(6), 1547-1553, 2015.

LE MOS, D. C. S. et al. Toxicidade aguda em camundongos BALB/c expostos a efluentes de curtume. **Multi-Science Journal**, v. 1, p. 2359-6902, 2018.

LIMA, L. H. G., ROCHA, N. B. D., ANTONIASSI, C. P., MOURA, M. S. D., & FUJIMAKI, M. Prevalência e severidade da cárie dentária em escolares do Ensino Fundamental de um município vulnerável. **Revista de Odontologia da UNESP**, 49, 2020.

LOBO, C. I. V.; RINALD, T. B.; CHRISTIANO, C. M. S.; SALES, L. L. de.; BARBUGLI, P. A.; KLEIN, M. I. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. **J Oral Microbiol.**, 11(1); 1581520, 2019.

MACHADO, I. R., MENDES, K. R., DE PAULA, A. R., A'REVALO, M. R., SILVA, A. S., & BARATA, L. E. S. Priprioca (*Cyperus articulatus* var. nodosus, Cyperaceae) Hydrolate as Larvicidal against *Aedes aegypti*. *Biodiversidade Brasileira-BioBrasil*, (3), 91-98, 2020.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. **INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTISTRY**, RECIFE 6(4): 124-131, 2007.

MARREIRO, R. de O., SOUZA, W. M. de, KIMURA, T. N. L., SOUZA, T. P. de, BANDEIRA, M. F. C. L., TODA, C., VENÂNCIO, G. N., & CONDE, N. C. de O. Evaluation of the biocompatibility of the Libidibia ferrea mouthwash in the oral mucosa of rats – a pilot study. *Brazilian Journal of Development*, 7(6), 60912–60927, 2021.

MARSH, P. D. Dental diseases--are these examples of ecological catastrophes? **International Journal of Dental Hygiene**, 4 Suppl 1, 2006.

METUGE, J. A.; NYONGBELA, K. D.; MBAH, J. A.; SAMJE, M.; FOTSO, G.; BABIAKA, S. B.; CHO-NGWA, F (2014). Anti-Onchocerca activity and phytochemical analysis of an essential oil from *Cyperus articulatus* L. **BMC complementary and alternative medicine**, v.14, p.223, 2014.

MILHO, C.; SILVA, J.; GUIMARÃES, R.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; ALVES, M.J. Antimicrobials from Medicinal Plants: An Emergent Strategy to Control Oral Biofilms. **Appl.Sci.**, 11,4020, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC**, No 07, de 10 de fevereiro de 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

MITTAS, D.; MAWUNU, M.; MAGLIOCCA, G.; LAUTENSCHLAGER, T.; SCHWAIGER, S.; STUPPNER, H.; MARZOCCO, S. Bioassay-Guided Isolation of Anti-Inflammatory Constituents of the Subaerial Parts of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). *Molecules* **2022**, 27, 5937.

MONTEIRO, M. H. D. A. Fitoterapia na odontologia: levantamento dos principais produtos de origem vegetal para saúde bucal. **Monografia (especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos**, Pós-graduação em Gestão da Inovação em Fitomedicamentos. Rio de Janeiro, 2014.

MOREIRA, V. L.; PEIXOTO, A. P. P.; MARCHIONNI, A. M. T. Uso de medicamentos fitoterápicos como opção anti-inflamatória na odontologia. **J Dent Public Health** 11(2):167-175, 2020.

MORS WB, RIZZINI CT & PEREIRA NA. Medicinal plants of Brazil. **Algonac: Reference Publications**, 1st ed., 549 p, 2000.

MOTALLAEI, M. N.; YAZDANIAN, M.; TEBYANIAN, H.; TAHMASEBI, E.; ALAM, M.; ABBASI, K.; YAZDANIAN, A. The current strategies in controlling oral diseases by herbal and chemical materials. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2021.

NAM, Y. J., HWANG, Y. S. Antibacterial and antioxidant effect of ethanol extracts of *Terminalia chebula* on *Streptococcus mutans*. **Clinical and Experimental Dental Research**,7(6), 987–994, 2021.

NASCIMENTO A. P., FARIA G., WATANABE E. & ITO I. Y. (2008). Efficacy of mouthrinse spray in inhibiting cariogenic biofilm formation on toothbrush bristles. **Braz J Oral Sci**, 7(24), 1989- 1992.

NGO BUM, E.; SCHMUTZ, M.; MEYER, C.; RAKATONIRINA, A.; BOPELET, M.; PORTET, C.; JEKER, A.; RAKOTONIRINA, S. V.; OLPE, H. R.; HERRLING, P. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae), **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.145-150, 2001.

NGO BUM, E.; RAKOTONIRINA, A.; RAKOTONIRINA, S. V.; HERRLING, P. Effects of *Cyperus articulatus* compared to effects of anticonvulsant compounds on the cortical wedge. **Journal of ethnopharmacology**, v. 87(1), p. 27–34, 2003.

NIKSERESHT, R.; SHAMS, S.; MEHDIPOUR, A.; KERMANI, S.; HASHEMI, A.; HAMTA, A. Evaluation of the antibacterial effects of three natural formulated mouthwashes against *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. **J Oral Health Oral Epidemiol**; 8(2): 97-103, 2019.

OECD/OCDE 423. GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Teste Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. In: **OECD/OCDE - Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Testing of Chemicals**, OECD,2001. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf

OECD. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4. n. July, p. 1–21, jul. 2015.

OLADOSU, I. A.; USMAN, L. A.; OLAWORE, N. O.; ATATA, R. F. Antibacterial activity of rhizomes essential oils of two types of *Cyperus articulatus* growing in Nigeria. **Adv Biol Research**, v. 5, n. 3, 179-183, 2011.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, G. P.; SAMPAIO, F. C. In vitro antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm micro-organisms. **Rev Odonto Cienc.**, 30(4):179-183, 2015.

OLIVEIRA, J. R.; BELATO, K. K.; OLIVEIRA, F. E.; JORGE, A. O. C.; CAMARGO, S. E. A.; OLIVEIRA, L. D. Mouthwashes: an in vitro study of their action on microbial biofilms and cytotoxicity to gingival fibroblasts. **Gen Dent.**, Mar-Apr;66(2):28-34, 2018.

OLIVEIRA, G. P. de.; GOMES, L. da S. S.; VENÂNCIO, G. N. ; LIMA, E. S. .; SOUZA, T. P. de .; BANDEIRA, M. F. C. L. .; TODA, C.; CONDE, N. C. de O. Cytotoxicity of an orabase from *Libidibia Ferrea*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. e133101018713, 2021.

OLIVEIRA MARREIRO, R. de.; SOUZA, W. M. de., LIBÓRIO-KIMURA, T. N.; SOUZA, T. P. de., BANDEIRA, M. F. C. L.; TODA, C. Avaliação da biocompatibilidade do enxaguatório de *Libidibia ferrea* em mucosa bucal de ratos-estudo piloto Evaluation of the biocompatibility of the *Libidibia ferrea* mouthwash in the oral mucosa of rats—a pilot study. **Brazilian Journal of Development**, 7(6), 60912-60927, 2021.

PAIVA, L. C. A.; RIBEIRO, R. A.; PEREIRA, J. V.; OLIVEIRA, N. M.C. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(2A): 423-428, 2009.

PERES, M. A.; MACPHERSON, L. M. D.; WEYANT, R. J.; DALY, B.; VENTURELLI, R.; MATHUR, M. R. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet.**, 394(10194):249-260, 2019.

PEDROSA, T. D. N.; BARROS, A. O.; NOGUEIRA, J. R.; FRUET, A. C.; RODRIGUES, I. C.; CALCAGNO, D. Q.; LIMA, E. S. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of dermatological research**, 308(9), 643-654, 2016.

PEDROSA, T. N.; CATARINO, C. M.; PENNACCHI, P. C.; ASSIS, S. R., Gimenes, F. de.; Consolaro, M. E. L.; Barbosa, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 31-37, 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **J. Biotec. Biodivers.**, v. 3, N.4: pp. 146-152, 2012.

PEREIRA, L. P., et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential antiinflammatory usage. **J Ethnopharm.**, 139, 642-48, 2018.

PIERI, F. A., MUSSI, M. C., MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

PINHEIRO, J. S.; ALVES, D. B.; PASSOS, X. S.; MAIA, Y. L. M. Hepatotoxic Properties in medicinal plants and herbal products. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás - RRS-FESGO**, Vol.03, n.1, pp. 2020.

PIRIZ, M. A. et al. **O cuidado à saúde com o uso de plantas medicinais: uma perspectiva cultural** DOI: 10.4025/ciencucuidsaude.v13i2.20703. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 13, n. 2, p. 309–317, 8 maio 2014.

PITTS, N. B.; ZERO, D. T.; MARSH, P. D.; EKSTRAND, K.; WEINTRAUB, J. A.; RAMOS-GOMES, F.; et al. **Dental Caries**. *Nat. Rev.*, 3(17030):1-16, 2017.

RAKOTONIRINA, V. S.; NGO BUM, E.; RAKOTONIRINA, A.; BOPELETA, M. Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia*. v. 72, n.1, p. 22- 29, 2001.

RAMOS, M. F. S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. 132p. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2006.

RECHE, N. S. G. Controle da placa dental em deficientes mentais com o uso da clorexidina. **Dissertação (mestrado) - Universidade de Marília - UNIMAR**, Mestrado em Clínica Odontológica, Odontopediatria, Marília, 2005.

REN Z., CHEN, L., LI, J., LI, Y. Inhibition of *Streptococcus mutans* polysaccharide synthesis by molecules targeting glycosyltransferase activity, **Journal of Oral Microbiology**, 8:1, 31095, 2016.

RIBEIRO, A. Avaliação do potencial irritativo do óleo-resina de copaíba (substituto do eugenol) na fase exsudativa do processo inflamatório. 77p. **Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo**, Bauru, 1989.

ROCHA, A. E. S. As espécies de *Cyperaceae* Juss. conhecidas como *Priprioica* In: POTIGUARA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B. (Org) **Priprioica um recurso aromático do Pará Belém**: MPEG, UEPA, 2008.

ROCHA, E. A. L.; DE CARVALHO, A. V. O.; DE ANDRADE, S. R. A.; TROVÃO, D. M.; MEDEIROS, A. C.D.; COSTA, E. M. M. B. Atividade Antimicrobiana “In Vitro” de Extratos Hidroalcoólicos de Plantas Medicinais do Nordeste Brasileiro em Bactérias do Gênero *Streptococcus*. **Pesqui. Bras. Odontopediatria Clín. Integr.** 2013; 13(3): 233-38. VOLUME 18 - NÚMERO 2 - Ago/2020.

RUKUNGA, G. M.; MUREGI, F. W.; OMAR, S. A., GATHIRWA, J. W., MUTHAURA, C. N.; PETER, M. G.; HEYDENREICH, M.; MUNGAI, G. M. Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*, *Fitoterapia*, p. 188-190, 2008.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. do S.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C.; CONDE, N. C.; BUZALAF, M. A. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **J Ethnopharmacol.** Jul 15;124(2):289-94, 2009.

SANTOS, P. P., POTIGUARA, R. C. V., LINSI, A. L. F. A., MACEDO, E. G. Caracterização morfoanatômica dos caules de *Cyperus articulatus* L. e *C. prolixus* H.B.K. (Cyperaceae) Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat., Belém, v. 7, n. 1, p. 47-55, 2012.

SEVERO, E. de O.; BITTENCOURT, W. J. M.; FRANÇA, M. O. S. Desenvolvimento, análise físico-química e avaliação da atividade antifúngica de enxaguantes bucais contendo óleo e extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Brazilian Journal of Health Review**, 6(3), 11136–11157, 2023.

SILVA, A. S., SILVA, G. A., CORREA, V. M., PIVA, R. M., WERNECK, R. I. Controle mecânico do biofilme dental. **Revista Gestão & Saúde**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2011.

SILVA, N. C.; GONÇALVES, S. F.; ARAÚJO, L. S.; KASPER, A. A. M.; FONSECA, A. L.; SARTORATTO, A.; CASTRO, K. C. F.; et al. In vitro and in vivo antimalarial activity of the volatile oil of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). **Acta Amazonica** 49: 334-342, 2019.

SILVA, É.B.S.; BARATA, L.E.S.; AREVALO, M.R.; VIEIRA, L.Q.; CASTRO, W.; Ruiz, A.L.T.G.; Torre, A.D.; Castro, K.C.F.; Sartoratto, A.; Baratto, L.C.; et al. Chemical Composition and Antiproliferative Activity of the Ethanolic Extract of *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae). **Plants**,10,2084, 2021.

SILVA, C. R. O., OLIVEIRA, G. F., & OLIVEIRA, J. A. P. de. FITOTERÁPICOS: UMA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO ODONTOLÓGICO. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218**, 3(6), e361589, 2022.

SIMÕES, R. C. S.; MERLINI, S. P.; SILVA, R. P. R. da.; SILVA BASTOS, R. da.; TORRES, S. A.; MAGALHÃES BASTOS, J. R. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. **Rev Bras Odontol.**, v. 68, n. 1, p. 91-4, 2011.

SIMÕES, C. A. C. G.; CONDE, N. C. O.; VENÂNCIO, G. N.; MILÉRIO, P. S. L. L.; BANDEIRA, M. F. C. L.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Antibacterial activity of copaiba oil gel on dental biofilm. **Open Dent. J.**, 10, 188– 195, 2016.

SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1199–1209, 1 out. 2020.

TONGNUANCHAN, P.; & BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, 79(7), 2014.

VALADAS, L. A. R.; GURGEL, M. F.; MORORÓ, J. M.; FONSECA, S. G. C.; FONTELES, C. S. R.; CARVALHO, C. B. M.; FECHINE, F. G.; NETO, E. M. R.; FONTELES, M. M. F. et al. Dose-response evaluation of a copaiba-containing varnish against *streptococcus mutans in vivo*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 27, 363–367, 2019.

VASCONCELOS, K. R. F.; JUNIOR, V. F. V.; ROCHA, W. C.; BANDEIRA, M. F. C. L. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *copaifera multijuga* Hayne; **Revista Brasileira de Farmacologia**, 2008.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C. O gênero *copaifera* L. **Química nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; & MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, 28(3), 2005.

VERAS, D. C. D.; LACERDA, G. M.; FORTE, F. D. S. Grupo de idosos como dispositivo de empoderamento em saúde: uma pesquisa-ação. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, 26, e210528, 2022.

WHO (World Health Organization). Regulatory Situation of Herbal Medicines. A worldwide review, 1998.

WORTHINGTON, H. V.; MAC DONALD, L.; POKLEPOVIC, P. T.; SAMBUNJAK, D.; JOHNSON, T. M.; IMAI, P.; CLARKSON, J. E. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. **Cochrane Database Syst Rev**. Apr 10;4(4), 2019.

YANG, L. et al. Saliva Dysfunction and Oral Microbial Changes among Systemic Lupus Erythematosus Patients with Dental Caries. **BioMed Research International**, Hindawi, p. 1-7, 2018.

YANG, Z.; HE, S.; WEI, Y.; LI, X.; SHAN, A.; WANG, J. Antimicrobial Peptides in Combination with Citronellal Efficiently Kills Multidrug Resistance Bacteria. **Phytomedicine**, 120, 155070, 2023.

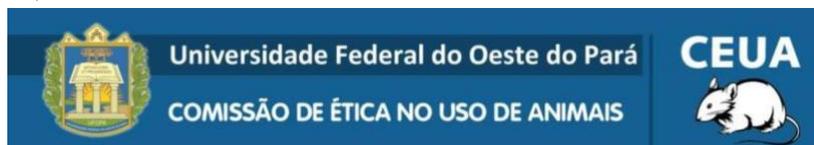
ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L. M. M.; GUILHON, G. M. S. P. Yield and Chemical Composition of the Essential Oil of the Stems and Rhizomes of *Cyperus articulatus* L. Cultivated in the State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18:1, p. 10-12, 2006.

ZOGHBI, M. G. B.; GUILHON, G. M. S.; ANDRADE, E. H. A.; & VILHENA, K. S. S. Química das espécies de *Cyperus* conhecidas como priprioca. **Priprioca: Um Recurso Aromático Do Pará**, 53–76, 2008.

10. Anexo 1 – Certificado da Comissão de Ética no uso de animais

13/03/24, 19:51

Certificado



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº **1120220228**, intitulado **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENXAGUATÓRIO NATURAL CONTRA DOENÇA ORAL**, sob a responsabilidade de **Waldiney Pires Moraes**, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº **1120220228**, entitled "**PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENXAGUATÓRIO NATURAL CONTRA DOENÇA ORAL**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 13/03/2024

Profª. Dra. Aline Pacheco
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/validar-certificado>

11. Apêndice 1 - Artigo publicado



Communication

Antimicrobial Activity on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* of *Cyperus articulatus* Ethanolic Extracts

Daniela Vieira de Castro Macambira ¹, José Sousa de Almeida Júnior ^{1,2}, Claudia Fernandes de Magalhães Silveira ³, Sandra Lays Ferreira Sarrazin ⁴, Tânia Mara Pires Moraes ², Bruno Alexandre da Silva ⁴, Antonio Humberto Hamad Minervino ^{5,*}, Waldiney Pires Moraes ^{2,*} and Lauro Euclides Soares Barata ¹

¹ PhD Program Society, Nature and Development, Federal University of Western Pará (PPGSND-UFOPA), Santarém 68040-255, PA, Brazil; dani_macambira@hotmail.com (D.V.d.C.); jsalmeidajr@hotmail.com (J.S.d.A.J.); lauroesbarata@gmail.com (L.E.S.B.)

² Laboratório de Farmacologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA, Santarém 68040-255, PA, Brazil; taniafarma@gmail.com

³ Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP, Campinas 13083-894, SP, Brazil; dra.claudiasilveira@gmail.com

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Saúde Coletiva da UFOPA, Santarém 68040-255, PA, Brazil; sandra.sarrazin@ufopa.edu.br (S.L.F.S.); bruno.als@ufopa.edu.br (B.A.d.S.)

⁵ Laboratory of Animal Health, LARSANA, Federal University of Western Pará, UFOPA, Santarém 68040-255, PA, Brazil

* Correspondence: ah.minervino@gmail.com (A.H.H.M.); waldineypires@gmail.com (W.P.M.)



Citation: Macambira, D.V.d.C.; Almeida Júnior, J.S.d.; Silveira, C.F.d.M.; Sarrazin, S.L.F.; Moraes, T.M.P.; da Silva, B.A.; Minervino, A.H.H.; Moraes, W.P.; Barata, L.E.S. Antimicrobial Activity on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* of *Cyperus articulatus* Ethanolic Extracts. *Plants* **2024**, *13*, 689. <https://doi.org/10.3390/plants13050689>

Academic Editor: Cheng-Yang Huang

Received: 10 November 2023

Revised: 16 February 2024

Accepted: 17 February 2024

Published: 29 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Oral diseases are one of the biggest public health problems worldwide, caused by opportunistic pathogens such as *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. *Cyperus articulatus* (pripricoa) is a plant conventionally used in traditional medicine in the Amazon region. However, little is known about the possible dentistry-related uses of extracts from the rhizomes and solid waste generated by the extraction of essential oils from this vegetable. This study aimed to investigate the chemical composition of volatile compounds and antimicrobial activity through the Minimum Inhibitory Concentration test (MIC and assessment of the toxicity by Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane (HET-CAM) of the ethanolic extracts from *Cyperus articulatus* intact rhizomes and solid waste. We identified sesquiterpenes as the main constituents, strong antimicrobial activity of the ethanolic extract of intact rhizomes against *S. mutans* (MIC = 0.29 mg/mL), moderate antimicrobial activity against *E. faecalis* of the extract obtained from the solid waste (MIC = 1.17 mg/mL), and absence of toxicity for both tested extracts. The absence of irritation and the antibacterial activity of the ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes and solid waste reveal its potential for use in the alternative control of bacteria that cause oral infections and may present economic viability as a raw material for dental products.

Keywords: pripricoa; ethanolic extract; antimicrobial activity; rhizomes; toxicity assessment

1. Introduction

Oral diseases remain one of the largest public health problems worldwide, impacting over 3.5 billion individuals [1]. In 2010, untreated caries in permanent teeth emerged as the predominant condition, affecting 2.4 billion people [2]. Recent data from Brazil's national survey (SB Brazil 2010) showed a declining trend in caries prevalence among 12-year-olds and adolescents compared to the 2003 survey. Specifically, for individuals aged 15–19 years, the caries index reduced by 35%, and in 12-year-old children it reduced by 26.2%. Conversely, adults had only a slight (17%) decrease and in elderly the prevalence remained unchanged [3].

The SB Brazil 2010 findings suggest that the country shifted from an average prevalence of caries in 2003 (CPO—index of decayed and filled teeth—between 2.7 and 4.4) to a

low prevalence condition in 2010 (CPO index between 1.2 and 2.6), according to WHO's classification [4]. Nonetheless, regional disparities in oral health observed since the 1986 survey perpetuate marked inequalities, particularly among children and adolescents. The north and northeast regions consistently present the worst indicators of oral health, with a CPO of 3.2 and 2.7, respectively [3]. In addition to having the highest caries prevalence values, the northern region also exhibits the highest proportion of decayed teeth (yet to be treated) compared to filled and missing teeth. This highlights the pronounced dental caries disparities in Brazil, with higher oral health impact in the poorest Brazilian regions [5].

Dental caries is a multifactorial pathology involving a susceptible host, microbial biofilm, and cariogenic diet. Among the microorganisms involved, *Streptococcus mutans* stands out as a pivotal initiator of biofilm formation [6]. This microorganism is known for its high cariogenic potential, acidogenicity, and acid tolerance. When exposed to a diet rich in sugar, it metabolizes carbohydrates and produces acids that demineralize the tooth structure [7]. If left untreated, carious lesions penetrate the dentin and reach the pulp, leading to endodontic infections that cause pulpal and periapical alterations. The etiology of these infections is directly linked to microorganisms, with *Enterococcus faecalis* being particularly prominent [8]. Both *S. mutans* and *E. faecalis* are opportunistic pathogens and belong to the group of microorganisms that exhibit high resistance in the oral cavity.

Oral diseases often result in persistent pain, sepsis, reduced quality of life, missed school days, disruptions in family life, and decreased work productivity [9]. Considering these consequences, it is crucial to prioritize the implementation of preventive measures, as the costs associated with treating oral diseases place a substantial economic burden on families and healthcare systems. The most effective approach to controlling dental biofilms is through proper hygiene practices such as brushing and flossing (mechanical methods). However, this method alone may not be fully effective as it relies on the ability and manual dexterity of individuals to perform quality tooth brushing and interdental cleaning. Therefore, it is essential to combine chemical procedures to control biofilm formation [10].

In 2006, medicinal plants and phytotherapy were incorporated into the Unified Health System through the National Policy on Integrative and Complementary Practices [11]. Despite the regulation of phytotherapy, a lack of knowledge regarding the indications and precautions for the use of medicinal plants persists among health professionals. In dentistry, the utilization of medicinal plants for treating oral pathologies, or systemic diseases with oral manifestations, remains relatively unexplored [12].

The highly biodiverse Amazon region harbors approximately 55,000 plant species. Of these, 10,000 may possess medicinal properties. These plants, steeped in centuries-old cultural practices, offer a rich reservoir for therapeutic exploration, requiring the need for rigorous pharmacological evaluation [13,14]. In general, these natural products may be a source for the development of herbal formulations for the treatment of various illnesses [15–17]. One common plant in this region is *Cyperus articulatus* (Cyperaceae), an aromatic plant popularly known as priprioca. In the state of Pará, priprioca essential oil has been utilized as a raw material for the cosmetic industry for over 30 years [18,19].

Beyond cosmetics, traditional medicine has leveraged priprioca's therapeutic attributes for ailments ranging from migraines to fever. Numerous studies have demonstrated the therapeutic properties of priprioca essential oil, including antimicrobial [20], anticonvulsant [21], antiparasitic [22], antioxidant [23], anti-inflammatory, and sedative [24,25] properties. It has also been shown to exhibit potent bactericidal and fungicidal actions against oral microorganisms, effectively controlling biofilm formation [26].

Like many plants, priprioca has a low essential oil yield. The extraction process from the rhizomes of *C. articulatus* generate solid waste, which is often discarded. However, this by-product harbors bioactive compounds, spotlighting its potential as a sustainable resource [27,28].

To date, no study has reported the antimicrobial activity of ethanolic extracts derived from *C. articulatus* rhizomes and its solid waste on *S. mutans* or any other bacteria

commonly associated with oral diseases. Therefore, this study aims to elucidate the chemical composition of priprioica ethanolic extracts, assess their toxicity, and evaluate their antimicrobial efficacy against *S. mutans* and *E. faecalis*, providing insights into potential therapeutic applications.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Committee Approval

This research was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Western Pará (UFOPA) under protocol number 1120220228. All procedures were performed in accordance with the guidelines of the National Council for Ethics in Animal Care (CONCEA) and Law No. 11.794/2008 for the care and use of experimental animals.

2.2. Plant Material

Cyperus articulatus was grown on a small scale in a rural property (54° 43' 00.10" W; 02° 37' 41.10" S) in the municipality of Santarém, Pará, Brazil. The botanical material was identified by Dr. Antônio Elielson Sousa da Rocha, and a voucher specimen was deposited under registration number MG—207174 in the herbarium of the Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) (Belém, Pará, Brazil).

2.3. Ethanolic Extract from *C. articulatus* Rhizomes

Immediately after harvesting from a mature plant, 85 g of rhizomes were crushed and subjected to an 8 h extraction process using 96% ethanol in a Soxhlet apparatus. The resulting extract was then concentrated using a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature of 50 °C, until the complete evaporation of the solvent. Finally, the extract was carefully packaged in sterile amber bottles and stored refrigerated at 10 °C.

2.4. Ethanolic Extract from the Solid Waste of *C. articulatus*

To obtain the residual essential oil, 300 g of rhizomes underwent hydrodistillation using a Clevenger apparatus. Following the oil extraction process, 62.75 g of the resulting solid waste was subjected to Soxhlet extraction using the same methodology as described for the rhizome extract. The extract obtained from the solid waste was carefully stored in sterile amber bottles and refrigerated at 10 °C.

2.5. GC-MS Analysis of Extracts

The volatile compounds present in the ethanolic extracts were analyzed using an Agilent gas chromatograph model 5977E MSD + 7820A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system, equipped with an HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). The analysis was performed under the following conditions: injector temperature of 270 °C, initial temperature of 60 °C, temperature ramp of 3 °C/min, reaching a final temperature of 240 °C, and maintaining it for 60 min (total run time). Helium gas was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The selective mass detector operated at 70 eV and a m/z range of 50–400. To enhance the analysis, the extracts underwent a methylation sample derivatization process. The preparation involved the addition of 0.2 g of sample to 5 mL of hexane, the mixture was vortexed for 5 min, centrifuged for 5 min, then the supernatant phase was added with 0.5 μL of methanol and a solution of sodium hydroxide (0.5 L). The identified compounds were compared with electronic libraries of the equipment, including NIST, KAAPi, and FFNSC, according to methodology already described in the literature [27,29].

2.6. Antimicrobial Evaluation

2.6.1. Microorganisms and Culture Conditions

Lyophilized reference strains of *S. mutans* (ATCC 25175) and *E. faecalis* (ATCC 29212) were reactivated by culturing them in BHI broth (Brain Heart Infusion, DIFCO) to obtain bacterial suspensions. The *S. mutans* and *E. faecalis* suspensions were incubated under

aerobic and anaerobic conditions, respectively, for 48 h at 37 °C. The resulting cultures were then transferred to plates containing BHI agar. Inocula were prepared by directly inoculating colonies into 1 mL of sterile saline solution and adjusting them to a standard of 0.5 on the McFarland scale, corresponding to 1.5×10^8 CFU/mL (NCCLS/CLSI, 2006). The turbidity of the suspension was measured using a turbidimeter (MS Tecnopon Instrumentação, Piracicaba, SP, Brazil) to ensure the desired standard on the McFarland scale.

2.6.2. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The antibacterial activity was assessed using the broth microdilution method as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards [28]. The initial concentration of the ethanolic extract from the *C. articulatus* rhizomes and the ethanolic extract from the solid waste of *C. articulatus* was 150 mg/mL, dissolved in propylene glycol as the solvent. Serial dilutions were prepared (1:1 dilution factor) using BHI as the diluent to obtain different concentrations. Concurrently, microbial suspensions were adjusted to a standard of 0.5 on the McFarland scale and further diluted in sterile saline solution (1:10 dilution factor) to achieve a final concentration of 1.5×10^4 CFU/mL. The tests were conducted in 96-well plates, with each well containing 90 µL of the specific extract concentration, 90 µL of sterile BHI, and 10 µL of the microbial inoculum. As a positive control, 0.12% chlorhexidine gluconate (PerioGard, Colgate, Campo, SP, Brazil) was used at an initial concentration of 0.6 mg/mL. The viability of the strains, sterility of the medium, and solvent activity was simultaneously monitored. The microplates were incubated in a bacteriological oven at a controlled temperature of 37 ± 2 °C for 24 h. After the incubation period, the inhibition of microbial growth was assessed by adding a 20 µL aqueous solution of resazurin dye (Sigma-Merck, Darmstadt, Germany) (0.02% w/v), followed by an additional 3 h incubation. MIC, defined as the lowest concentration capable of inhibiting microbial growth, was determined by the presence of a persistent blue color in the wells. A visible color change from blue to pink (indicating the reduction of resazurin to rephazurin) indicated the growth of viable cells. The experiments were performed in triplicate.

2.7. Toxicity Assessment: Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane (HET-CAM)

The HET-CAM test (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane) was performed according to the protocol described by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) [30].

The study utilized fertilized chicken eggs (*Gallus gallus*) that were incubated for a period of nine days. This timeframe was chosen because it falls within a stage of development where the embryo has not yet formed nervous tissues and does not possess the ability to perceive pain. Following the incubation period, the shell surrounding the air chamber was carefully removed, revealing a moistened internal membrane soaked in saline solution. This membrane was then delicately extracted to expose the chorioallantoic membrane. Next, 0.3 mL of the test formulations were directly applied to the CAM, and the resulting reactions were observed for a duration of 300 s. The time taken for the occurrence of specific events (endpoints) was carefully recorded, monitored, and filmed in seconds.

The following groups were included in the testing: a negative control of 0.9% NaCl, a solvent control of 1% propylene glycol, a positive control of 0.1 mol/L NaOH, 4.68 mg/mL of ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes, and 4.68 mg/mL of ethanolic extract from solid waste of *C. articulatus*. To ensure consistent and reliable results, reference photographs of all the endpoints were used. The three endpoints that were monitored consisted of hemorrhage (bleeding from vessels), vascular lysis (disintegration of blood vessels), and coagulation (denaturation of intra- and extravascular proteins). The concentration of the plant extracts used in the toxicity test was two times higher than the minimal concentration considered to have antimicrobial activity.

The assessment of the test formulations was based on the occurrence of each of the three HET-CAM endpoints at specific time intervals: 30 s, 2 min, and 5 min. A specific

score was assigned to the time at which each event took place, reflecting the occurrence of lysis, bleeding, and clotting. Table 1 provides a summary of this relationship.

Table 1. Scoring criteria for irritation test with the HET-CAM.

| Effects | Points | | |
|-------------|----------------|---------------|---------------|
| | 0.5 min (30 s) | 2 min (120 s) | 5 min (300 s) |
| Lysis | 5 | 3 | 1 |
| Bleeding | 7 | 5 | 3 |
| Coagulation | 9 | 7 | 5 |

HET-CAM: Hens Egg test Chorion Allantoic Membrane. Test according to the ICCVAM protocol [30].

The scores were then summed to obtain a single numerical value, indicating the irritation capacity of the tested formulation on a common scale ranging from 0 to 21, as shown in Table 2 [30]. The test was performed in triplicate and with the results obtained, an average (between 0 and 21) was determined, indicated for the irritant and non-irritant categories (Table 2) [30].

Table 2. Irritation category according to the HET-CAM score range.

| Scoring Range | Irritation Category |
|---------------|---------------------|
| 0 to 0.9 | not labeled |
| 1 to 4.9 | slight irritation |
| 5 to 8.9 | moderate irritation |
| 9 to 21 | severe irritation |

HET-CAM: Hens Egg test Chorion Allantoic Membrane. Test according to the ICCVAM protocol [30].

2.8. Statistical Analysis

The results obtained from the toxicity test (HET-CAM) were expressed as the mean \pm standard error of the mean. Analysis of variance (ANOVA) was employed to compare the experimental data, while Tukey's test was utilized to identify differences at a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Analysis of the Chemical Composition of Volatile Compounds in the Extracts

The ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste yield was 21%. Oxygenated sesquiterpenes (53.59%) and fat acids (33.58%) were predominant in the extract, followed by a minor number of oxygenated monoterpenes (3.69%). Eight components were identified after derivatization of solid waste ethanolic extract, representing 90.86% of the composition, with mustakone being the primary constituent (17.38%) (Table 3).

The ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes yield was 13%. Oxygenated sesquiterpenes (39.23%) and Sesquiterpene hydrocarbons (18.99%) were predominant in the extract, followed by a substantial amount of fat acids (16.63%) and a minor number of oxygenated monoterpenes (1.36%). Forty-three components were identified after derivatization of rhizomes ethanolic extract, representing 76.21% of the composition, with mustakone being the primary constituent (11.36%), followed by gurjunene (9.32%), cyperotundone (6.84%), corymbolone (3.94%), and Isoaromadendrene epoxide (2.94%) (Table 4).

Table 3. Constituents identified in the ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste by GC-MS and relative amounts.

| Constituents | RT | % |
|---------------------------|-------|-------|
| Citronellal | 12.47 | 3.69 |
| Mustakone | 33.47 | 17.38 |
| Rotundone | 34.60 | 6.63 |
| Dehydrofukinone | 36.03 | 15.31 |
| Corymbolone | 40.82 | 14.27 |
| Palmitic acid | 42.05 | 11.04 |
| Oleic acid | 47.47 | 18.26 |
| Stearic acid | 48.28 | 4.28 |
| Oxygenated monoterpenes | | 3.69 |
| Oxygenated sesquiterpenes | | 53.59 |
| Fat acids | | 33.58 |
| Others unidentified | | 6.41 |
| Total (%) | | 97.27 |

RT: retention time per minute; %: relative amount of constituents in the extract fraction.

Table 4. Constituents identified in the ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes by GC-MS and relative amounts.

| Constituents | RT | % |
|--------------------------------|-------|-------|
| (E)-Pinocarveol | 12.02 | 0.17 |
| Verbenol | 12.29 | 0.42 |
| (1R)-(-)-Myrtenal | 14.22 | 0.11 |
| Myrtenol | 14.44 | 0.27 |
| Verbenone | 14.77 | 0.40 |
| alpha-copaene | 21.64 | 0.13 |
| Cyperene | 22.57 | 0.12 |
| Cyperadiene | 22.86 | 0.71 |
| alpha-Guaiene | 26.11 | 0.53 |
| trans-Calamenene | 27.62 | 0.17 |
| 9,10-dehydro-Isolongifolene | 28.06 | 0.20 |
| alpha-calacorene | 28.39 | 1.03 |
| Caryophyllene oxide | 29.90 | 2.34 |
| Ledene oxide-(II) | 30.18 | 1.29 |
| Calarene epoxide | 31.18 | 0.25 |
| β-Atlantol | 31.36 | 0.78 |
| Tumerone | 31.65 | 0.93 |
| Valencene | 32.17 | 0.33 |
| Pogostol | 32.68 | 2.30 |
| β-Selinene | 32.79 | 1.71 |
| 9-epi-(E)-Caryophyllene | 32.89 | 1.54 |
| Alloaromadendrene | 33.08 | 0.18 |
| Cedrol | 33.19 | 0.59 |
| Isogermacrene D | 33.29 | 1.09 |
| Mustakone | 33.50 | 11.36 |
| Isoaromadendrene epoxide | 33.75 | 2.94 |
| Cyperotundone | 34.04 | 6.84 |
| Eremophilene | 34.91 | 1.02 |
| (-)-Spathulenol | 35.05 | 0.96 |
| Myristic acid | 35.22 | 1.51 |
| Gurjunene | 36.06 | 9.32 |
| Premnaspirodiene | 36.31 | 0.44 |
| cis-Z-alpha-Bisabolene epoxide | 36.41 | 0.52 |
| Anhydro-beta-rotunol | 36.80 | 1.91 |
| 2-epi-(E)-β-Caryophyllene | 36.99 | 1.50 |

Table 4. Cont.

| Constituents | RT | % |
|----------------------------------|-------|-------|
| Thujopsenal | 37.41 | 0.23 |
| trans-Z-alpha-Bisabolene epoxide | 38.03 | 0.65 |
| Cyperadione | 38.90 | 0.39 |
| Corymbolone | 40.84 | 3.94 |
| Palmitic acid | 42.05 | 4.75 |
| Linoleic acid | 47.27 | 2.43 |
| Oleic acid | 47.47 | 6.71 |
| Stearic acid | 48.28 | 1.24 |
| Oxygenated monoterpenes | | 1.36 |
| Sesquiterpene hydrocarbons | | 18.99 |
| Oxygenated sesquiterpenes | | 39.23 |
| Fat acids | | 16.63 |
| Others unidentified | | 20.11 |
| Total (%) | | 96.32 |

RT: retention time per minute; %: relative amount of constituents in the extract fraction.

The main volatile constituents identified in the ethanolic extracts from *C. articulatus* (rhizomes and solid waste) were (1) mustakone, (2) corymbolone, (3) dehydrofukinone, (4) gurjunene, and (5) cyperotundone (Figure 1).

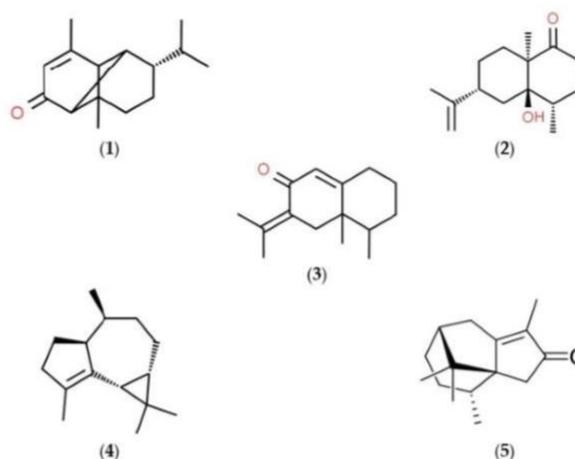


Figure 1. Main volatile from *C. articulatus* ethanolic extracts.

3.2. Antimicrobial Evaluation

In our study we have established as having potential antimicrobial activity only the extracts presenting a MIC below 2.0 mg/mL. Therefore, chlorhexidine exhibited antimicrobial activity against both microorganisms tested in lower concentrations (MIC of 0.004 mg/mL against *S. mutans* and 0.002 against *E. faecalis*). When we compare the extracts, we observe that the ethanolic extract from the rhizomes of *C. articulatus* was able to inhibit the growth of *S. mutans* in a lower concentration with values of MIC 0.29 mg/mL; on the other hand, the ethanolic extract of the solid waste showed more expressive MIC values against *E. faecalis*, inhibiting the growth of this bacteria at a concentration of 1.17 mg/mL. Table 5 presents

the minimum inhibitory concentrations (MIC), expressed in mg/mL, required to inhibit bacterial growth.

Table 5. Minimum Inhibitory Concentration in mg/mL of the ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste, ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes and chlorhexidine gluconate against the bacteria *S. mutans* and *E. faecalis*.

| Bacterial Strains | Extr EtOH <i>C. articulatus</i> Waste | Extr EtOH <i>C. articulatus</i> Rhizomes | Chlorhexidine |
|-------------------------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | MIC (mg/mL) | MIC (mg/mL) | MIC (mg/mL) |
| <i>S. mutans</i> ATCC 25175 | >2.0 | 0.29 | 0.004 |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | 1.17 | >2.0 | 0.002 |

Extr EtOH *C. articulatus* waste: ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste; Extr EtOH *C. articulatus* rhizomes: ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes; MIC: Minimum Inhibitory Concentration expressed in mg/mL. The initial concentrations of the extract (150 mg/mL) and chlorhexidine (0.6 mg/mL).

3.3. Toxicity Assessment: HET CAM

The analyzed test substances, including the ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes, the ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste, and propylene glycol 1%, demonstrated an absence of vascular alterations in the chorioallantoic membrane. This represents the first alterations associated with skin and mucosa irritation and contrasts with the negative control of NaCl 0.9%. Consequently, these substance extracts and solvent did not demonstrate any irritant potential or toxicity and received an “unlabeled” irritation index (II = 0), with no statistical difference when compared to the control group (Na Cl 0.9%). In contrast, sodium hydroxide (NaOH) at 0.1 mol/L was classified as “Serious irritation” due to the appearance of the three endpoints (lysis, hemorrhage, and coagulation) after its contact with the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs, obtaining an irritation index of 17.67, with statistical difference compared to the control group ($p \leq 0.0001$) (Table 6).

Table 6. Index and classification of irritation in the chicken egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM).

| Treatment | II (\pm SEM) | Irritation Category |
|---|--------------------------|---------------------|
| (NaOH) 0.1 mol/L (positive control) | 17.67 (\pm 1.44) **** | Severe irritation |
| NaCl 0.9% (negative control) | 0 (\pm 0.0) | Not labeled |
| Propylene glycol 1% | 0 (\pm 0.0) | Not labeled |
| Extr EtOH <i>C. articulatus</i> rhizomes (4.68 mg/mL) | 0 (\pm 0.0) | Not labeled |
| Extr EtOH <i>C. articulatus</i> waste (4.68 mg/mL) | 0 (\pm 0.0) | Not labeled |

Extr EtOH *C. articulatus* rhizomes (ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes); Extr EtOH *C. articulatus* waste (ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste); II (irritation index); **** Statistical difference compared to the control group NaCl 0.9% ($p \leq 0.0001$). Results are expressed as the mean (\pm standard error of the mean).

4. Discussion

In this research, we analyzed two plant materials sourced from pripricoa (*C. articulatus*). The ethanolic extract from the plant’s rhizomes showcased a phytochemical profile of volatile compounds consistent with findings from other studies in the Amazon region [27–29]. Rhizomes serve as a raw material used for extracting pripricoa essential oil, which holds substantial commercial value and economic interest, particularly in the perfume industry [18,19]. Numerous studies have highlighted the therapeutic benefits of pripricoa essential oil, including antimicrobial, anticonvulsant, antiparasitic, antioxidant, and anti-inflammatory properties, and potent bactericidal and fungicidal activities. Additionally, its effectiveness in controlling oral biofilm formation has been recorded [20,21,26].

Pripricoa yields a low essential oil content of approximately 0.45%. The processing associated with essential oil extraction results in a substantial volume of plant waste that often goes unused [28]. Preliminary research suggests that this pripricoa solid waste contains

bioactive compounds with antifungal properties and potential anticancer effects [27,28]. Therefore, in parallel with the evaluation of the plant's raw materials (rhizomes), we also examined the ethanolic extract obtained from the solid waste generated after extracting the essential oil from *C. articulatus*.

Our results of chemical analyses of volatile compounds in *C. articulatus* extracts align with prior investigations. Corimbolone and mustakone was reported previously as primary sesquiterpenes present in both the rhizome and solid waste extracts derived from *C. articulatus* [22,27,31]. Additionally, cyperotundone, previously detected in the ethanolic extract of the solid waste of *C. articulatus* [27], was found to be an important constituent of the ethanolic extract derived from *C. articulatus* rhizomes [32]. Oleic acid was found in this study to be a major constituent of the ethanolic extract obtained from the solid waste, and it was also identified at a lower concentration in a similar study [29].

The essential oil of *C. articulatus* from Campinas-SP showed the presence of verbenol, myrtenal, myrtenol, verbenone, and *e*-pinocarveol, at concentrations of 2.10%, 8.16%, 4.61%, 19.57%, and 17.44%, respectively [33]. As expected, these compounds were also found in lower relative concentrations in the ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes, used in this study, at concentrations of 0.42%, 0.11%, 0.27%, 0.40%, and 0.17%, respectively. In the same way, the compounds alpha-copaene (2.2–3.3%), cyperene (1.8–4.3%), cyperadiene (0.3%), trans-calamenene (0.5–0.8%), caryophyllene oxide (4.6–10.8%), isogermacrene D (0.9–1%) and mustakone (9.8–14.5%) identified in the essential oil of *C. articulatus* cultivated in river and coastal areas of the state of Pará in previous research [19] were also found in the ethanolic extract of the rhizome of *C. articulatus* in this study in lower relative concentrations: 0.13%, 0.12%, 0.71%, 0.17%, 2.34, 1.09%, and 11.36%, respectively.

Our results agree with previous research, in which *C. articulatus* oil analyzed by GC-MS showed the presence of alpha-guaiene, β -selinene [26], alpha-calacorene, pogostol, cyperotundone, spathulenol, and thujopsenal [34]. This is similar to our findings, where those compounds were found as constituents of the ethanolic extract of *C. articulatus* rhizome.

Previous reports regarding ethanolic extract from solid waste of *C. articulatus* from Santarém, PA, showed corimbolone as the main compound found (14.25%) [29]. This compound was also present in minor relative amounts within the rhizome ethanolic extract used in this study (3.94%).

One limitation of the present study was the use of GC-MS analysis for ethanolic extracts. GC-MS is a technique that relies on separating substances from a sample based on their distribution between the stationary (solid or liquid) and mobile (gas) phases. It is most commonly employed for the analysis of volatile gases or substances. Although an important portion of the volatile compounds are removed via distillation of the essential oil, there are still a considerable amount of volatile compounds present in the ethanolic extract, mainly certain volatile sesquiterpenes, that can be detected using GC-MS [27,29].

S. mutans and *E. faecalis* are microorganisms found in the oral cavity that are closely linked to the development of dental caries [6] and endodontic infections [8]. To the best of our knowledge, no studies have yet demonstrated the effects of *C. articulatus* extracts on bacteria associated with oral diseases.

Studies have indicated that the chemical compounds α -pinene and β -pinene, present in the essential oil of *C. articulatus*, exhibit antimicrobial activity against gram-positive bacteria and yeasts. These compounds have the potential to impact the viability and/or matrix of the oral biofilm [35]. In our study α -pinene and β -pinene were not found in extracts, suggesting the antimicrobial activity was due to the presence of other chemical compounds. Furthermore, previous research showed strong antimicrobial activity in the essential oil from *C. articulatus* against the oral pathogens *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis*, and *Streptococcus mitis*, and chemical analysis of the oil revealed the presence of the sesquiterpene mustakone as the main component, with the presence of alpha-copaene, alpha-guaiene, and β -selinene compounds also recorded in the ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes used in this study [26].

Preliminary studies evaluating the *C. articulatus* extract also identified high concentrations of corimbolone and mustakone and showed in vitro antiplasmodial activity of these substances [29,31]. Similarly, linoleic acid—found in this study to be one of the major compounds in the ethanolic extract of intact rhizomes of *C. articulatus*—was isolated and associated with the death of worms and microfilariae of the bovine parasite *Onchocerca ochengi* [22].

Citronellal, a representative acyclic monoterpene compound, showed antibacterial activity against *E. faecalis* (ATCC 29212) in a previous study [36]. The presence of this compound present in the ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste may be an explanation for the results found in this study, where the MIC of *E. faecalis* decreased in waste materials compared to plant roots.

The antimicrobial activity of essential oils is not fully understood, but it is thought to be due to the complex mix of components in oils, and not the result of the influence of a single chemical. It has been suggested that the combination of components within the essential oils have either a synergistic or antagonistic relationship, which may cause differences in their antimicrobial properties [36]. Thus, the mechanism of antimicrobial action of the ethanolic extracts from *C. articulatus* rhizomes and solid waste tested in this study on the bacteria that cause oral infections may be related to the synergism of these chemical compounds.

Our research is one of the first reports to investigate the antimicrobial effect of *C. articulatus* extracts against oral bacteria. The strength of the antimicrobial activity of a plant material can be determined based on the MIC values, which corresponds to the lowest concentration of an antibiotic necessary to inhibit the growth of a specific microorganism, essential for developing effective antimicrobial therapies [33]. When MIC values are up to 0.5 mg/mL, the antimicrobial activity is considered strong, while values between 0.6 and 1.5 mg/mL indicate moderate activity [33,37]. Thus, both the ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes and chlorhexidine (positive control) demonstrated strong antimicrobial activity against *S. mutans*, with MIC values below 0.5 mg/mL. Additionally, the ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste displayed moderate antimicrobial activity against *E. faecalis*, with a MIC value of 1.17 mg/mL [28,37].

Mustakone, the main compound of the essential oil from *C. articulatus*, was also identified in the ethanolic extract of the rhizomes, as well as in the ethanolic extract obtained from solid waste derived from oil extraction. However, there were variations in the percentages [22,27,31]. Other studies have identified saponins, flavonoids, terpenes, tannins, and sugars in the extract from the decoction of priprica rhizomes [25]. The presence of these bioactive substances may be related to the antimicrobial activity observed in this study against *S. mutans* and *E. faecalis*.

The ethanolic extracts from both the rhizomes and the solid waste from *C. articulatus* did not present toxic activity. In a previous study using the MTT test, the ethanolic extract from *C. articulatus* solid waste did not demonstrate cytotoxic activity in macrophages at concentrations of 12.5, 25, and 50 mg/mL [27]. However, no previous studies have assessed the toxicity of *C. articulatus* extracts using the method employed in this research (HET-CAM).

Given the absence of toxicity, clinical applications of the ethanolic extract of *C. articulatus* rhizomes and ethanolic extract of *C. articulatus* solid waste at a concentration of 4.8 mg/mL are possible and not risky.

5. Conclusions

Our study demonstrated that the ethanolic extract from *C. articulatus* rhizomes and its solid waste contained sesquiterpenes, with mustakone being the primary constituent. The ethanolic extract from rhizomes had strong antimicrobial activity against *S. mutans*, while the extract from the solid waste presented moderate antimicrobial activity against *E. faecalis*. The ethanolic extracts from both the rhizomes and the solid waste of *C. articulatus* were safe; they did not present toxic activity. Our results suggest that the Amazon plant priprica

(*C. articulatus*) has potential in the development of dental products against oral infection. However, further studies using drug-resistant bacteria and more complete antimicrobial and cytotoxicity profiles using *prurioca* purified chemical compounds are necessary.

Author Contributions: Conceptualization, D.V.d.C.M., W.P.M. and L.E.S.B.; Data curation, J.S.d.A.J., C.F.d.M.S., B.A.d.S., W.P.M. and L.E.S.B.; Formal analysis, D.V.d.C.M., J.S.d.A.J., C.F.d.M.S. and S.L.F.S.; Funding acquisition, A.H.H.M.; Investigation, D.V.d.C.M., J.S.d.A.J., C.F.d.M.S. and S.L.F.S.; Methodology, D.V.d.C.M., J.S.d.A.J., S.L.F.S. and T.M.P.M.; Project administration, A.H.H.M. and L.E.S.B.; Resources, D.V.d.C.M., C.F.d.M.S., A.H.H.M. and W.P.M.; Software, S.L.F.S. and T.M.P.M.; Supervision, T.M.P.M., A.H.H.M., W.P.M. and L.E.S.B.; Validation, T.M.P.M.; Visualization, W.P.M.; Writing—original draft, D.V.d.C.M.; Writing—review & editing, A.H.H.M., B.A.d.S., W.P.M. and L.E.S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas—FAPESPA, grant n. 036/2021.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of UFOPA according to report n. 1120220228.

Data Availability Statement: All data, tables, and figures in this manuscript are original. Raw data of this experiment is fully evaluable upon request to the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank the analyst Larissa Santana who helped us in the analysis of the chemical composition of the extracts, carried out in the Chromatography Lab of the Company KAAPI.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Watt, R.G.; Daly, B.; Allison, P.; Macpherson, L.M.D.; Venturelli, R.; Listl, S.; Weyant, R.J.; Mathur, M.R.; Guarnizo-Herreño, C.C.; Celeste, R.K. Ending the Neglect of Global Oral Health: Time for Radical Action. *Lancet* **2019**, *394*, 261–272. [CrossRef] [PubMed]
- Kassebaum, N.J.; Bernabé, E.; Dahiya, M.; Bhandari, B.; Murray, C.J.L.; Marcenes, W. Global Burden of Untreated Caries: A Systematic Review and Meta-regression. *J. Dent. Res.* **2015**, *94*, 650–658. [CrossRef]
- Brasil, S.B. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados Principais/Ministério Da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância Em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde 2012, 116. Available online: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf (accessed on 10 September 2023).
- Petersen, P.E. The World Oral Health Report 2003: Continuous Improvement of Oral Health in the 21st Century—The Approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **2003**, *31*, 3–24. [CrossRef] [PubMed]
- Agnelli, P.B. Variação Do Índice CPOD Do Brasil No Período de 1980 a 2010. *Rev. Bras Odontol.* **2016**, *72*, 10. [CrossRef]
- Pitts, N.; Zero, D.; March, P.; Ekstrand, K.; Weintraub, J.; Ramos-Gomez, E.; Tagami, J.; Twetman, S.; Tsakos, G.; Ismail, A. Dental Caries. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 51–59. [CrossRef] [PubMed]
- Lobo, C.I.V.; Rinaldi, T.B.; Christiano, C.M.S.; De Sales Leite, L.; Barbugli, P.A.; Klein, M.I. Dual-Species Biofilms of Streptococcus Mutans and Candida Albicans Exhibit More Biomass and Are Mutually Beneficial Compared with Single-Species Biofilms. *J. Oral Microbiol.* **2019**, *11*, 1581520. [CrossRef]
- Wade, W.G. The Oral Microbiome in Health and Disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 137–143. [CrossRef]
- Peres, M.A.; Macpherson, L.M.D.; Weyant, R.J.; Daly, B.; Venturelli, R.; Mathur, M.R.; Listl, S.; Celeste, R.K.; Guarnizo-Herreño, C.C.; Kearns, C.; et al. Oral Diseases: A Global Public Health Challenge. *Lancet* **2019**, *394*, 249–260. [CrossRef]
- Marsh, P.D. Dental Diseases—Are These Examples of Ecological Catastrophes? *Int. J. Dent. Hyg.* **2006**, *4* (Suppl. S1), 3–10. [CrossRef]
- Brasil. Ministério da Saúde. A Fitoterapia No SUS Eo Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais Da Central de Medicamentos; Série B. Textos Básicos de Saúde; Departamento de Assistência Farmacéutica, Ministério da Saúde: Brasília, Brazil, 2006; p. 148. Available online: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf (accessed on 10 September 2023).
- D’ávila, A.M.M.N.; de Cruz, J.H.A.; Guênes, G.M.T.; de Oliveira Filho, A.A.; dos Anjos, R.M. Interações Medicamentosas: Fitoterápicos Utilizados Na Odontologia e Fármacos de Uso Contínuo Dos Pacientes. *Arq. Health Investig.* **2021**, *10*, 468–473. [CrossRef]
- Pereira, L.D.P.; Da Silva, R.O.; Bringel, P.H.D.S.F.; Da Silva, K.E.S.; Assreuy, A.M.S.; Pereira, M.G. Polysaccharide Fractions of *Caesalpinia Ferrea* Pods: Potential Anti-Inflammatory Usage. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139*, 642–648. [CrossRef]
- De Oliveira Conde, N.C.; Pereira, M.D.S.V.; Bandeira, M.F.C.L.; Venâncio, G.N.; De Oliveira, G.P.; Sampaio, F.C. In Vitro Antimicrobial Activity of Plants of the Amazon on Oral Biofilm Micro-Organisms. *Rev. Odonto Cienc.* **2015**, *30*, 179–183. [CrossRef]
- Gomes, M.S.; Pereira de Mendonça, A.K.; Cordeiro, T.O.; Barbosa, M.M. Uso De Plantas Mediciniais Na Odontologia: Uma Revisão Integrativa. *Rev. Ciências Saúde Nova Esperança* **2020**, *18*, 118–126. [CrossRef]

16. Mallavadhani, U.V.; Chandrashekar, M.; Nayak, V.L.; Ramakrishna, S. Synthesis and Anticancer Activity of Novel Fused Pyrimidine Hybrids of Myrrhanone C, a Bicyclic Triterpene of Commiphora Mukul Gum Resin. *Mol. Divers* **2015**, *19*, 745–757. [\[CrossRef\]](#)
17. Chandrashekar, M.; Nayak, V.L.; Ramakrishna, S.; Mallavadhani, U.V. Novel Triazole Hybrids of Myrrhanone C, a Natural Polypodane Triterpene: Synthesis, Cytotoxic Activity and Cell Based Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *114*, 293–307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Rocha, A.E.S. As Espécies Cyperaceae Juss. Conhecidas Como Pripricoa. In *POTIGUARA, RC V; ZOGHBI, MGB Pripricoa: Um recurso aromático do Pará*; MPEG, UEPA: Belém, Brazil, 2008; pp. 13–24.
19. Zoghbi, M.G.B.; Guilhon, G.M.S.; Andrade, E.H.A.; Vilhena, K.S.S. Química Das Espécies de Cyperus Conhecidas Como Pripricoa. In *POTIGUARA, RC V; ZOGHBI, MGB Pripricoa: Um Recurso Aromático do Pará*; MPEG, UEPA: Belém, Brazil, 2008; pp. 53–76.
20. Oladosu, I.A.; Usman, L.A.; Olawore, N.O.; Atata, R.F. Antibacterial Activity of Rhizomes Essential Oils of Two Types of *Cyperus articulatus* Growing in Nigeria. *Adv. Biol. Res.* **2011**, *5*, 179–183.
21. Bum, E.N.; Schmutz, M.; Meyer, C.; Rakotonirina, A.; Bopelet, M.; Portet, C.; Jeker, A.; Rakotonirina, S.V.; Olpe, H.R.; Herrling, P. Anticonvulsant Properties of the Methanolic Extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 145–150. [\[CrossRef\]](#)
22. Metuge, J.A.; Babiaka, S.B.; Mbah, J.A.; Ntie-Kang, F.; Ayimele, G.A.; Cho-Ngwa, F. Anti-Onchocerca Metabolites from *Cyperus articulatus*: Isolation, In Vitro Activity and in Silico ‘Drug-Likeness’. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2014**, *4*, 243–249. [\[CrossRef\]](#)
23. Kavaz, D.; Idris, M.; Onyebuchi, C. Physicochemical Characterization, Antioxidative, Anticancer Cells Proliferation and Food Pathogens Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles Loaded with *Cyperus articulatus* Rhizome Essential Oils. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 837–845. [\[CrossRef\]](#)
24. Desmarchelier, C.; Mongelli, E.; Coussio, J.; Ciccio, G. Studies on the Cytotoxicity, Antimicrobial and DNA-Binding Activities of Plants Used by the Ese'ejas. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *50*, 91–96. [\[CrossRef\]](#)
25. Rakotonirina, V.S.; Bum, E.N.; Rakotonirina, A.; Bopelet, M. Sedative Properties of the Decoction of the Rhizome of *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 22–29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Bersan, S.M.F.; Galvão, L.C.C.; Goes, V.F.F.; Sartoratto, A.; Figueira, G.M.; Rehder, V.L.G.; Alencar, S.M.; Duarte, R.M.T.; Rosalen, P.L.; Duarte, M.C.T. Action of Essential Oils from Brazilian Native and Exotic Medicinal Species on Oral Biofilms. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. da Silva, É.B.S.; Barata, L.E.S.; Arevalo, M.R.; Vieira, L.Q.; Castro, W.; Ruiz, A.L.T.G.; Torre, A.D.; Castro, K.C.F.; Sartoratto, A.; Baratto, L.C.; et al. Chemical Composition and Antiproliferative Activity of the Ethanolic Extract of *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae). *Plants* **2021**, *10*, 2084. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Kasper, A.A.M.; de Sousa, S.F.; de San Martin, B.S.; Sartoratto, A.; Nunes, K.M.; de Sousa Júnior, J.J.V.; da Silva, S.K.R.; Barata, L.E.S. Aproveitamento Dos Resíduos de Pripricoa (*Cyperus articulatus* L.) No Controle Alternativo de Fungos Fitopatogênicos. *Rev. Ibero-Am. Ciências Ambient.* **2020**, *11*, 80–88. [\[CrossRef\]](#)
29. Assis, F.F.V.; Da Silva, N.C.; Moraes, W.P.; Barata, L.E.S.; Minervino, A.H.H. Chemical Composition and in Vitro Antiplasmodial Activity of the Ethanolic Extract of *Cyperus articulatus* Var. *Nodosus* Residue. *Pathogens* **2020**, *9*, 889. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. NIH ICCVAM. *Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products*; NIH Publication No 10-7553; NIH: Stapleton, NY, USA, 2010; p. 1324.
31. Rukungu, G.M.; Muregi, F.W.; Omar, S.A.; Gathirwa, J.W.; Muthaura, C.N.; Peter, M.G.; Heydenreich, M.; Mungai, G.M. Anti-Plasmodial Activity of the Extracts and Two Sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 188–190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. das Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Oliveira, J.; Carreira, L.M.M.; Guilhon, G.M.S.P. Yield and Chemical Composition of the Essential Oil of the Stems and Rhizomes of *Cyperus articulatus* L. Cultivated in the State of Pará, Brazil. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, *18*, 10–12. [\[CrossRef\]](#)
33. Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M.; Sartoratto, A.; Rehder, V.L.G.; Delarmelina, C. Anti-Candida Activity of Brazilian Medicinal Plants. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 305–311. [\[CrossRef\]](#)
34. Silva, N.C.; Goncalves, S.F.; de Araújo, L.S.; Kasper, A.A.M.; da Fonseca, A.L.; Sartoratto, A.; Castro, K.C.F.; Moraes, T.M.P.; Baratto, L.C.; de Varotti, F.P. In Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of the Volatile Oil of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). *Acta Amazon* **2019**, *49*, 334–342. [\[CrossRef\]](#)
35. Freires, I.A.; Bueno-Silva, B.; Galvão, L.C.D.C.; Duarte, M.C.T.; Sartoratto, A.; Figueira, G.M.; De Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on Streptococcus Mutans and Candida Albicans Biofilms: A Confocal Analysis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 871316. [\[CrossRef\]](#)
36. Yang, Z.; He, S.; Wei, Y.; Li, X.; Shan, A.; Wang, J. Antimicrobial Peptides in Combination with Citronellal Efficiently Kills Multidrug Resistance Bacteria. *Phytomedicine* **2023**, *120*, 155070. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Ferreira, G.L.S.; Bezerra, L.M.D.; Ribeiro, I.L.A.; Morais Júnior, R.C.D.; Castro, R.D. Susceptibility of Cariogenic Microorganisms to Phytoconstituents. *Braz. J. Biol.* **2018**, *78*, 691–696. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.