



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

PAULO PERETTI JUNIOR

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS VARIANTES PARAENSE E
AMAPAENSE DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BACTERICIDA E ANTIBIOFILME FRENTE AO
*Streptococcus mutans***

Macapá/AP
2021

PAULO PERETTI JUNIOR

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS VARIANTES PARAENSE E
AMAPAENSE DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BACTERICIDA E ANTIBIOFILME FRENTE AO
*Streptococcus mutans***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração ensaios biológicos como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador (a): Prof.^a. Dr.^a. Mayara Tânia Pinheiro.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa.

Macapá/AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva– CRB-2/1010

Peretti Junior, Paulo.

Perfil cromatográfico das variantes paraense e amapaense de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen e avaliação da atividade bactericida e antibiofilme frente ao *Streptococcus mutans*. / Paulo Peretti Junior; orientadora, Mayara Tânia Pinheiro; coorientador, Francisco Fábio Oliveira de Souza – Macapá, 2021.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Plantas medicinais. 2. *Acmella oleracea*. 3. Jambu. 4. *Streptococcus mutans*. 5. Antibiofilme. 6. Antibactericida. 7. Cromatografia líquida. I. Pinheiro, Mayara Tânia, orientadora. II. Souza, Francisco Fábio Oliveira de, coorientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

616.9041 P228p
CDD. 22 ed.

PAULO PERETTI JUNIOR

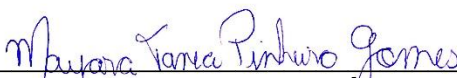
**PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS VARIANTES PARAENSE E
AMAPAENSE DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BACTERICIDA E ANTIBIOFILME FRENTE AO
*Streptococcus mutans***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração ensaios biológicos como requisito para obtenção do título de mestre.

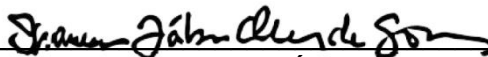
Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Mayara Tânia Pinheiro.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa.

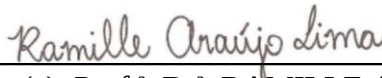
DATA DE APROVAÇÃO: 05/02/2021.



Orientador (a): Prof.^a. Dr.^a. MAYARA TÂNIA PINHEIRO
Universidade Federal do Amapá



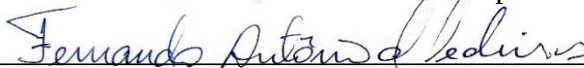
Co-orientador (a): Prof. Dr. FRANCISCO FÁBIO OLIVEIRA DE SOUSA
Universidade Federal do Amapá



Examinador Externo (a): Prof.^a. Dr.^a. RAMILLE ARAÚJO LIMA
Centro Universitário Unichristus



Examinador (a): Prof. Dr. MADSON RALIDE FONSECA GOMES
Universidade Federal do Amapá



Examinador (a): Prof.^a. Dr.^a. FERNANDO ANTÔNIO MEDEIROS
Universidade Federal do Amapá

Macapá/AP
2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, amigos e a todos que sempre acreditaram em mim. Às pessoas que se fizeram presentes nesse período e que contribuíram direta ou indiretamente para que fosse possível a conclusão desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é individual, entretanto, envolveu diversas pessoas de forma emocional, técnica e material. Sem estas nada disso seria possível e gostaria de expressar a minha gratidão a cada uma delas:

Primeiramente aos meus pais, Paulo Peretti e Rose Mendonça que ao longo destes 26 anos sempre me apoiaram com muita sabedoria e amor. Serei eternamente grato a tudo que me proporcionaram até hoje. Amo-os muito;

À minha irmã Sarah Mendonça, que sempre se fez presente durante a minha vida como uma referência de irmã, mãe e profissional;

Às minhas irmãs, tios, primos e avós, que mesmo à distância sempre estiveram preocupados com o meu bem estar e com o meu desenvolvimento educacional;

À minha orientadora Dra. Mayara Tânia Pinheiro pelos ensinamentos, disponibilidade e por toda contribuição para a minha formação acadêmica. Sem ela nada disso seria possível, sou muito grato por ter me aceitado e me conduzido com tamanho empenho nestes anos de árduo trabalho;

Ao meu coorientador Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa por ter se disponibilizado a cooperar com conhecimento, ensinamentos e com recursos para a realização da parte experimental. Sou muito grato por todos os comentários e conversas durante o período em que trabalhamos juntos, todos foram de grande valia e com toda certeza acrescentaram muito para a minha formação;

Ao Prof. Dr. Roberto Messias e ao técnico Francinaldo Sagres pelo espaço concedido em seu laboratório e por todo o conhecimento em farmacognosia repassado;

À Emanuelle Tavares, companheira de laboratório que me auxiliou tecnicamente em diversas etapas da pesquisa;

Aos agricultores Edmilson e Waldez que sempre foram prestativos e me receberam com muito carinho e atenção;

Aos meus amigos por sempre acreditarem no meu potencial e se fazerem presentes durante a minha vida;

À Thayná Magalhães por todo o apoio emocional e auxílio durante o início desta pesquisa;

À Gisele Gato pelo companheirismo e apoio motivacional durante os momentos finais deste estudo;

Aos meus colegas de laboratório por todos os momentos de descontração durante os incansáveis dias de pesquisa;

À Universidade Federal do Amapá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de capacitação;

À CAPES por me disponibilizar uma bolsa de estudo e possibilitar a conclusão desta dissertação;

Aos professores e colegas que agregaram à minha formação durante este período;

À todas as pessoas não mencionadas e que de alguma forma estiveram presentes e me auxiliaram durante esta dissertação.

RESUMO

Introdução: *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, popularmente conhecida como Jambu, é uma planta muito consumida na região amazônica brasileira, utilizada na medicina tradicional na prevenção da cárie dentária e no tratamento de odontalgias. De origem multifatorial, a cárie tem como principal provedor o *Streptococcus mutans*, bactéria formadora de biofilme e responsável pela formação de um vasto produto extracelular gerado a partir da metabolização da sacarose. Seu controle se dá a partir do uso de agentes mecânicos e químicos com ação antimicrobiana, assim como na redução da ingestão de açúcares. **Objetivo:** Determinar o perfil cromatográfico dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das variantes paraense e amapaense de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen e avaliar *in vitro* a sua atividade bactericida e antibiofilme frente ao *Streptococcus mutans*. **Metodologia:** Foram obtidos extratos aquosos das folhas e extratos hidroalcoólicos (70%) das folhas e caules das duas variações regionais, sendo todos semi-quantificados e qualificados mediante cromatografia em fase líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS). Foram ainda determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) através do método de microdiluição em placas de 96 poços e a viabilidade bacteriana em teste antibiofilme frente ao *Streptococcus mutans*. **Resultados:** O extrato aquoso apresentou maior rendimento global em comparação ao hidroalcoólico, as amostras de extrato aquoso das folhas da variação amapaense (EBA FolAP) e paraense (EBA FolPA) obtiveram um rendimento global de 41,1% e 84,8% respectivamente, valores estes 1.6 e 5.3 vezes maior que a mesma parte da planta em solvente hidroalcoólico. Em contrapartida, o solvente hidroalcoólico garantiu uma melhor extração de espilantol. As amostras hidroetanólicas das folhas (EBE FolPA) (99,97%) e caule (EBE CauPA) (98,83%) paraense, assim como das folhas (EBE FolAP) (96,10%) e caules (EBE CauAP) (99,17%) amapaenses apresentaram porcentagens superiores de espilantol em seus extratos em comparação às amostras EBA FolPA (93,98%) e EBA FolAP (96,10%). As amostras com as maiores concentrações de espilantol (EBE FolPA e EBE CauAP) foram selecionadas para os ensaios antimicrobianos. Os ensaios microbiológicos evidenciaram que ambas as amostras apresentavam CIM e CBM de 125 µg/mL frente ao *S. mutans*. No ensaio antibiofilme, a amostra EBE FolPA na concentração de 500 µg/mL apresentou inibição semelhante ($p>0,05$) ao digluconato de clorexidina 0.12%. **Conclusão:** As amostras EBE FolPA e EBE CauAP, nas concentrações testadas, apresentaram efeitos inibitório e bactericida significativos frente ao *S. mutans*, além de uma ação antibiofilme considerável, alcançando no caso do extrato EBE FolPA uma atividade semelhante ao digluconato de clorexidina. Novos estudos sobre a ação desses extratos frente a biofilmes multiespécie, e ensaios *ex-vivo* são necessários para assegurar a sua utilização na prevenção e tratamento da cárie dentária.

Palavras chaves: *Acmella oleracea*. Espilantol. Cromatografia líquida. *Streptococcus mutans*. Antibactericida. Antibiofilme.

ABSTRACT

Introduction: *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, popularly known as Jambu, is a plant widely consumed in the Brazilian Amazon region, used in traditional medicine as a preventive measure for dental caries and in the treatment for odontalgias. Of multifactorial origin, the main provider of caries is *Streptococcus mutans*, a biofilm forming bacterium, responsible for the formation of a vast extracellular product generated from the metabolism of sucrose. Its controls occurs through the use of mechanical and chemical agents with antimicrobial action, as well as in reducing the intake of sugars. **Objective:** Determine the chromatographic profile of the aqueous and hydroalcoholic extracts of the Pará and Amapá variants of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen and evaluate *in vitro* its bactericidal and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans*. **Methods:** Aqueous extracts of the leaves and hydroalcoholic extracts (70%) of the leaves and stems of the two regional variations were obtained, all were qualified and semi-quantified by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS). The minimum inhibitory (MIC) and bactericidal concentration (MBC) using the 96-well plate microdilution method and a biofilm viability test against *Streptococcus mutans* were performed. **Results:** The aqueous extracts showed a better overall yield compared to hydroalcoholic, the samples of aqueous leaves extract of Amapá (EBA FolAP) and Pará (EBA FolPA) variations obtained an overall yield of 41.1% and 84.8% respectively, values 1.6 and 5.3 times higher than the same plant part in a hydroalcoholic solvent. On the other hand, the hydroalcoholic solvent ensured a better spilanthol extraction. The hydroalcoholic samples of leaves (EBE FolPA) (99.97%) and stem (EBE CauPA) (98.83%) from Pará, as well as leaves (EBE FolAP) (96,10%) and stem (EBE CauAP) (99,17%) of Amapá regional variation, showed higher spilanthol percentages when compared to EBA FolPA (93,98%) and EBA FolAP (96,10%). The samples with the highest spilanthol concentration (EBE FolPA and EBE CauAP) were selected for antimicrobial assays. Microbiological tests showed that both samples had MIC and MBC of 125 µg/mL against *S. mutans*. In the antibiofilm assay, the EBE FolPA sample at 500 µg/mL showed a similar inhibition ($p>0.05$) to chlorhexidine digluconate. **Conclusion:** The EBE FolPA and EBE CauAP, at the tested concentrations, showed a significant inhibitory and bactericidal activity against *S. mutans*, in addition to a considerable antibiofilm action, given the EBE FolPA sample, a similar activity to chlorhexidine digluconate. New studies about the action of these extracts against multispecies biofilms, and *ex-vivo* tests are necessary to ensure their use in the prevention and treatment of dental caries.

Keywords: *Acmella oleracea*. Spilanthol. Liquid Chromatography. *Streptococcus mutans*. Antibacterial. Antibiofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Conformação microscópica do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> .	20
Figura 2 -	Etapas de desenvolvimento e crescimento do biofilme cariogênico.	22
Figura 3 -	Porções aéreas de <i>A. oleracea</i> . Mesma espécie, porém, diferenças nas variações regionais paraense (a) e amapaense (b) ficam evidentes.	27
Figura 4 -	Estrutura química do espilantol, constituinte majoritário da <i>A. oleracea</i> .	28
Figura 5 -	Área de coleta do material vegetal realizado no Distrito da Fazendinha, Macapá-AP: (a) vista frontal e (b) imagem por satélite.	34
Figura 6 -	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen. Diferença entre as flores, caules e folhas das variações regionais paraense e amapaense.	35
Figura 7 -	Etapas de preparo do material vegetal.	36
Figura 8 -	Etapas de obtenção do extrato aquoso a partir dos decoctos da hidrodestilação.	37
Figura 9 -	Etapas de obtenção do extrato hidroalcoólico a 70%.	38
Figura 10 -	Cromatogramas da amostra EBE Fol PA (a) e do simulado (b) obtidos pela biblioteca do HPLC-ESI-QTOF-MS, estes confirmaram a presença do metabólito secundário majoritário espilantol em 6,9 minutos de tempo de retenção. Os parâmetros da técnica cromatográfica estão descritos no tópico 4.5.	42
Figura 11 -	Espectros do espilantol demonstrando o pico da razão m/z. (a) Espectro de massas do espilantol presente no extrato EBE Fol PA demonstrando razão m/z de 222,1846. (b) Espectro de massas do espilantol simulado demonstrando razão m/z de 222,1852.	44
Figura 12 -	Espectro demonstrando os fragmentos da molécula espilantol ou (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida obtidos a partir da amostra EBE Fol PA .	45
Figura 13 -	Viabilidade bacteriana do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> após 1 min de aplicação dos extratos hidroalcoólicos da folha paraense (EBE Fol PA) e caule amapaense (EBE Cau AP) de <i>A. oleracea</i> a 70%. A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA com Tukey Post-Test ($p < 0,05$).	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Atividades terapêuticas da <i>A. oleracea</i> de acordo com a parte da planta e os efeitos obtidos durante os estudos.	29
Quadro 2 –	Tempo de eluição do gradiente no UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados qualitativos e semi-quantitativos das amostras EBA FolAP e EBA FolPA. Os dados foram obtidos pelo HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, sendo feita a identificação do constituinte majoritário epilantol (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida).	47
Tabela 2 -	Dados qualitativos e semi-quantitativos das amostras de extratos hidroalcoólicos de <i>A. oleracea</i> a 70%. Os dados foram gerados pelo HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, sendo feita a identificação do constituinte majoritário epilantol (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida).	48
Tabela 3 –	Valores da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos hidroalcoólicos frente ao <i>Streptococcus mutans</i> e a concentração de epilantol ($\mu\text{g/mL}$) de cada amostra. Os dados estão expressos como Média $\pm$ Desvio padrão.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLUE	Cromatografia em fase Líquida de Ultra Eficiência
CHX	Clorexidina
DP	Desvio Padrão
EBA	Extrato Bruto Aquoso
EBE	Extrato Bruto Hidroalcoólico
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
MBC	<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UHPLC-QTOF-MS/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight – Mass/Mass</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
λ	Lamba (Comprimento de onda)
min	Minutos
mg/mL	Miligrama/Mililitro
m/z	Razão carga/massa
nm	Nanômetro
ppm	Partes por milhão
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia/Mililitro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μm	Micrômetro
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO BIOFILME CARIOGÊNICO	20
3.2 <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN: FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIE	25
3.2.1 Família <i>Asteraceae</i>	25
3.2.2 Gênero <i>Acmella</i>	26
3.2.3 <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen	26
3.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (UHPLC-ESI-QTOF-MS).....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 REAGENTES	35
4.2 ÁREA DE COLETA DO MATERIAL VEGETAL	35
4.3 IDENTIFICAÇÃO E REGISTRO DAS EXSICATAS	37
4.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	37
4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	37
4.6 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (UHPLC-ESI-QTOF-MS)	39
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS EXTRATOS FRENTE AO <i>Streptococcus mutans</i>	40
4.7.1 Cultivo e padronização do inóculo	40
4.7.2 Ensaio microbiológico com os extratos	40
4.8 ATIVIDADE ANTIBIOFILME	41

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>A. oleracea</i>	43
5.2 DADOS SEMI-QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS DAS AMOSTRAS DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	46
5.3 ATIVIDADE BACTERICIDA FRENTE AO <i>Streptococcus mutans</i>	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A – PARECER DE IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	73
ANEXO B – CERTIDÃO DE CADASTRO DO MATERIAL VEGETAL NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO	74

1 INTRODUÇÃO

Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen, popularmente conhecida como Jambu, é uma planta comestível bastante utilizada na culinária amazônica. Possui diversos efeitos farmacológicos, sendo utilizada na medicina tradicional para a prevenção e tratamento da cárie dentária, cicatrização de feridas bucais, faringites e estomatite (SPELMAN *et al.*, 2011; DUBEY *et al.* 2013).

As folhas da *A. oleracea* previnem a cárie dentária através do estímulo da sialorréia. A sua mastigação gera um efeito analgésico, induzindo a um aumento do fluxo salivar, redução da odontalgia e estomatite (CAVALCANTE, 2013). É indicada como coadjuvante em dentifrícios diante do seu efeito analgésico, anti-inflamatório e antimicrobiano (REVILLA, 2002).

Esta espécie possui variações morfológicas destacadas por alterações geográficas durante a sua formação. Alterações genéticas são observadas quando ocorrem mudanças no solo, irrigação e temperatura, fatores que podem afetar a composição fitoquímica e a constituição da planta (JANSEN, 1985; SANTOS, 2014).

Logo, é de suma importância qualificar e quantificar estes compostos químicos para um melhor aproveitamento dos recursos naturais. Na atualidade, são utilizadas técnicas robustas para separar e avaliar os constituintes fitoquímicos das drogas vegetais. A cromatografia em fase líquida de alta eficiência é uma técnica precisa e altamente eficaz na identificação, caracterização e quantificação de estruturas químicas de compostos orgânicos, o que pode auxiliar na ratificação e descoberta de novos agentes terapêuticos (NARAYANAM *et al.*, 2014).

Assim, diferentes estudos avaliando a atividade de produtos naturais frente a cepas microbianas da cavidade oral têm demonstrado resultados promissores. O *Streptococcus mutans* é visto como a principal bactéria formadora do biofilme cariogênico. Possuindo um desenvolvimento multifatorial, está comumente associada a dietas ricas em carboidratos e sacarose. A metabolização de tais substâncias geram ácidos que levam a desmineralização, e consequentemente, cavitação das estruturas dentais (SAMARANAYAKE, 2018).

Agentes químicos e mecânicos atuam de forma preventiva através da desestruturação do biofilme e da matriz extracelular, assim como, na desnaturação da membrana bacteriana. Apesar de menos efetivo, o uso de agentes químicos é passível de alteração dentro dos hábitos higiênicos individuais. O difícil acesso a medidas preventivas de saúde e dietas ricas em

açúcares são vistos como os principais desafios a essa doença (OMS, 2017; MORENO-RABIE; SCHARAGER-LEWIN; ARANGUIZ, 2018).

O Brasil possui índices elevados de dentes cariados, perdidos ou obturados (CPO-D), principalmente em regiões com maiores discrepâncias socioeconômicas, como a região norte e nordeste. Faz-se necessário a busca por alternativas preventivas de baixo custo, seguras e eficientes (BRASIL, 2012).

Diante do exposto, sugere-se que a composição fitoquímica dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas e caules de *A. oleracea* seja capaz de inibir a ação antimicrobiana do *Streptococcus mutans*, podendo estes extratos serem vistos como uma opção viável de controle químico do biofilme bacteriano da cavidade oral.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar o perfil cromatográfico dos extratos aquosos das folhas e hidroalcoólicos das folhas e caules das variantes paraense e amapaense de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen através da técnica UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS, e avaliar *in vitro* a atividade bactericida e antibiofilme frente ao *Streptococcus mutans*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o rendimento global dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das partes aéreas das variações regionais (amapaense e paraense) da espécie *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen;
- Caracterizar o perfil cromatográfico quali e semi-quantitativo dos extratos obtidos mediante cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS);
- Determinar a concentração inibitória (CIM) e a concentração bactericida (CBM) mínimas dos extratos com maior concentração de espilantol frente ao *Streptococcus mutans*;
- Avaliar a atividade dos extratos hidroalcoólicos frente ao biofilme de *Streptococcus mutans in vitro*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO BIOFILME CARIOGÊNICO

Parte da população global faz uso da medicina tradicional, é estimado que 80% da população mundial depende da medicina alternativa para cuidados básicos de saúde e que quase 85% desta terapia se utiliza de plantas medicinais, extratos vegetais ou algum de seus princípios ativos (OMS, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2017).

Mesmo antigo, o estudo de plantas medicinais na odontologia (ELVIN-LEWIS, 1982; XAVIER; RAMOS; XAVIER FILHO, 1995), é tema atual e relevante (SINGH *et al.*, 2007; ALVIANO *et al.*, 2008; SAMPAIO *et al.*, 2009; CAVALCANTE, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2017). Em que, alguns aspectos chamam a atenção: a) a falta de conhecimento acerca dos produtos naturais por parte dos cirurgiões-dentistas; b) maior acesso aos serviços de saúde e a medicamentos sintéticos pela população; c) uso de plantas sem a correta identificação botânica; d) necessidade de identificação de plantas medicinais eficazes com reduzidos efeitos colaterais e que possam ser indicadas com segurança na odontologia (NIERO *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2007, MONTEIRO, 2014).

Desta forma, o avanço em pesquisas e o desenvolvimento de produtos e tecnologias que tragam benefícios à população são fundamentais, seja no uso direto dos recursos terapêuticos ou no avanço tecnológico (NESS; SHERMAN; PAN, 1999; MONTEIRO, 2014).

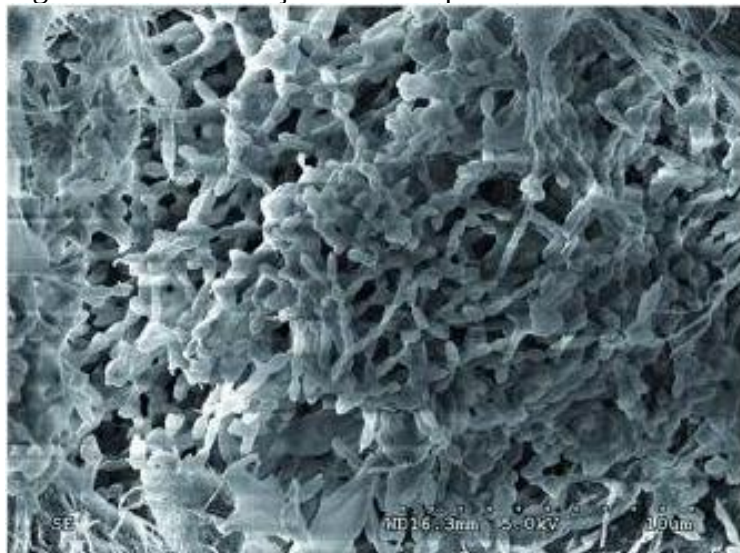
Assim, pesquisas de novos medicamentos na área da odontologia enfrentam algumas limitações quando se refere à disponibilidade de marcadores químicos de plantas medicinais testados em biofilmes bucais. Muitos desses estudos microbiológicos com plantas medicinais foram realizados em culturas planctônicas, o que não reflete as reais condições *in vivo* da cavidade bucal. Visto que, na boca, as bactérias possuem condições favoráveis à formação do biofilme, dando origem a doenças como a cárie e a doença periodontal (PEREIRA *et al.*, 2005; ALVIANO *et al.*, 2008, MCKENNA *et al.*, 2011).

A cavidade bucal, porção inicial do aparelho digestivo, abriga uma microbiota residente com mais de 700 espécies entre bactérias, vírus e fungos. Diversas doenças orais e sistêmicas estão associadas ao bioma oral, entre elas a cárie, a doença periodontal, a síndrome do intestino irritável, bem como o câncer oral, colorretal e o de pâncreas (XIAO; FISCELLA; GILL, 2020). Em alguns casos, em situações fisiológicas, estes microrganismos contribuem para a defesa inata do hospedeiro agindo como barreira para a colonização permanente por agentes transitórios potencialmente patogênicos. Seus colonizadores iniciais são espécies do gênero *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. orali* e *S. mitis*), bactérias gram-negativas

(*Haemophilus* sp e *Neisseria* sp) e *Actinomyces* sp. (FEJERSKOV; KIDD, 2011; SAMARANAYAKE, 2018).

Bactérias do gênero *Streptococcus* são formadoras de biofilme, fator imprescindível para o desenvolvimento da cárie. O *Streptococcus mutans* (Figura 1) é uma importante bactéria na formação do biofilme cariogênico, sendo capaz de formar uma vasta quantidade de polissacarídeos extracelulares na presença de uma dieta rica em carboidratos fermentáveis. Este biofilme é estabelecido quando uma comunidade de microrganismos inclusa em matriz de material extracelular adere seletivamente às superfícies dentárias, levando a destruição de suas estruturas minerais (FEJERSKOY; KIDD, 2007; INNES *et al.*, 2016; SAMARANAYAKE, 2018; LEMOS *et al.*, 2019).

Figura 1 – Conformação microscópica do biofilme de *Streptococcus mutans*.



Fonte: TRAN *et al.*, 2019.

Esta bactéria tem como principal ecossistema a cavidade oral e dentre as suas principais características estão: a capacidade de adesão a superfície dental e produção de uma matriz de polissacarídeos extracelulares através da metabolização da sacarose; o transporte e metabolização de carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade) capazes de desmineralizar as superfícies dentais; a capacidade de sobreviver e desenvolver-se em condições de baixo pH (aciduricidade) (LEMOS; BURNE, 2008; MOSADDAD *et al.*, 2019; SCHULTZE *et al.*, 2021).

Esta matriz extracelular insolúvel em água fornece aos microrganismos um ambiente diferenciado, estabelecendo interação em camadas onde há alteração de pH, oxirredução e disponibilidade de nutrientes. Comparado a culturas planctônicas, os microrganismos

aderidos ao biofilme maduro apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos (DAVID, 2003; BOWEN *et al.*, 2018).

Outros fatores também podem influenciar a microbiota bucal, sejam eles extrínsecos (tabagismo, alcoolismo, antibioticoterapia, corticoterapia e estado nutricional) ou intrínsecos ao paciente (idade e fatores genéticos). Esses fatores podem alterar a imunidade local e sistêmica, facilitando a colonização bacteriana (MORAIS *et al.*, 2007; MOSADDAD *et al.*, 2019). Fatores endógenos e exógenos, também afetam diretamente a composição das comunidades microbianas intraorais. O estilo de vida adotado pelo hospedeiro, sua fisiologia, sua ocupação, sistema imune, alimentação, condição socioeconômica, são condições multifatoriais para a definição da microbiota e das doenças orais (BHARGAVA; MOTWANI; PATNI, 2012; BELSTRØM *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2016; MOSADDAD *et al.*, 2019).

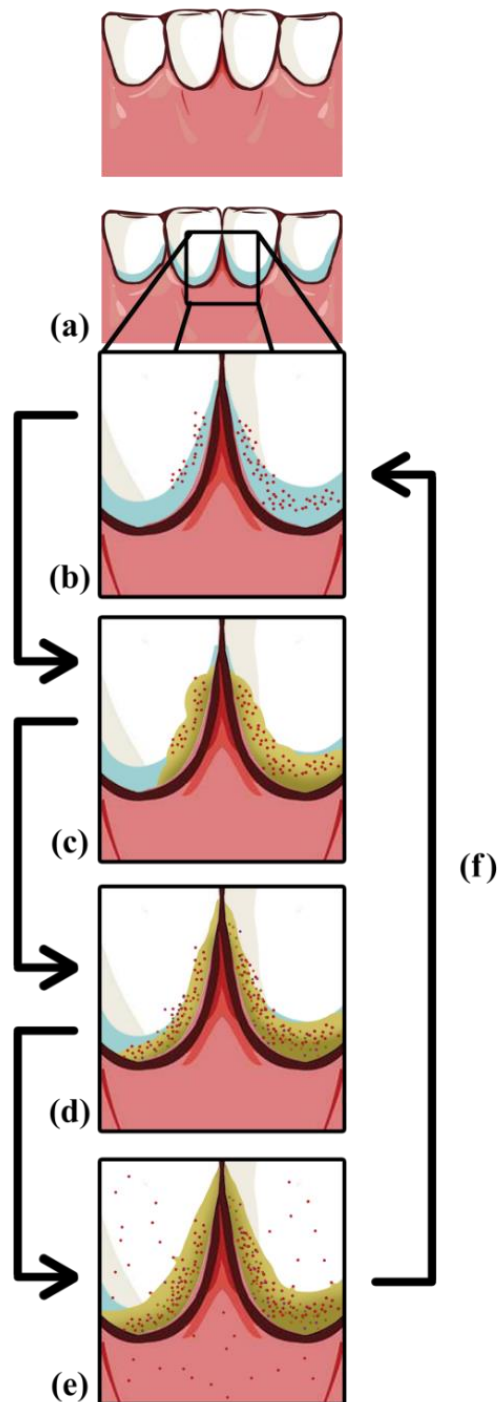
A cárie assim como a doença periodontal são biofilme dependentes. Este biofilme é composto por colônias bacterianas (correspondendo a 15-20% do seu volume), que se distribuem de modo não aleatório, contidos numa estrutura tridimensional formada por uma matriz de polissacarídeos (correspondente a 75-80% do seu volume) ligados a uma superfície sólida como o esmalte dentário ou a superfície de implantes (ZIJNGE *et al.*, 2010; JEPSENN *et al.*, 2017). As interações químicas que ocorrem entre as bactérias promovem a colonização e tornam a comunidade microbiana mais complexa, alcançando 50 ou mais espécies diferentes (JAKUBOVICS *et al.*, 2010).

Essas interações que ocorrem entre as bactérias são críticas para a sua estabilidade, quer entre bactérias da mesma estirpe, quer entre bactérias de estirpes diferentes, e estão diretamente relacionadas com a maturação dos biofilmes. De modo igualmente importante na estabilidade estão as interações entre as bactérias e o hospedeiro (JAKUBOVICS *et al.*, 2010).

O desenvolvimento e crescimento do biofilme é caracterizado por um processo dividido em 4 fases (Figura 2), a formação da película adquirida, fase de adesão inicial, fase de maturação e fase de dispersão (HUANG; LI; GREGORY, 2011). A primeira fase consiste na formação de uma película adquirida composta por glicoproteínas salivares. Esta película torna a superfície dentária receptiva à colonização de bactérias (GURENLIAN, 2007; HUANG; LI; GREGORY, 2011).

Em sua fase de maturação, as bactérias liberam polissacarídeos extracelulares insolúveis em água. Esta matriz é fundamental para a manutenção do biofilme, ela dificulta a penetração de agentes químicos antissépticos como os enxaguantes bucais (XAVIER *et al.*, 2003; HUANG; LI; GREGORY, 2011; SAMARANAYAKE, 2018).

Figura 2 – Etapas de desenvolvimento e crescimento do biofilme cariogênico.



(a) Formação da película adquirida através da deposição de glicoproteínas salivares na superfície dental. **(b)** Adesão bacteriana geralmente iniciada por *Streptococcus mutans* sobre a película anteriormente formada. **(c)** Bactérias liberam polissacarídeos extracelulares e formam uma matriz extracelular insolúvel à água e que impede a penetração de agentes antissépticos. **(d)** Processo de coadesão bacteriana, do qual colônias secundárias aderem aos receptores bacterianos e aumentam a diversidade microbiológica. **(e)** Na última fase há uma saturação do crescimento bacteriano e estas se dispersam do biofilme em busca de nutrientes. **(f)** Bactérias dispersas reiniciam o processo em novos sítios que apresentam a película adquirida, tornando todo este processo contínuo.

Fonte: Autor.

Portanto, métodos preventivos são fundamentais para frear o desenvolvimento do biofilme e as suas consequências. Atualmente, diversos produtos estão disponíveis no mercado, sendo agrupados em agentes mecânicos, químicos ou mistos (JEPSEN *et al.*, 2017).

O controle mecânico é a forma mais comum de tratamento dos biofilmes dentários. Dentre os recursos utilizados estão a escovação e o uso de fio dental. O processo da escovação por si só não é suficiente para a remoção da placa bacteriana, as regiões interdentais, por exemplo, não apresentam espaços suficientes para a penetração das cerdas. Nestes casos, o uso do fio dental é necessário cuja eficácia em remoção do biofilme chega a 80% (PEDRAZZI *et al.*, 2009).

Outra forma de controle da placa bacteriana é através da utilização de agentes químicos, os quais complementam a ação dos agentes mecânicos na prevenção da formação e remoção dos biofilmes orais. Estes agentes possuem substâncias microbicidas com amplo espectro antibacteriano tais como a clorexidina e o cloreto de cetilpiridíneo (MORENO-RABIE; SCHARAGER-LEWIN; ARANGUIZ, 2018). Estes geralmente estão associados à óleos essenciais como adjuvantes terapêuticos, o timol, mentol, eucaliptol e salicilato de metila se fazem presentes, além de possuírem substâncias coadjuvantes como fluoretos, que auxiliam na remineralização da superfície dentária (BUGNO *et al.*, 2006; MARINHO; ARAÚJO, 2007; MOREIRA *et al.*, 2009).

Estes antissépticos orais além de serem indicados na prevenção da cárie também atuam na redução da halitose e no tratamento de pequenas infecções gengivais. Normalmente estes agentes devem ser utilizados em um bochecho por cerca de 1-2 minutos de modo a permitir sua presença homogênea na cavidade oral. As concentrações do produto variam de acordo com o agente químico e o fabricante (COSTA *et al.*, 2014).

Dentre os citados, a clorexidina (CHX), uma bisbiguanida catiônica, é o agente químico mais utilizado na prevenção dos biofilmes dentais, uma vez que apresenta um elevado poder antisséptico. A sua presença em uma vasta gama de produtos comerciais como enxaguantes bucais e géis dentifrícios deve-se ao seu amplo espectro frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras. Os efeitos significativos da CHX na placa bacteriana têm sido notáveis e alvo de diversos estudos focados na redução da formação da película primária e na adesão de microrganismos à superfície dentária (SOLMAZ; KORACHI, 2013). O seu mecanismo de ação deve-se às propriedades de atração e adsorção de suas moléculas catiônicas com os fosfatos aniônicos presentes na membrana celular bacteriana. Isto altera a sua permeabilidade, facilitando a penetração do agente na membrana citoplasmática,

precipitação do citoplasma e um desequilíbrio celular gerando como resultado a morte bacteriana (CHEUNG *et al.*, 2012; BONEZ *et al.*, 2013; SOLMAZ; KORACHI, 2013).

Contudo, apesar da excelente eficácia antibacteriana, o uso prolongado da CHX apresenta efeitos adversos como escurecimento da superfície dentária, restaurações e língua; alteração do paladar; atrofia papilar e enfraquecimento ósseo, em casos de ingestão excessiva. Tais aspectos dificultam a aceitação do tratamento, sendo necessária a busca por alternativas terapêuticas igualmente eficazes e seguras (BALAGOPAL; ARJUNKUMAR, 2013; SOLMAZ; KORACHI, 2013).

Diante deste cenário, as plantas medicinais e os seus constituintes são vistas como uma alternativa a medicamentos sintéticos ou semissintéticos. A sua utilização advém de tempos remotos da medicina tradicional, possuindo boa aceitação pela população em geral (ASCHWANDEN, 2001; MONTEIRO, 2014).

3.2 *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN: FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIE

A *Acmella oleracea* é uma *Asteraceae* encontrada em regiões tropicais e subtropicais próximas à linha do Equador na África, Ásia, América do Sul, Norte da Austrália, Malásia, Bornéu Índia e Sri Lanka (ELVIN-LEWIS, 1982). A ausência de grandes populações selvagens indica que esta planta não é nativa do Brasil, sendo encontrada apenas em residências e adjacências em forma domesticada (FAVORETO; GILBERT, 2010).

3.2.1 Família *Asteraceae*

A família *Asteraceae* é um grupo evolutivamente bem-sucedido de angiospermas com cerca de 23 mil espécies espalhadas por todos os continentes do mundo (JEFFREY, 2007; BARREDA *et al.*, 2012; TAHTIHARJU *et al.*, 2012). Uma de suas principais características é a presença do capítulo, um condensado de flores firmemente compactados. O capítulo se assemelha a uma “única flor grande” que atua como uma unidade de atração para polinizadores, característica determinante para o sucesso evolutivo desta família (BROHOLM *et al.*, 2008; BARREDA *et al.*, 2012; NIKOLIĆ; STEVOVIĆ, 2015).

Entre as famílias relacionadas com a *Asteraceae* estão a *Goodeniaceae* (família concentrada na Austrália) e a *Calyceraceae* (família endêmica da América do Sul). Elas possuem características morfológicas e filogenéticas relativamente próximas com a *Asteraceae* (ALBACH *et al.*, 2001; HELLWIG, 2007; ZANOTTI; POZNER, 2008; FUNK *et al.*, 2009; JABAILY *et al.*, 2012; KATINAS *et al.*, 2016). Dentre as sinapomorfias entre as

espécies está a presença inflorescências do capítulo; morfologia do pólen e ovários uniloculares (LUNDBERG, 2009; KATINAS *et al.*, 2016).

Dos diversos gêneros presentes na família *Asteraceae*, os que possuem maior relevância botânica são: *Acmella*; *Achillea*; *Artemisia*; *Bidens*; *Carthamus*; *Inula*; *Matricaria*; *Otanthus* e *Parthenium* (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2015).

3.2.2 Gênero *Acmella*

O gênero *Acmella* Rich. In Pers. foi relatado pela primeira vez em 1807. Descrito como um gênero pantropical, com espécies presentes no continente americano (norte, central e sul), africano, asiático e oceânico, constituído por 30 espécies herbáceas, de período anual ou perene. As espécies do gênero *Acmella* são caracterizadas por hábito ereto, decumbente ou ascendente; de duração anual ou perianual; de caules verdes, verdes e vermelhos ou roxo e vermelho; de pubescência glabra ou pilosa; de folhas dentadas, ovais ou lanceoladas a lineares; com as raízes basais e difusas; e flores de cor amarelada, alaranjada-amarelada e alaranjada (JANSEN, 1985; FAVORETO; GILBERT, 2010).

Jansen (1985) manifestou o gênero como independente, porém com combinações regionalizadas e entre outros gêneros, como o *Spilanthes*. Quando definido, o gênero possuía cerca de 30 espécies, atualmente são 31 (SILVA, SANTOS, 2011; SPELMAN *et al.*, 2011).

A *Acmella* tem uma história medicinal com mais de dois mil anos, contendo plantas com as mais diversas atividades biológicas. Seus extratos e isolados apresentam eficácia comprovada em tratamentos para sarna, psoríase, escorbuto, reumatismo, melhora do sistema imunológico, além do tratamento de infecções e alívio da dor (SAHU *et al.*, 2011; RAMACHANDRAN; RADHAKRISHNAN, 2020). Um de seus principais protagonistas é a *Acmella oleracea*, planta amplamente difundida pelo mundo através da alimentação e do uso medicinal, sendo reconhecida em alguns países como “planta para dor de dente”, por apresentar propriedades analgésicas e anti-inflamatórias na cavidade oral (CHUNG *et al.*, 2008; PURUSHOTHAMAN *et al.*, 2018).

3.2.3 *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen

Conhecida popularmente no Brasil como “jambu”, agrião-do-pará, abecedária, agrião-bravo, agrião-do-brasil, agrião-do-norte, botão-de-ouro, erva-maluca, jambu-açu e nhambu (FAVORETO; GILBERT, 2010), costuma ser cultivada por pequenos produtores como fonte de renda em hortas familiares nos estados do Pará, Amapá e Amazonas. Desta planta são consumidos o caule, as folhas e inflorescências menos desenvolvidas, as mais desenvolvidas

são removidas. É uma planta de baixo valor calórico, que causa sensação de dormência e aumento de salivação quando consumido. Possui várias utilidades (condimentar, medicinal e ornamental), reunindo elementos essenciais para formação de um sistema sustentável (SILVA, 2015).

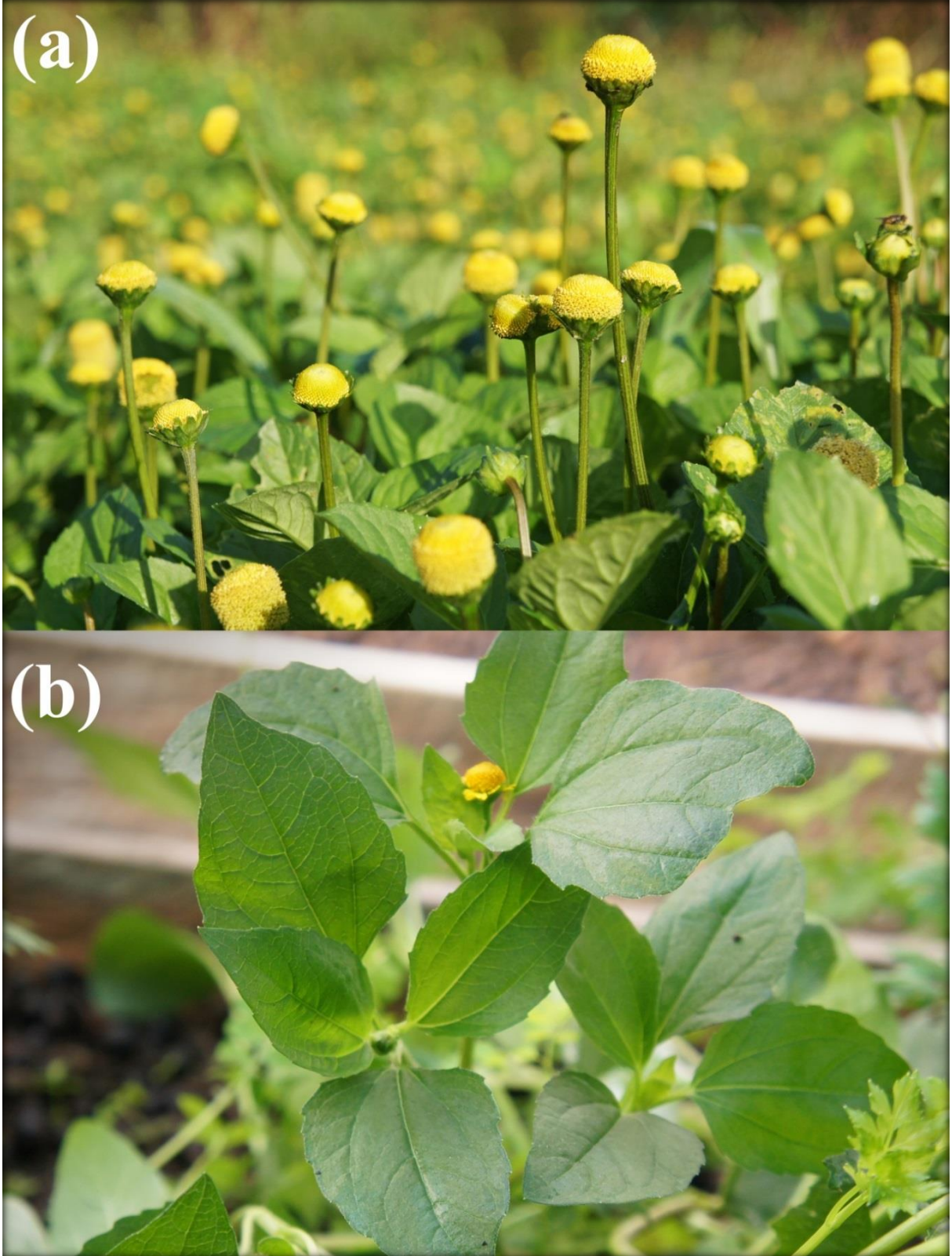
São atribuídos a *A. oleracea* os seguintes sinônimos; *Spilanthes oleracea* L., *Cotula pyretharia* L., *Pyrethrum spilanthus* Medik., *Acmella oleracea* (*Spilanthes acmella*) var. *oleracea* (L.) C.B. Clarke ex Hook. f., *Spilanthes fusca* Lam, *Bidens fervida* Lam, *Bidens fusca* Lam, *Isocarpa pyrethraria* (L.) Cass, *Spilanthes radicans* Schrad. Ex D.C., *Spilanthes oleracea* var. *fusca* (Lam.) D.C. (LORENZI; MATOS, 2008).

A espécie possui variações morfológicas destacadas por alterações geográficas durante a sua formação. Alterações genéticas são observadas quando há mudanças no padrão de crescimento e das estruturas que envolvem o plantio como o solo, temperatura e irrigação, fatores que podem afetar a composição e a constituição fitoquímica da planta (JANSEN, 1985; SANTOS, 2014).

Estas alterações (Figura 3) podem abrir novas classificações ao gênero através de subespécie ou variação regional, entretanto, a ausência de dados taxonômicos sobre todas as variações nas mais diversas partes do mundo, dificultam essa classificação (JANSEN, 1985).

A. oleracea é utilizada dentro da medicina popular como uma alternativa para odontalgias, feridas na boca, garganta inflamada e estomatite (SPELMAN *et al.*, 2011). Seu principal constituinte é o espilantol, uma substância que induz o aumento do fluxo salivar na cavidade oral (sialorreia), formando uma barreira mecânica que dificulta o estabelecimento do biofilme bacteriano intraoral. Este composto possui ainda atividade anestésica, por estimular a parestesia dos nervos faciais (LORENZI; MATOS, 2008; CAVALCANTE, 2013), sendo a planta indicada como um coadjuvante em produtos de higiene oral. Utiliza-se o chá, tintura ou sumo das folhas, talos e flores, sendo também possível o seu uso através de compressas nas regiões afetadas (REVILLA, 2002).

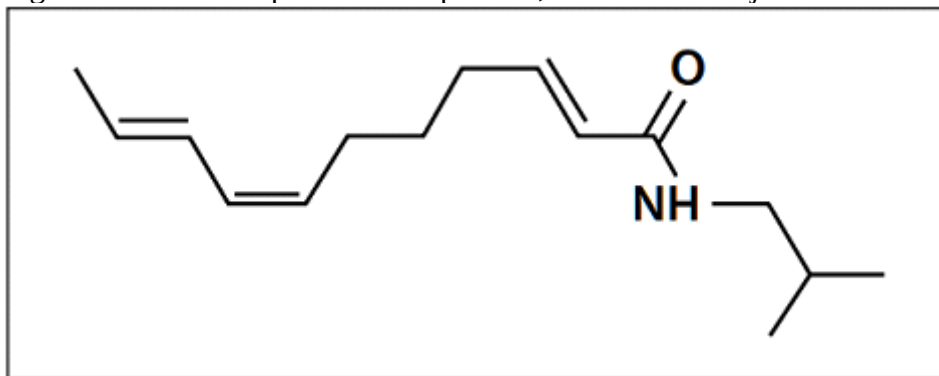
Figura 3 – Porções aéreas de *A. oleracea*. Mesma espécie, porém, diferenças nas variações regionais paraense (a) e amapaense (b) ficam evidentes.



Fonte: Autor.

Na análise química das folhas, caule e flores de *A. oleracea* identifica-se de modo abundante a alquilamida espilantol [(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida]. A ela são atribuídas a sensação de formigamento e anestesia na boca (Figura 4). Além disto, são atribuídas à *A. oleracea* e ao espilantol diversas atividades biológicas (DUBEY *et al.*, 2013), como analgésica (HAJDU, 2014, BOONEN *et al.*, 2010; DUBEY *et al.*, 2013), antifúngica (DUBEY *et al.*, 2013), antinociceptiva (CHAKRABORTY *et al.*, 2010), antioxidante (ABEYSIRI *et al.*, 2013; PINHEIRO, 2016), anti-inflamatória (WU *et al.*, 2008), diurética (VANAMALA *et al.*, 2012), vasodilatadora (WONGSAWATKUL *et al.*, 2008), anticonvulsivante, afrodisíaca e inibidora da lipase pancreática (REVILLA, 2002; CAVALCANTE, 2013).

Figura 4 - Estrutura química do espilantol, constituinte majoritário da *A. oleracea*.



Fonte: Autor.

No quadro 1 observam-se algumas atividades terapêuticas da planta de acordo com a parte estudada e seus efeitos apresentados. Alguns estudos demonstraram atividades equipáveis ou superiores à ação de determinados medicamentos (Quadro 1).

Quadro 1 – Atividades terapêuticas da *A. oleracea* de acordo com a parte da planta e os efeitos obtidos durante os estudos.

Atividade terapêutica	Parte da planta	Efeito	Referência
Analgésica	Folhas	Ação de flavonóides presentes no extrato da planta que diminui prostaglandinas PGE2 e PGF2, envolvidas na percepção da dor	Chakraborty <i>et al.</i> 2010
Anestesia local	Toda a planta	Ação anestésica de alquilamidas através do bloqueio dos canais Na +.	Chakraborty <i>et al.</i> 2010
Anestesia local	Partes aéreas	Mucoadesivo contendo 10% de extrato etanólico demonstrou ação anestésica. A ação esteve relacionada a presença de espilantol e terpenos.	Santana de Freitas-Blanco <i>et al.</i> , 2016
Antifúngica	Folhas	Os extratos hidroalcoólicos e aquosos demonstraram ação antifúngica melhor que o medicamento Fluconazol diante do <i>Rhizopus arrhizus</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> .	Aror; Vijay; Kumar, 2011
Anti-inflamatória	Flores	Inibição via NF-κB proporcionando redução nos níveis de mRNA e expressão proteica de COX-2 e iNOS, além da eliminação de radicais livres.	Wu <i>et al.</i> 2008; Rondanelli <i>et al.</i> 2020
Antimalárica	Raiz	Espilantol e isolados do extrato hidroalcoólico a 85% demonstraram ação contra duas cepas de <i>Plasmodium falciparum</i> .	Spelman <i>et al.</i> 2011
Antimicrobiana	Toda a planta	O espilantol isolado de <i>Acmella oleracea</i> inibiu o crescimento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em concentrações de 25 µg/mL.	Molina-Torres; Garcia-Chavez; Ramirez-Chavez, 1999
Antimicrobiana	Flores	O extrato obtido de éter petróleo demonstrou ação antimicrobiana significativa frente a <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus sp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e o fungo <i>Candida albicans</i> em concentrações de 2 a 10%.	Sathyaprasad; Jose; Chandra, 2015

Antioxidante	Partes aéreas	Extratos hidroalcoólicos e metanólicos demonstraram potente ação antioxidante (DPPH). Supõe-se que as cumarinas e compostos fenólicos sejam responsáveis pela ação.	Prachayasittikul <i>et al.</i> 2009
Antipirético	Partes aéreas	Extratos aquosos apresentaram redução do quadro febril causado pela levedura de cerveja. A ação pode ser atribuída aos flavonóides presentes na planta.	Narayana <i>et al.</i> 2001
Diurética	Folhas	O extrato hidroalcoólico das folhas revelou efeito diurético. Essa ação possivelmente foi resultado da ação de taninos, esteróides e carotenóides encontrados nas folhas.	Vanamala <i>et al.</i> 2012
Vasorelaxante	Partes aéreas	O extrato hidroalcoólico apresentou ação vasorelaxante ao ser testado em aortas torácicas de ratos. Essa ação foi atribuída a presença de fenóis e triterpenos.	Wongsawatkul <i>et al.</i> 2008; Prachayasittikul <i>et al.</i> 2009

Fonte: Autor.

Dentre as atividades, os efeitos analgésicos, antimicrobiano, anti-inflamatório, anestésico podem ser aproveitados na prática odontológica, em alguns casos, apresentando o desenvolvimento de bioprodutos como colutórios orais e mucoadesivos.

A exemplo, um mucoadesivo desenvolvido contendo extratos hidroalcoólicos a 95% das partes aéreas de *A. oleracea*. Este adesivo foi desenvolvido com concentrações de extrato à 10 e 20%. Nos testes *in vivo* e *in vitro* o adesivo com 10% de extrato apresentou melhor permeabilidade e maior perda da nocicepção comparado ao produto com 20%. O adesivo contendo 10% apresentou concentrações maiores de terpenos, substância encontrada nos extratos da planta e que pode estar associada à maior capacidade de difusão da droga (SANTANA DE FREITAS-BLANCO *et al.*, 2016).

O extrato aquoso de *A. oleracea* apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória *in vivo*. Na dose de 400 mg/kg alcançou 65.6% de proteção analgésica e inibiu em 56.1% o edema (CHAKRABORTY *et al.*, 2004). Em testes antimicrobianos, o extrato das flores obtido através de éter de petróleo foi testado frente a patógenos relacionados as infecções endodônticas, tais como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*. Foram feitos testes comparando o hidróxido de cálcio (medicamento intracanal) ao extrato nas concentrações de 0.1%; 0.4%; 1%; 1.6%; 2%; 5% e 10%. Frente a *Candida albicans*, todas as concentrações testadas demonstraram inibição significativa ($p < 0,05$), enquanto o grupo controle (Hidróxido de cálcio) apresentou inibição apenas na concentração de 10%. Diante da *Enterococcus faecalis*, diferenças significativas com o grupo controle foram encontradas nas concentrações 2; 5 e 10%. *Streptococcus sp* e *Staphylococcus aureus* apresentaram diferença significativa nas concentrações 5 e 10%, sendo nestas concentrações superior a ação do hidróxido de cálcio (SATHYAPRASAD; JOSE; CHANDRA, 2015).

Diante de bactérias cariogênicas, o extrato metanólico das folhas de *A. oleracea* a 80% inibiu o crescimento de *Streptococcus sobrinus*, *mutans*, *mitis*, *sanguis* e *Lactobacillus casei*. No teste de disco-difusão não foram observados halos de inibição na concentração de 500 mg/mL, única concentração testada. Entretanto, no teste de Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) o extrato inibiu nas concentrações de 125 mg/ml (*S. mutans* e *L. casei*) e 250 mg/ml (*S. mitis*, *S. sanguinis* e *S. sobrinus*) (CONDE *et al.*, 2015).

Por outro lado, nos estudos antimicrobianos utilizando extratos vegetais, alguns parâmetros devem ser estabelecidos a fim de se comparar os resultados obtidos. Informações como o tipo de material vegetal, a técnica empregada e o microrganismo a ser testado devem ser padronizados com a finalidade de replicações e possíveis comparações futuras.

Segundo Ríos e Recio (2005), todas as espécies devem ser perfeitamente identificadas e descritas, incluindo dados da coleta, como localização, estação do ano, dia e hora. Tal como a planta, as padronizações dos métodos extrativos e identificação fitoquímica também são necessárias. Elas têm como objetivo obter informações sobre os compostos químicos presentes no material vegetal, assim como avaliar a presença de metabólitos secundários com possíveis atividades terapêuticas. Extratos etanólicos, hidroalcoólicos e metanólicos são os mais utilizados na medicina popular e nos laboratórios de pesquisa.

3.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (UHPLC-ESI-QTOF-MS)

Para definir atividades farmacológicas, é necessário identificar e separar as moléculas bioativas encontradas em plantas medicinais. Técnicas robustas são utilizadas a fim de se obter informações da composição química com a perspectiva do desenvolvimento de novos medicamentos e de aprovação regulatória (NARAYANAM *et al.*, 2014).

Estas análises melhoram a compreensão dos bioativos presentes nas drogas vegetais e são responsáveis pela descoberta de novas substâncias com ações terapêuticas. Assim como, investigações fitoquímicas através de técnicas cromatográficas avançadas podem apresentar novas substâncias de plantas já investigadas (CHENG *et al.*, 2015).

A cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (CLUE ou *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) é uma técnica analítica utilizada para identificar, separar e quantificar constituintes dentro de uma mistura. A técnica UHPLC foi lançada ao mercado em 2004 sendo desenvolvida pela empresa Waters® (NAHAR; SARKER, 2019).

É a melhor técnica de escolha dentre todas as técnicas hifenizadas, devido a sua alta sensibilidade e sua facilidade de uso. Além disso, possui potencial para fornecer caracterização inequívoca das mais diversas estruturas fitoquímicas (NARAYANAM *et al.*, 2014).

Em teoria, o poder de detecção de um sistema UHPLC é cerca de 2 a 3 vezes maior que um HPLC, dependendo do detector utilizado (SWARTZ, 2005; NGUYEN *et al.*, 2006; NOVÁKOVÁ; SOLICHOVÁ; SOLICH, 2006).

Apesar de sua excelência na separação e quantificação de componentes em concentrações extremamente baixas, a técnica HPLC está sujeita à imprecisão por se utilizar apenas do tempo de retenção para a identificação de analitos. O tempo de retenção é uma característica dos analitos e, dependendo da técnica cromatográfica empregada, outros

compostos podem apresentar valores semelhantes. O acoplamento a espectrometria de massas tornou a técnica mais versátil e robusta, sendo possível a quantificação e qualificação das amostras (LANÇAS, 2009).

Durante os séculos XX e XXI a técnica foi constantemente aprimorada, sendo desenvolvido novos mecanismos de identificação e ionização, aumentando assim sua precisão e aplicabilidade nas mais diversas áreas do conhecimento.

Dentre as possibilidades de fragmentação na espectrometria de massas, a ionização por *eletrospray* (ESI) têm se demonstrado uma técnica muito rápida e versátil para a avaliação de compostos orgânicos e inorgânicos de origem vegetal. Com a necessidade de pouca preparação da amostra, permite a precisa identificação em extratos vegetais (BAE *et al.*, 2010; SCHIOZER *et al.*, 2012).

A sensibilidade aumenta ainda mais quando é associada a detectores por quadrupolo em modo positivo e negativo. Isso ocorre, pois, alguns compostos podem ser confirmados pela presença de fragmentos diagnósticos (valores exatos da relação carga/massa) e/ou por perdas neutras na espectrometria de massas/massas (LI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

O próprio aparelho apresenta parâmetros de qualificação. O mSigma é um valor de precisão de identificação e robustez das amostras. Quanto menor o valor de mSigma (menor que 50), mais preciso será o resultado analítico. Este valor não é expresso em %, mas o valor de 50 mSigma (0.05 Sigma) é próximo a definição de 5%, valor utilizado em alguns estudos usando esta técnica de avaliação (PELANDER *et al.*, 2011; RÍOS, ROCA, PÉREZ-GÁLVEZ, 2015).

Estas técnicas acopladas permitem que os operadores lidem com as dificuldades analíticas associadas a separação, identificação e quantificação de diversas classes de metabólitos secundários de forma mais rápida. Sua capacidade em trabalhar com compostos instáveis ou insuficientemente voláteis fez com que estas fossem utilizadas para a separação de uma ampla gama de produtos químicos, farmacêuticos, alimentícios, biológicos e produtos industriais pesados (BÉLANGER; JOCELYN PARÉ, 1997; NAHAR; ONDER; SARKER, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Digluconato de clorexidina foi obtido da Rioquímica S.A. (São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), Álcool etílico absoluto ($\geq 99.9\%$) da Dinâmica Química Contemporânea Ltda.[®] (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Resazurina, cristal violeta e ácido fórmico da Sigma-Aldrich[®] (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América). Caldo Triptona Soja (TSB), Agar Infusão Cérebro Coração (BHI) e Agar Mueller-Hinton foram adquiridos da Kasvi[®] (Liofilchem, China). Acetonitrila, gradiente para o UHPLC ($\geq 99.9\%$) e metanol da Labbox Labware S. L. (Espanha).

4.2 ÁREA DE COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As mudas de *A. oleracea* (Jambu) amapaense e paraense foram obtidas no Distrito da Fazendinha – AP (Figura 5), nas coordenadas Lat.: 00° 02' 12" S Long.: 51° 06' 39" W no período da manhã entre os meses de abril e maio de 2018.

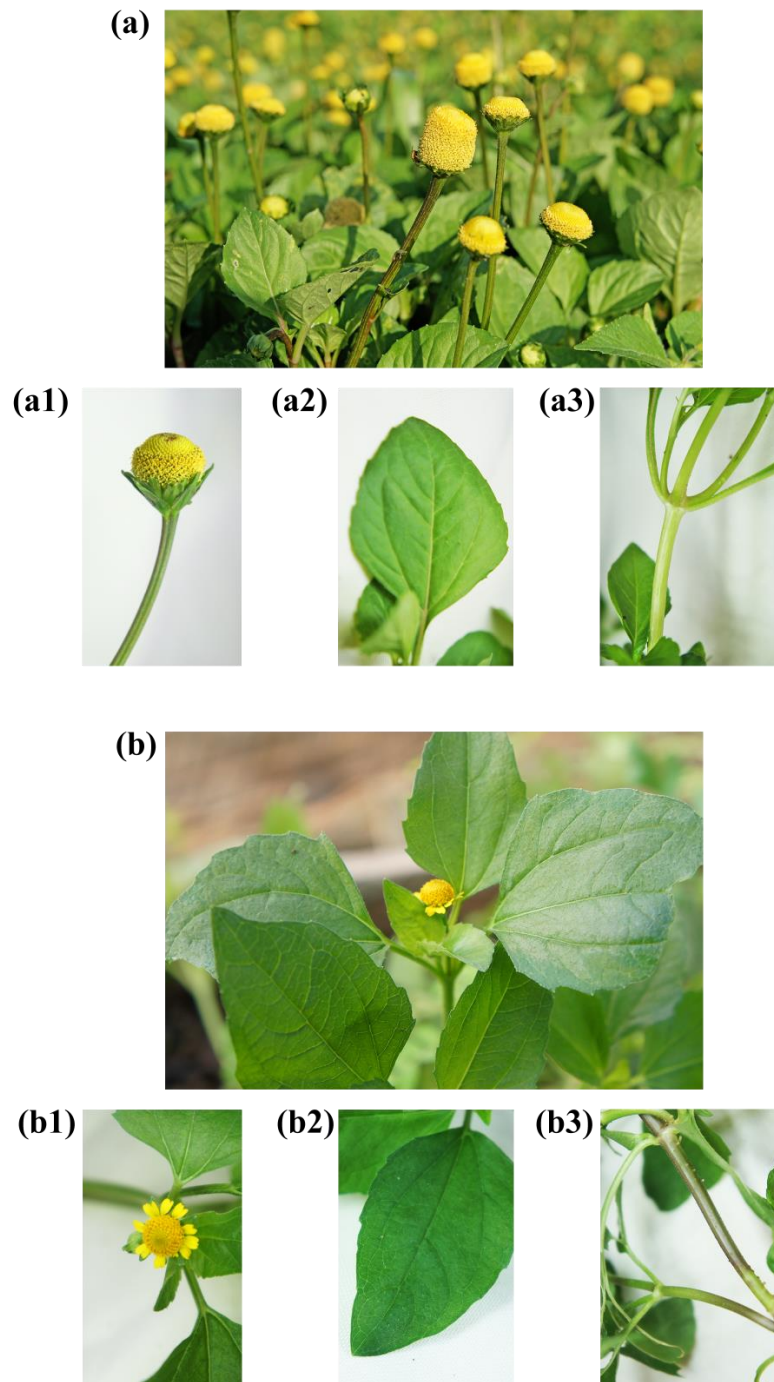
Figura 5 – Área de coleta do material vegetal realizado no Distrito da Fazendinha, Macapá-AP: (a) vista frontal e (b) imagem por satélite.



Fonte: Autor (a); adaptado de Google Earth (acesso em 19. abril. 2020) (b).

Foram coletadas mudas das variações regionais da planta, paraense e amapaense (Figura 6). A paraense teve seu cultivo iniciado no estado do Pará, porém foi trazida ao estado do Amapá. Algumas variações regionais apresentam características fisiológicas diferentes, entretanto, por deficiência de dados taxonômicos, não possuem caracterização de subespécie (JANSEN, 1985; SILVA, SANTOS, 2011).

Figura 6 – *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen. Diferença entre as flores, caules e folhas das variações regionais paraense e amapaense.



(a) *Acmella oleracea* variação paraense. Suas flores (a1) são amarelas e arredondadas, folhas (a2) com características ovais e dentadas, e seu caule (a3) de cor verde. (b) *Acmella oleracea* variação amapaense. Flores (b1) amarelas e de formato cilíndrico, folhas (b2) lanceoladas e dentadas, e caule (b3) de cor verde e roxa. Características definidas a partir das descrições de Jansen (1985).
 Fonte: Autor.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E REGISTRO DAS EXSICATAS

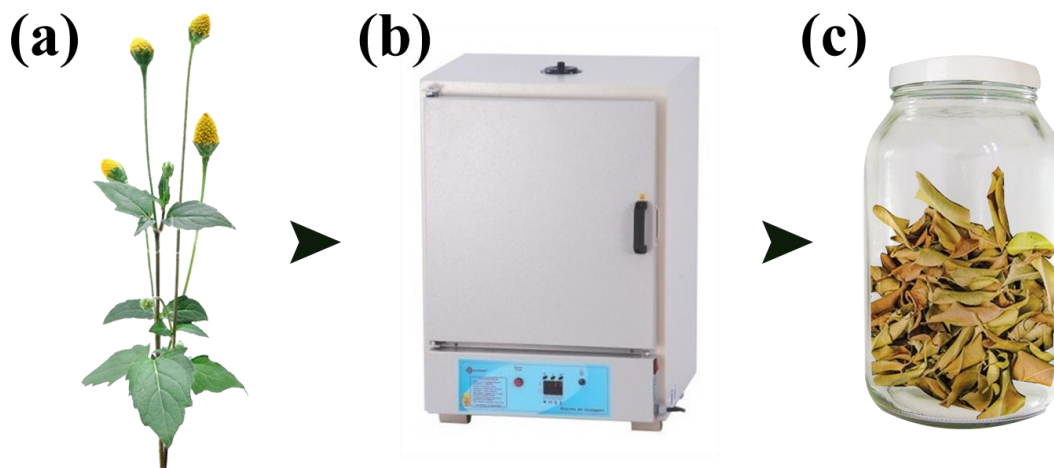
As exsicatas obtidas na coleta foram identificadas e depositadas no Herbário Amapaense - HAMAB/Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA. Três mudas de cada uma das variações regionais foram entregues ao herbário, das quais foram identificadas como *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (sob o registro 05.VII.2019, P. PERETTI, 01 e 02, ANEXO A.).

A espécie também foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A0A8024 (ANEXO B).

4.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Após a coleta, as amostras foram lavadas e secas em estufa microprocessada (Quimis – Q317) a 50°C durante três dias. Após desidratadas as partes das plantas foram pesadas e armazenadas em um frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado (Figura 7).

Figura 7 – Etapas de preparo do material vegetal.



(a) Mudas frescas de *A. oleracea* que após a coleta foram lavadas. **(b)** as mudas foram inseridas em uma estufa microprocessada a 50°C onde permaneceram por 3 dias para a completa secagem do material vegetal. **(c)** secas, as partes das plantas foram separadas e armazenadas em frascos de vidro hermeticamente fechados.

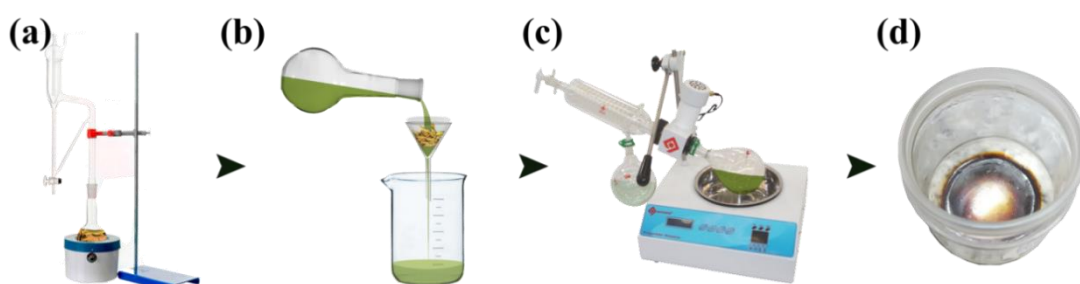
Fonte: Autor.

4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O processo extrativo foi realizado no Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Os extratos brutos aquosos das folhas de *A. oleracea* amapaense (EBA FolAP) e paraense (EBA FolPA) foram obtidos a partir do decoctos da técnica de hidrodestilação para obtenção de óleos essenciais (óleos estes

que não foram utilizados nesta pesquisa). As folhas desidratadas foram pulverizadas (Quimis – Q298A) em moinho de faca, depositadas em um aparelho Clevenger contendo água destilada em uma proporção de 200 mg/mL, sendo submetidas à hidrodestilação a 100°C durante 3h (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). O decocto obtido foi submetido à filtração em papel de filtro (Qualy-Prolab[®]), rotaevaporado (Quimis – Q344B) a 60°C por 1h e colocado sob pressão de ar com um secador de cabelo até a evaporação máxima do solvente (Figura 8).

Figura 8 – Etapas de obtenção do extrato aquoso a partir dos decoctos da hidrodestilação.

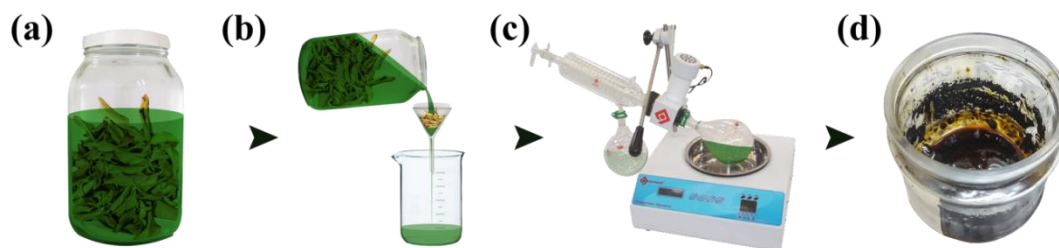


(a) As folhas secas, acrescidas de água destilada foram inseridas em um aparelho Clevenger a 100 °C durante 3h, esse processo foi realizado para a obtenção de óleos essenciais (óleos que não foram utilizados na atual pesquisa). **(b)** O resíduo remanescente foi filtrado com discos de papel. **(c)** O decocto foi rotaevaporado a 60°C por 1h. **(d)** Extrato aquoso após a pressão de ar com secador de cabelo.

Fonte: Autor.

Os extratos brutos hidroalcoólicos foram obtidos por maceração. Folhas das variações paraense (EBE FolPA) e amapaense (EBE FolAP); e seus caules (EBE CauPA e EBE CauAP, respectivamente) foram separados, pulverizados em moinho de faca (Quimis – Q298A) e colocados em um recipiente de vidro hermeticamente fechado em contato com álcool 70% em proporções de 25 mg/mL (folhas) e 50 mg/mL (caules) durante 3 dias. Este processo foi repetido até a completa exaustão extrativa, determinada pela limpidez do solvente. O macerado foi filtrado em papel de filtro, rotaevaporado a 50°C por 1h e colocado sob pressão de ar com um secador de cabelo até a completa eliminação do solvente (Figura 9). Por último, todos os extratos tiveram seu peso e rendimento determinados

Figura 9 – Etapas de obtenção do extrato hidroalcoólico a 70%.



(a) Processo de maceração à frio realizado com álcool 70% durante 3 dias. **(b)** O macerado foi filtrado com discos de papel. **(c)** Rotaevaporação a 50°C por 1h **(d)** Extrato hidroalcoólico após a após a pressão de ar com secador de cabelo.

Fonte: Autor.

O rendimento extrativo (em %) foi obtido através da razão entre o peso do extrato bruto obtido e do peso da droga vegetal seca antes do processo de extração (Equação 1).

Equação 1 – Equação para obtenção do rendimento extrativo. No cálculo são utilizados os valores de peso do extrato bruto (mg) e peso da droga vegetal seca (mg).

$$\text{Rendimento extrativo (\%)} = \frac{\text{Peso do extrato bruto (mg)} \times 100 (\%)}{\text{Peso da droga vegetal seca (mg)}}$$

4.6 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (UHPLC-ESI-QTOF-MS)

Os extratos foram enviados para análise na Unidade de Proteômica e Espectrometria de Massa da Rede de Infraestrutura de Apoio à Investigação e ao Desenvolvimento de Tecnologias da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Foram realizadas análises por Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS) de todos os extratos obtidos.

Um sistema HPLC (Elute[®] da Bruker) acoplado a um ionizador por *electrospray* e um detector do tipo *time off flight* (timsTOF[®] da Bruker). A coluna utilizada foi uma C18 (100 x 2.1mm, com o tamanho de partículas de 2,6 µm e 100 Å de comprimento de poro e um filtro in-line de 0.5µm x 0,004 de porosidade) de fase reversa da Kinetex[®] (Phenomenex[®]). Uma eluição por gradiente foi realizada com a fase móvel variando de 95% A e 5% B (Quadro 2) até as concentrações inversas, onde A: água contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico e B:

acetonitrila contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico. Previamente a análise os extratos foram redissolvidos em etanol a 95% na proporção 1:140 (m/v). A análise foi realizada em uma razão de fluxo 0,3 ml/min, volume de injeção de 2µl, durante 16 minutos.

Quadro 2 –Tempo de eluição do gradiente no UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS.

Tempo (min)	%A*	%B**
0.0	95.0	5.0
0.40	95.0	5.0
0.50	65.0	35.0
7.00	0.0	100.0
12.00	0.0	100.0
12.10	95.0	5.0
15.00	95.0	5.0

*A: Água contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico; **B: Acetonitrila contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico.

A detecção espectrométrica de massas foi realizada com íons em modo positivo na faixa de varredura de 50-1000 m/z. A temperatura capilar foi de 200°C, a pressão da bainha de gás foi de 2.5 Bar e a tensão das lentes capilar e tubular foram de 4500 V. A quantificação foi baseada no conteúdo sólido dissolvido em cada extrato e na respectiva área de cada um dos analitos.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS EXTRATOS FRENTE AO *Streptococcus mutans*

4.7.1 Cultivo e padronização do inóculo

As cepas do *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foram inoculadas em microanaerobiose (37°C e 5% CO₂) durante 18h. O inóculo foi preparado tomando-se de 3 a 4 colônias da cepa isolada em meio BHI ágar, sendo diluídos em solução salina a 0,85% até atingirem a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, contendo aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) (NCCLS, 2006).

4.7.2 Ensaio microbiológico com os extratos

O ensaio foi realizado no Laboratório de Biotecnologia em Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP. A avaliação antibacteriana dos extratos

hidroalcoólicos de *A. oleracea* foi realizada através do método de microdiluição em placas (NCCLS, 2006). Foram preparadas soluções hidroetanólicas a 500 µg/mL de cada um dos extratos para realização dos ensaios. Foram utilizados como controles o digluconato de clorexidina a 0,12% (controle positivo), solução salina estéril e solução hidroetanólica a 12,5% (veículo) como controles negativos e caldo BHI estéril sem inóculo (controle de esterilidade). Para determinação da CIM, diluições em série (250 a 3,90 µg/mL) dos extratos foram efetuadas em caldo BHI estéril em microplaca estéril de 96 poços. Nos poços iniciais foram inseridos 90 µL de caldo BHI estéril, 10 µL do inóculo ajustado e 100 µL do extrato. A placa foi incubada a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas, sendo em seguida adicionados 20 µL de resazurina a 0,02%, sendo re-incubada durante 1h para a verificação da viabilidade dos microrganismos por mudança de coloração (ARAUJO; LONGO, 2016). A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano (NCCLS, 2006), perceptível pela ausência de turbidez e coloração azul após a adição de resazurina. A concentração bactericida mínima foi definida como a concentração mínima do agente testado capaz de matar a maioria ($\geq 99.9\%$) dos microrganismos viáveis após incubação (NCCLS, 2006). Para determinar a CBM, alíquotas de 10 µL obtida a partir da CIM e dos dois poços não turvos imediatamente acima, foram semeadas em placas de Ágar Mueller-Hinton, incubadas a 37°C durante 48h. A menor concentração com ausência de colônias na superfície do ágar foi utilizada para se determinar a CBM. Os mesmos procedimentos foram realizados com os grupos controles. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8 ATIVIDADE ANTIBIOFILME

A atividade antibiofilme frente ao biofilme pré-formado de *S. mutans* foi determinado através do ensaio de cristal violeta (STEPANOVIC *et al*, 2004). O inóculo foi preparado da mesma maneira do teste CIM e CBM. Para a formação do biofilme, o caldo BHI estéril suplementado com 0,5% glicose e o inóculo ajustado na escala 0,5 de McFarland foram transferidos para uma placa de 96 poços nas mesmas proporções do teste anterior. A placa foi incubada a 37°C e 5% CO₂ por 24h com o intuito de formação do biofilme no fundo de cada poço. Após este período, as placas foram agitadas a 200 rpm por 5 min em um agitador orbital (Shaker®) para a remoção de biofilme pouco aderido. Os biofilmes aderidos foram testados com os extratos hidroalcoólicos em concentrações de 500 (4xCIM), 1000 (8xCIM) e 2000 µg/mL (16xCIM), digluconato de clorexidina a 0,12% (controle positivo), solução salina estéril e solução hidroetanólica a 12,5% (veículo) como controles negativos e caldo BHI

estéril sem inóculo (controle de esterilidade) por 1 min e imediatamente lavados por três vezes com solução salina estéril. Subsequentemente os biofilmes foram fixados com metanol e secados à temperatura ambiente por 15 min, corados com cristal violeta a 0,1% e lavados por três vezes com solução salina estéril. O corante não aderido foi removido através de três lavagens com solução salina estéril. Uma mistura de etanol-acetona (4:1) foi usada para dissolver o biofilme aderido. A absorbância dos poços foi determinada em um leitor de placa Elisa (NOVA NI 1800) a $\lambda=570$ nm. O valor médio de absorbância dos poços sem o inóculo, bem como os poços contendo apenas o tratamento com o veículo, foram utilizados para a correção.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A equação a seguir foi utilizada para calcular a porcentagem de viabilidade (Equação 2). A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prisma 5.0 usando o teste ANOVA com Tukey Pos-Test com 95% de confiança.

Equação 2 – Equação para cálculo da porcentagem de viabilidade celular nos ensaios antibiofilme, são utilizados os valores das densidades óticas da solução salina e amostras. A absorbância foi determinada em um leitor de placas Elisa no comprimento de onda de 570 nm.

$$Viabilidade\ do\ Biofilme\ \% = 100 - \left(\frac{D.O.S.S. - D.O.\ Amostra}{D.O.S.S} \times 100 \right)$$

D.O.S.S.: Densidade ótica da solução salina após a correção.

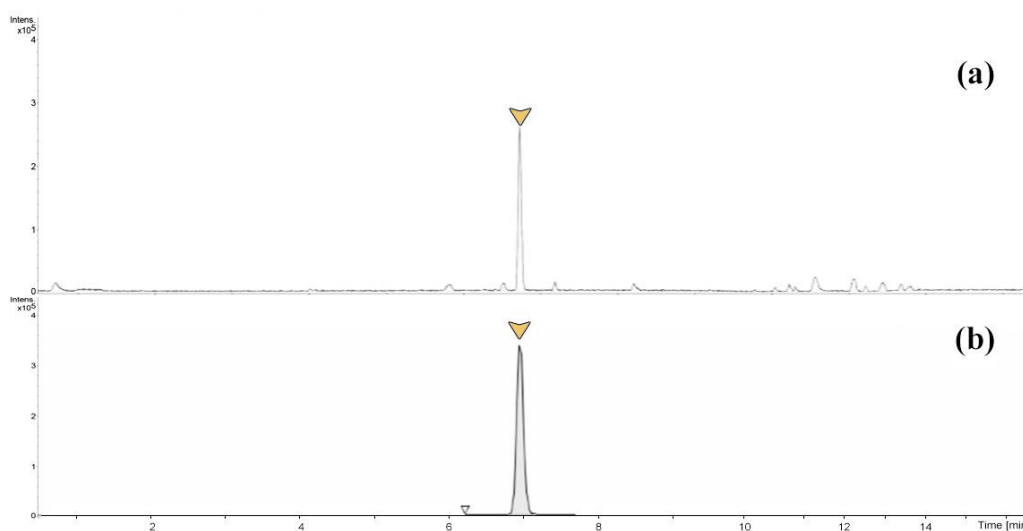
D.O. Amostra: Densidade ótica da amostra após a correção.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE *A. oleracea*

Nas análises por UHPLC-ESI-QTOF-MS foram identificados picos da molécula espilantol ou (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida em todas as amostras. Em todos os extratos foram obtidos espectros demonstrando o pico e a razão m/z deste composto bioativo. Os espectros obtidos foram comparados com o espectro simulado (Compass HyStar, Bruker®), utilizado como referência. A Figura 10 (a) apresenta o cromatograma da amostra EBE FolPA, onde o pico do espilantol é identificado em 6,9 minutos e coincide com grande exatidão com o cromatograma simulado (Figura 10b).

Figura 10 – Cromatogramas da amostra EBE FolPA (a) e do simulado (b) obtidos pela biblioteca do HPLC-ESI-QTOF-MS, estes confirmaram a presença do metabólito secundário majoritário espilantol em 6,9 minutos de tempo de retenção. Os parâmetros da técnica cromatográfica estão descritos no tópico 4.5.



Fonte: Autor.

Sabe-se que o tempo de retenção de uma molécula varia de acordo com as condições da análise e da técnica cromatográfica utilizada. Para o espilantol, Anholetto *et al.* (2017) obtiveram um tempo de retenção de 41,9 min utilizando a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). Bae *et al.* (2010) alcançaram um tempo de retenção de 4,97 min utilizando cromatografia líquida – com ionização por *electrospray* - acoplada ao espectrômetro de massas, porém com o detector de fotodiodo. Nesta metodologia utilizada

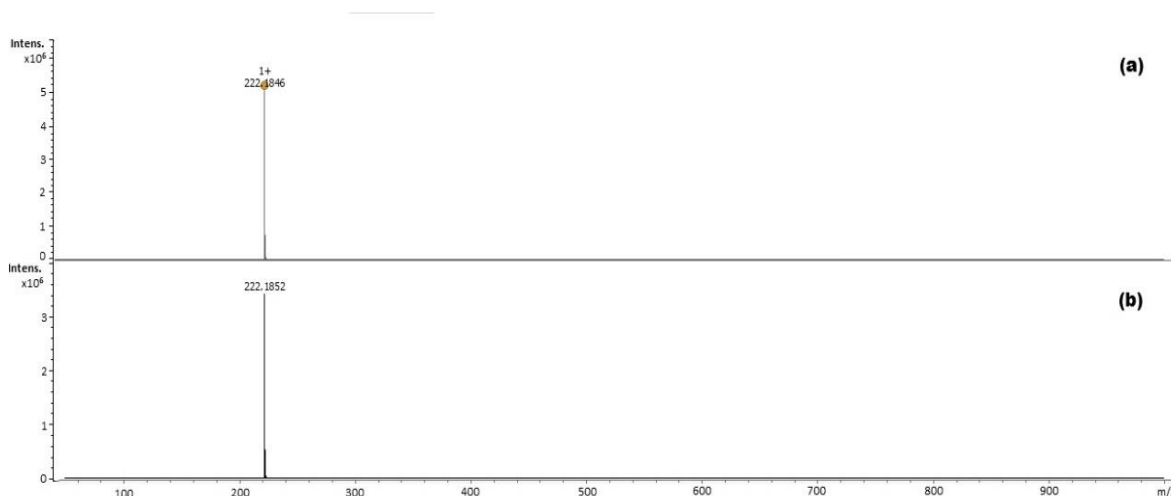
por Bae *et al.* (2010), também foi utilizada uma coluna C18, porém com o diâmetro de 50 x 2.1 mm, este fator pode ter interferido no tempo de retenção entre as amostras.

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para a identificação de alquilamidas na espécie *A. oleracea*, dentre as quais: ressonância magnética nuclear, cromatografias em fase gasosa e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Diferentemente destas, o método UHPLC pode ser utilizado em extratos brutos, facilitando a identificação de constituintes minoritários, ademais, a elevada pressão exercida nas amostras durante o método, facilita a identificação e reduz o tempo de trabalho (MOLINA-TORRES; GARCIA-CHAVEZ; RAMIREZ-CHAVEZ, 1999; BAE *et al.* 2010; DUBEY *et al.*, 2013; NAHAR; ONDER; SARKER, 2019).

Também foram identificados através da técnica UHPLC-ESI-QTOF-MS os picos correspondentes ao d-limoneno em todas as amostras. Foram identificados com o tempo de retenção médio de 10,42 min. Por outro lado, todas as amostras não obtiveram dados qualitativos de mSigma satisfatórios, ou seja, a molécula foi identificada apenas qualitativamente devido a sua presença em níveis muito baixos.

Outro fator positivo da técnica é o acoplamento ao espectrômetro de massas, isto permite obter traços de razão carga/massa, o que aumenta a exatidão na identificação das moléculas. Ao espilantol foi atribuída uma razão m/z de 222,1846 (Figura 11a), muito semelhante ao encontrado no espectro padrão (222,1852) (Figura 11b). O d-limoneno obteve uma razão m/z 137,1323 (137,1325).

Figura 11 – Espectros do espilantol demonstrando o pico da razão m/z . (a) Espectro de massas do espilantol presente no extrato EBE FolPA demonstrando razão m/z de 222,1846. (b) Espectro de massas do espilantol simulado demonstrando razão m/z de 222,1852.

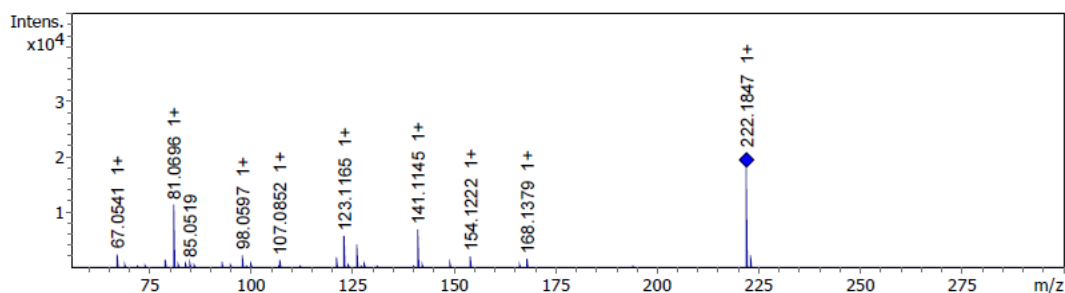


Fonte: Autor

A literatura especializada relata uma razão m/z de 221 (RAJENDRAN, et al., 2017); 222 (BOONEN *et al.*, 2010; NOMURA *et al.*, 2013; CRUZ *et al.*, 2016); e 222.2 (BAE *et al.*, 2010; SINGH, CHATURVEDI, 2012) como correspondente a massa total do espilantol. Dados estes que se aproximam ao valor de 222,1846 obtidos como massa total da molécula majoritária das amostras de *A. oleracea*, sugerindo que este corresponda ao espilantol. Segundo LANÇAS (2009), inexistente na literatura tamanha aproximação dos picos (traços com valores superiores a quatro casas decimais) para a referida molécula, o que demonstra a acurácia da técnica aplicada.

O UHPLC-ESI-QTOF-MS possibilitou ainda obter diferentes fragmentos a partir da análise de íons do produto (Figura 12). Os fragmentos razão m/z 67; 81; 98; 107; 123 e 141 sugerem produtos do espilantol [(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida], enquanto o fragmento de razão m/z 98 sugere um isocianato de isobutila (C_5H_9NO) (BAE *et al.*, 2010; SINGH, CHATURVEDI, 2012).

Figura 12 – Espectro demonstrando os fragmentos da molécula espilantol ou (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida obtidos a partir da amostra EBE Fol**PA**.



Fonte: Autor

Dos fragmentos obtidos do espilantol, o pico razão m/z 123 sugere o fragmento de cadeia alquila da molécula espilantol, obtido através da ruptura na ligação simples do carbono alfa-carbonila e o carbono carbonílico, correspondente ao fragmento C_9H_{15} (HISERODT *et al.*, 2004; BAE *et al.*, 2010). Varreduras em modo positivo também apresentam o fragmento de razão m/z 98, apresentando-se como uma isobutilamida em varreduras deste tipo (JACOBSON, 1957).

A razão massa/carga e o tempo de retenção foram os mesmos para todas as amostras, confirmando a viabilidade e robustez da técnica para detecção precisa desta alquilamida.

5.2 DADOS SEMI-QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS DAS AMOSTRAS DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN

Na Tabela 1 estão listados os dados obtidos dos extratos aquosos. O rendimento global do EBA Fol**PA** (84,8%) foi mais do que o dobro do rendimento da amostra EBA Fol**AP** (41,1%). Por outro lado, a amostra EBA Fol**AP** apresentou valores percentuais de espilantol (96,10%) superiores a amostra EBA Fol**PA** (93,98%). Ambas as amostras apresentaram valores muito aproximados de tempo de retenção e razão m/z (Tabela 1), o que demonstra precisão na identificação da molécula. Ademais, o valor de $mSigma < 50$ atende satisfatoriamente aos padrões de qualidade (Tabela 1) (PELANDER *et al.*, 2011). Nestas amostras foram identificadas moléculas de d-limoneno, porém, não atenderam aos parâmetros qualitativos ($mSigma > 50$).

Na literatura não há relato de rendimento e quantificação de extração aquosa, sendo esta aproximação pioneira neste sentido, permitindo a comparação com a extração hidroetanólica. Sabe-se que diferentes fatores podem interferir no processo extrativo tendo direta influência sobre o rendimento, seja pelo solvente utilizado, pela parte da planta avaliada

(ABEYSIRI *et al.*, 2013; FRANCA *et al.*, 2016), pela concentração do solvente (BAE *et al.*, 2010) ou pelo método empregado (FRANCA *et al.*, 2016).

Um fator de menção é a viscosidade dos extratos, assim como o rendimento elevado, os extratos aquosos de ambas as variações regionais apresentaram-se mais viscosos. Esta viscosidade é um possível indicativo de ceras. A técnica de hidrodestilação requer elevadas temperaturas (cerca de 100°C) o que facilita a sua solubilização. Extratos aquosos também são mais propensos a obter compostos hidrofílicos de peso molecular elevado, como glicoproteínas e polissacarídeos. Todas estas condições levam a um maior rendimento global (STASHENKO; PUERTAS; COMBARIZA, 1996; LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005; DIAS *et al.*, 2012).

Comparado aos achados literários, as amostras de extratos aquosos apresentaram dados superiores em rendimento, entretanto, com valores expressivamente inferiores em disponibilidade de espilantol (Tabela 1 e 2).

Utilizando a solução hidroetanólica a 70%, o rendimento da amostra EBE Fol**AP** (25,32%), foi maior que a EBE Fol**PA** (15,84%). Se tratando do caule, a amostra EBE Cau**AP** (26,66%) também apresentou um rendimento superior ao EBE Cau**PA** (15,91%) (Tabela 2).

A amostra EBA Fol**AP** apresentou rendimento (41,1%) 1.6 vezes maior ao encontrado na amostra EBE Fol**AP** (25,32%), da mesma forma, a amostra EBA Fol**PA** apresentou rendimento (84,8%) cerca de 5.3 vezes maior que a amostra EBE Fol**PA** (15,84%) (Tabela 2).

Estes dados sugerem que dentro dos métodos extrativos testados, dos solventes utilizados e das técnicas empregadas, o extrato aquoso pode apresentar rendimentos extrativos superiores ao solvente hidroalcoólico a 70%.

Dentre as folhas, Simas *et al.* (2013) coletaram mudas de *A. oleracea* no município de Monte Alegre, Pará-Brasil, realizaram a maceração a frio das folhas utilizando etanol absoluto e obtiveram percentuais extrativos (13,20%), corroborando com os dados obtidos (Tabela 2). O estado do Pará foi a região de cultivo inicial da variação regional paraense, onde passou por modificações germinativas e fisiológicas para chegar à forma que é encontrada hoje. Os dados de rendimento supõem que a variação regional paraense pode manter o rendimento extrativo utilizando a mesma técnica e solvente, mesmo cultivada em localidades diferentes de sua origem, mas que contenham o mesmo clima e proximidade nos níveis de precipitação (DE SOUZA *et al.* 2016).

Tabela 1 - Dados qualitativos e semi-quantitativos das amostras EBA FolAP e EBA FolPA. Os dados foram obtidos pelo HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, sendo feita a identificação do constituinte majoritário espilantol (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida).

Amostra	Rendimento Global (%)	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração em ppm± DP	Teor (%)	m/z mensurado	m/z padrão	mSigma
EBA Fol AP	41,1	6,97	79276	47,08 ± 3,17	96,10	222,1848	222,1852	10,15
EBA Fol PA	84,8	6,98	217389	29,35 ± 1,65	93,98	222,1851	222,1852	9,55

m/z: Razão carga/massa; min: Minutos; DP: Desvio Padrão.

Fonte: Autor

Tabela 2 - Dados qualitativos e semi-quantitativos das amostras de extratos hidroalcoólicos de *A. oleracea* a 70%. Os dados foram gerados pelo HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, sendo feita a identificação do constituinte majoritário espilantol (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida).

Amostra	Rendimento Global	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração em ppm± DP	Teor (%)	m/z mensurado	m/z padrão	mSigma
EBE Fol AP	25,32	6,97	603219	11,72 ± 0,16	98,55	222,1846	222,1852	4,7
EBE Fol PA	15,84	6,97	21727308	11,32 ± 0,01	99,97	222,1846	222,1852	9,2
EBE Cau AP	26,66	6,97	149775	35,40 ± 1,02	99,17	222,1850	222,1852	4
EBE Cau PA	15,91	6,97	2109548	17,76 ± 0,34	98,83	222,1851	222,1852	6,5

m/z: Razão carga/massa; min: Minutos; DP: Desvio Padrão.

Fonte: Autor

Os valores obtidos como o tempo de retenção, o pico de área e os valores de mSigma estão presentes nas Tabelas 3 e 4.

O parâmetro mSigma é calculado a partir da comparação de dois picos: pico simulado e pico da molécula alvo no escaneamento completo (Figura 10), gerando um fator de correspondência baseado no desvio das intensidades dos sinais (RÍOS, ROCA, PÉREZ-GÁLVEZ, 2015).

O valor mais elevado presente nas amostras averiguadas foi de 10,15 (EBA Fol**AP**) atendendo satisfatoriamente aos padrões de qualidade (mSigma <50), demonstrando, portanto, a confiabilidade dos resultados (Tabelas 3 e 4) (PELANDER *et al.*, 2011). Os valores obtidos pela molécula d-limoneno foram acima deste parâmetro estabelecido.

A presença estimada de espilantol pôde ser determinada em todas as amostras. Os dados mostram que a concentração de espilantol diferiu entre as duas variações regionais, partes da planta e os solventes utilizados (Tabelas 3 e 4). O maior percentual de espilantol encontrado foi na amostra EBE Fol**PA** (99,97%), seguido pela EBE Cau**AP** (99,17%).

Comparando as variedades regionais foi observado que dentre os extratos aquosos, apesar do menor rendimento alcançado, o extrato EBA Fol**AP** (96,10%) apresentou concentração de espilantol superior ao EBA Fol**PA** (93,98%). Igualmente, apesar do menor rendimento, o extrato EBE Fol**PA** (99,97%) apresentou percentual de espilantol superior a amostra EBE Fol**AP** (98,55%). Por outro lado, dentre os extratos hidroalcoólicos obtidos do caule, a amostra EBE Cau**AP** (99,17%) apresentou teor de espilantol ligeiramente superior ao extrato EBE Cau**PA** (98,83%), ainda que o seu rendimento tenha sido bastante superior.

Esta espécie é rica em compostos fenólicos e alquilamidas, moléculas que possuem grande afinidade com solventes como o etanol e metanol. Esta interação entre solvente e molécula supostamente interferiu na maior concentração de espilantol em solução hidroetanólica, apesar dos menores rendimentos alcançados (LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005).

No estudo de Bae *et al.* (2010) um teor de 97% foi obtido utilizando como técnica extrativa a maceração em etanol a 75%, valores próximos, porém inferiores aos teores alcançados neste estudo. Estes dados ratificam que nestas técnicas extrativas o solvente hidroalcoólico possa apresentar melhor afinidade extrativa para as alquilamidas em comparação ao solvente aquoso (DIAS *et al.*, 2012).

Os bons rendimentos e concentrações de espilantol encontrados poderiam ser justificados por três motivos, sugere-se: clima e solo favoráveis para o cultivo da *A. oleracea*; o período de plantio e coleta das amostras; e o ambiente de semeadura. Segundo Cardoso e

Garcia (1997) o clima amazônico com temperaturas e umidade relativa do ar elevada, assim como o solo umidificado, são fatores favoráveis para o crescimento da planta. Este ambiente estimula o desenvolvimento sadio e consequentemente o aumento dos seus metabólitos. Outro fator favorável foi o período de plantio e coleta das mudas, ocorrido entre os meses de abril e maio, que segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (2019) foram os meses com os maiores índices pluviométricos do ano de 2018. O período de chuvas gera um estresse hídrico e aumenta a umidade do solo, fator favorável para o desenvolvimento das mudas.

Por último, as plantas até então estudadas foram obtidas em solos e regiões de plantio aberto. Estes fatores geram um ambiente de estresse pelo contato com outras espécies de vegetais, animais e pragas, estimulando mecanismos de defesa natural, o que pode elevar os índices de metabólitos secundários.

A espécie *A. oleracea*, diante de sua excelente adaptação, possui papel importante na cultura e culinária dos estados da Amazônia brasileira, sendo fonte de insumo de grande parcela de famílias que vivem da agricultura de subsistência.

5.3 ATIVIDADE BACTERICIDA FRENTE AO *Streptococcus mutans*

Das diferentes moléculas presente nos extratos da *A. oleracea* o **espilantol** (MOLINATORRES; GARCIA-CHAVEZ; RAMIREZ-CHAVEZ, 1999; DUBEY *et al.*, 2013) e o **d-limoneno** (LIS-BALCNIN *et al.*, 1999; AGGARWAL *et al.*, 2002; LU; LIANG; LIU, 2013; MONTIRON; CARIDDI; REINOSO, 2016; PADHAN; PATTNAIK; BEHERA, 2017; COSTA *et al.*, 2019; LAN *et al.*, 2019) possuem ação antimicrobiana.

Diante dos dados apresentados pelo *screening*, as amostras com o maior teor de espilantol (Tabela 2) foram selecionadas para os ensaios microbiológicos: EBE Fol**PA** (99,97%); e EBE Cau**AP** (99,17%).

Ambos extratos apresentaram CIM e CBM de 125 µg/mL (Tabela 3). Apesar das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas semelhantes, diferentes concentrações de espilantol foram obtidas. As amostras EBE Fol**PA** e EBE Cau**AP** apresentaram uma concentração de espilantol de 124,96 µg/mL e 123,96 µg/mL respectivamente (Tabela 3). Sugere-se que a atividade antimicrobiana possa estar diretamente relacionada ao espilantol, visto o seu elevado teor em ambas as amostras. Porém, também se fazem necessários testes com a molécula isolada para eliminar a possibilidade de sinergismo com as demais moléculas.

Dentro dos grupos controle, os poços contendo digluconato de clorexidina a 0,12% apresentaram inibição do crescimento, enquanto que a solução salina e solução hidroetanólica

(veículo) apresentaram crescimento bacteriano (controles negativos), indicando que o efeito bactericida foi resultado somente dos extratos utilizados. O caldo BHI estéril não apresentou crescimento bacteriano, respaldando as condições assépticas empregadas. Nos testes de CBM, o controle positivo não apresentou crescimento, enquanto nos controles negativos foi observado o crescimento de colônias na superfície do ágar após a incubação.

Tabela 3 – Valores da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos hidroalcoólicos frente ao *Streptococcus mutans* e a concentração de espilantol (µg/mL) de cada amostra. Os dados estão expressos como Média ± Desvio padrão.

Amostra	<i>Streptococcus mutans</i>	
	CIM e CBM ± DP (µg/mL)	Concentração de espilantol (µg/mL) *
EBE Fol PA	125	124,96
EBE Cau AP	125	123,96

*Cálculos realizados tendo como base o teor de espilantol nas amostras.

Fonte: Autor.

Em estudo anterior utilizando o extrato metanólico de *A. oleracea* a 80% frente à cepa de *Streptococcus mutans*, demonstrou-se que o extrato em concentração de 500 mg/mL não apresentou ação inibitória. Nele foram realizados testes de disco-difusão e de concentração inibitória mínima de aderência (CIMA). Os resultados demonstraram que o extrato inibiu o *S. mutans* apenas no teste CIMA com uma concentração de 125 mg/mL, sendo o único resultado positivo encontrado. Os autores concluíram que o extrato poderia de alguma forma inibir a adesão da bactéria à superfície, porém, sem poder de inibição. Não foram realizadas avaliações cromatografias qualitativas e nem quantitativas dos extratos, o que dificulta comparações sobre a composição das amostras (CONDE *et al.*, 2015). Foi observado que os dois extratos testados apresentaram ação inibitória e bactericida (Tabela 3) na mesma concentração encontrada neste estudo. Supõe-se que a metodologia de escolha para a avaliação da concentração inibitória por disco de difusão pode não ter destacado os melhores resultados dos extratos, levando os autores à conclusão de que este não possuía ação contra a bactéria.

O espilantol foi indubitavelmente o constituinte majoritário e mais característico da *Acmella oleracea*. A sua ação antimicrobiana já foi previamente comprovada em estudos utilizando a molécula extraída de outras plantas. Obtido a partir de raízes de *Heliopsis longipes* demonstrou ação bacteriostática contra *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* e *Bacillus subtilis* nas concentrações de 5, 5 e 50 µg/mL, respectivamente. Estes valores estão

abaixo dos encontrados neste estudo. Contudo, há de se considerar que as substâncias isoladas em sua maioria apresentam concentrações inferiores das encontradas em extratos brutos (MOLINA-TORRES *et al.*, 2004).

Os resultados de CIM e CBM, ambas com valores de 125 µg/mL, classificam os extratos em um grupo de agentes com potente atividade antimicrobiana, de acordo com a classificação proposta por Aligiannis *et al.* (2001). Esta classificação propõe que agentes com CIM < 500 µg/mL possuem potente atividade; CIM entre 600-1500 µg/mL possuem moderada atividade; e CIM > 1600 µg/mL baixa atividade (ALIGIANNIS *et al.*, 2001).

Até o momento não há estudos específicos que expliquem o exato mecanismo de ação antimicrobiano dos extratos de *A. oleracea*, entretanto, algumas suposições já foram abordadas. As alquilamidas e os compostos fenólicos poderiam desnaturar a membrana celular microbiana, levando a morte do agente infeccioso (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995; RÍOS; RECIO, 2005; DIAS *et al.*, 2012; CHENG *et al.*, 2015).

Apesar dos extratos serem constituídos majoritariamente por espilantol, não há como afirmar que este bioativo foi o único responsável por este efeito. Além dela, d-limoneno, escopoletina e os compostos fenólicos presentes em menor teor também apresentam atividade antimicrobiana. Seriam necessários testes com as moléculas puras para determinar a atividade e os mecanismos específicos, possibilitando determinar ainda a existência de sinergismo (RÍOS; RECIO, 2005; REBOUÇAS DE ARAUJO *et al.*, 2017).

Agentes antissépticos como digluconato de clorexidina a 0,12%, cloreto de cetilpiridíneo e timol são muito utilizados dentro da prática odontológica. A clorexidina possui elevado espectro antimicrobiano, fácil manejo e aplicação. A literatura demonstra uma variação de CIM e CBM deste agente frente ao *Streptococcus mutans*, sendo-lhe atribuídos valores entre 0,15 µg/mL e 9,4µg/mL, sem deixar dúvidas da sua eficácia elevada (LIU *et al.*, 2012; CAVALHEIRO *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018).

Da mesma forma, o cloreto de cetilpiridíneo apresentou baixas concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (0,24 e 0,97 µg/mL, respectivamente), valores expressivamente inferiores aos das amostras testadas (Tabela 3). Este agente é amplamente encontrado em enxaguantes orais e apresenta um amplo espectro antimicrobiano, mesmo em baixas concentrações (ARAUJO *et al.*, 2012; SO YEON; SI YOUNG LEE, 2019).

Em sua maioria, enxaguantes orais contendo óleos essenciais de plantas terapêuticas apresentam como agente antimicrobiano o timol. O timol é um composto fenólico e sua ação é baseada na ruptura da parede celular bacteriana, em especial, das gram-positivas. Frente ao *Streptococcus mutans* o timol apresentou uma CIM e CBM de 312,5 µg/mL, valores

superiores aos encontrados nas amostras de *A. oleracea* (Tabela 3) (MOREIRA *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2018).

Silva *et al.* (2014) realizaram uma triagem com cerca de 2000 espécies de plantas com possíveis atividades anti-estreptocócicas. Dentre estas, 17 espécies foram identificadas com atividade frente ao *Streptococcus mutans*. *Ipomoea alba* (Dama-da-noite) apresentou os melhores resultados com um CIM e CBM de 160 µg/ml, valor pouco superior aos extratos testados (Tabela 3). O pequeno número de plantas amazônicas com ação anti-estreptocócica (apenas 0,85% das plantas obtiveram ação frente ao *S. mutans*), expressa a relevância dos achados como alternativa a esta bactéria.

A comparação com outros estudos demonstra que as CIM e CBM encontradas nas amostras de *A. oleracea* são positivas quando comparada a alguns agentes antimicrobianos e plantas medicinais. Estes testes podem ser aplicados diretamente em culturas planctônicas, entretanto, estes valores não podem ser aplicados de maneira efetiva quando o biofilme já está estabelecido. So Yeon e Si Young Lee (2019) demonstraram que em alguns casos são necessárias concentrações de agente antimicrobiano 200x maior em biofilmes maduros quando comparados a culturas isoladas.

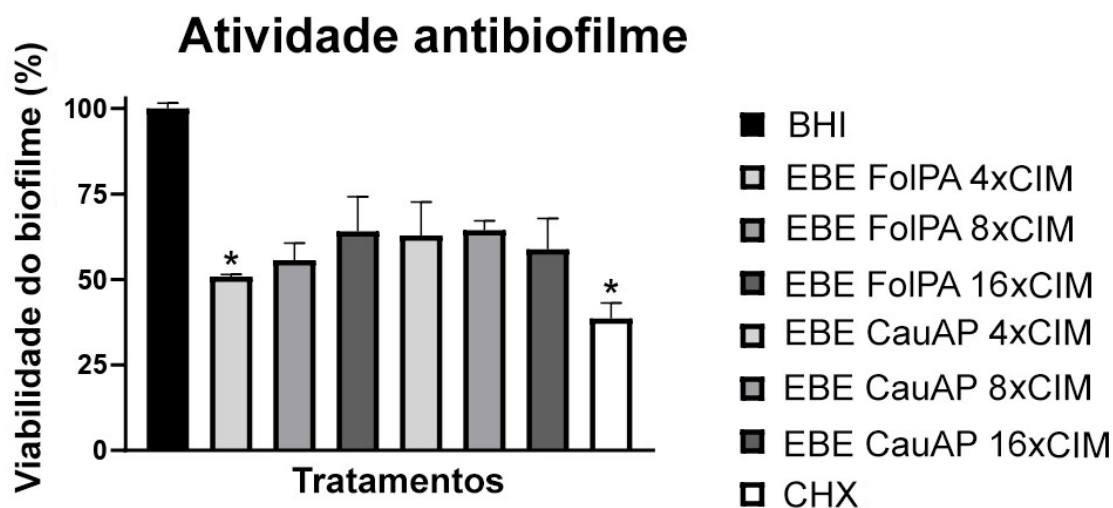
Ao observar o desempenho das amostras de *A. oleracea* frente ao biofilme pré-formado de 24 h de *S. mutans*, é possível observar resultados diferentes dos obtidos nos testes CIM e CBM. A amostra EBE Cau**AP** apresentou uma estabilidade durante o ensaio com um decréscimo da viabilidade bacteriana de acordo com o aumento da concentração, ou seja, quanto maior a concentração (16xCIM), maior foi a sua atividade ($p < 0,05$), em contrapartida, a amostra EBE Fol**PA** se apresentou mais efetiva na redução da viabilidade em concentrações mais baixas (4xCIM) (Figura 13).

Entretanto, estatisticamente apenas a concentração de 4x CIM da amostra EBE Fol**PA** apresentou inibição (50,89%) semelhante a clorexidina ($p > 0,05$) (Figura 13). Nenhuma das concentrações da amostra EBE Cau**AP** alcançou uma redução semelhante a CHX, entretanto estas amostras reduziram a viabilidade bacteriana para 58,82-64,30%, e podem ser vistas como possíveis coadjuvantes em terapias antibiofilme.

Na literatura há uma variação entre 20 a 50% da viabilidade bacteriana após o uso da clorexidina (FERNANDEZ Y MOSTAJO *et al.*, 2016; BRAGA; PIRES; MAGALHÃES, 2018; LIMA *et al.*, 2020). Braga, Pires e Magalhães (2018) testaram enxaguantes orais comerciais frente ao biofilme pré-formado por 24h de *S. mutans*, biofilme este aderido sobre dentes bovinos cobertos por uma mistura de saliva artificial e humana. O tratamento foi realizado por 1 min durante 13 dias. PerioGard® e o Noplak® Max, produtos à base de

clorexidina a 0,12%, apresentam uma atividade antibiofilme entre 44 a 50% contra o *S. mutans*, semelhante aos valores encontrados na amostra EBE FoIPA 4xCIM (50,89%) após um único tratamento por 1 min (Figura 13). Em contrapartida, enxaguantes orais a base de cloreto de cetilpiridínio a 0,05% como Oral-B® Complete e o Cepacol® Plus Advanced apresentaram melhores resultados, com uma redução da viabilidade bacteriana próxima a 70% (BRAGA; PIRES; MAGALHÃES, 2018).

Figura 13 – Viabilidade bacteriana do biofilme de *Streptococcus mutans* após 1 min de aplicação dos extratos hidroalcoólicos da folha paraense (EBE FoIPA) e caule amapaense (EBE CauAP) de *A. oleracea* a 70%. A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA com Tukey Pos-Test ($p < 0,05$).



*Amostra que apresentou $p < 0,05$, inibição estatisticamente semelhante a clorexidina (controle positivo).
Fonte: Autor.

Outros estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para entender os mecanismos de ação dos extratos, a sua ação frente a biofilmes multiespécies, toxicidade em mucosa oral, permitindo assim viabilizar a sua aplicabilidade como um fitofármaco para prevenção e tratamento da cárie dentária.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica UHPLC-ESI-QTOF-MS foi precisa e ágil na identificação do espilantol e d-limoneno nos diferentes extratos de *A. oleracea*. Através do método foi possível ainda quantificar o espilantol e obter o perfil dos fragmentos. A quantificação das demais moléculas é uma possibilidade futura.

Os extratos aquosos das folhas de *A. oleracea* apresentaram rendimentos extrativos superiores aos extratos hidroalcoólicos, entretanto com concentrações de espilantol inferiores. O teor do espilantol se mostrou estável em todas as amostras com valores acima dos 98%.

As amostras etanólicas de *A. oleracea* amapaense à 70% apresentaram melhores rendimentos extrativos, apesar de um quantitativo de espilantol superior nas folhas paraenses utilizando a mesma concentração de solvente.

Os extratos hidroalcoólicos das folhas paraenses a 70% (EBE Fol**PA**) e caule amapaense a 70% (EBE Cau**AP**) apresentaram os maiores teores de espilantol e concentrações inibitórias e bactericidas mínimas que os categorizam como promissores. No teste antibiofilme a amostra de extrato hidroalcoólico das folhas de *A. oleracea* paraense (EBE Fol**PA**) em concentração 4xCIM foi estatisticamente semelhante ao digluconato de clorexidina 0.12%.

Novos estudos sobre o mecanismo de ação dos extratos, avaliação de diferentes cepas e seus efeitos *in vivo* ainda são necessários, porém, os extratos de *A. oleracea* podem ser vistos como um possível agente antistreptocócico e coadjuvante no tratamento da doença cárie.

REFERÊNCIAS

- ABEYSIRI, G. R. P. I. *et al.* Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleraceae* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 852-856, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.043>.
- AGGARWAL, K.K. *et al.* Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 59-63, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.1040>.
- AKHLAGHI, N., *et al.* The antibacterial effects of coffee extract, chlorhexidine, and fluoride against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*: An *in vitro* study. **Dental research journal**, v. 16, n. 5, p. 346–353, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6749852/>. Acesso em: 13 abr. 2021.
- ALBACH, D. C. *et al.* Phylogenetic analysis of asterids based on sequences of four genes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 88, v. 2, p. 163–212, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2307/2666224>.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf001494m>.
- AL-JAMMAL, M. K. H. *et al.* Development and validation of micro emulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of nifedipine in pharmaceutical preparation. **Pharmaceutical Analytica Acta**, v. 6, n. 347, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000347>.
- ALVES, L. R. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-451, 2013. Disponível em: <http://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/414>. Acesso em: 25 jun. 2020.
- ALVIANO, W. S.; *et al.* In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 6, p. 545-552, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.12.001>.
- AMARAL, S.M.; CORTÊS, A.Q.; PIRES, F.R. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001100010>.
- ANHOLETO, L. A. *et al.* Toxic action of *Acmella oleracea* extract on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 164-171, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.031>.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª Edição – Volume I. Ed. 6, Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 13 abr. 2021.

ARAUJO, D. B. et al. Mouthrinses: active ingredients pharmacological properties and indications. *Revista Gaúcha de Odontologia*, v. 60, n. 3, p. 349-357, 2012. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?pid=S1981-86372012000300011&script=sci_abstract&tlng=en. Acesso em: 13 abr. 2021.

ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 83, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000702014>.

ARORA, S.; VIJAY, S.; KUMAR D. Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 145-150, 2011. Disponível em: <https://www.jocpr.com/articles/phytochemical-and-antimicrobial-studies-on-the-leaves-of-spilanthes-acmella.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2021.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 7, p. 691-692, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566478/>. Acesso em: 22 jan. 2021.

BAE, S. S. et al. A validated chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 438-443, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.1215>.

BALAGOPAL, S.; ARJUNKUMAR, R. Chlorhexidine: The Gold Standard Antiplatelet Agent. **Journal of Pharmaceutical Sciences & Research**, v. 5, n. 12, p. 270-274, 2013. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.443.7415&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 13 abr. 2021.

BARREDA, V. D. An extinct Eocene taxon of the daisy family (Asteraceae): evolutionary, ecological and biogeographical implications. **Annals of Botany**, v. 109 n. 1, p. 127-134, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcr240>.

BÉLANGER, J. M. R.; JOCELYN PARÉ, J. R. Instrumental Methods in Food Analysis. ed. 18. **Elsevier**: Canadá, 1997. 486 p. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/instrumental-methods-in-food-analysis/pare/978-0-444-81868-3>. Acesso em: 01 set. 2019.

BELSTRØM, D. et al. Bacterial profiles of saliva in relation to diet, lifestyle factors, and socioeconomic status. **Journal of Oral Microbiology**, v. 6, p. 1-9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3402/jom.v6.23609>.

BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 604-615, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>.

BHARGAVA, S.; MOTWANI, M. B.; PATNI, V. M. Effect of handheld mobile phone use on parotid gland salivary flow rate and volume. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral**

Pathology, Oral Radiology, v. 114, p. 200-206, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.03.001>.

BONEZ, P. C. *et al.* Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**, n. 41, v. 12, p. 119-122, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.05.002>.

BOONEN, J. *et al.* Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 77-84, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.046>.

BOWEN, W. H. *et al.* Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. **Trends in Microbiology**, v. 26, p. 229–242, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>.

BRAGA, A. S.; PIRES, J. G.; MAGALHÃES, A. C. Effect of a mouthrinse containing *Malva sylvestris* on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization compared to known antimicrobial mouthrinses. **Biofouling**, v. 34, n. 3, p. 252-261, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1428957>.

BRASIL. Conselho Federal de Odontologia (CFO). Resolução n. 82, de 19 de setembro de 2008. **Reconhece e regulamenta o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal**. Disponível em: <http://sistemas.cfo.org.br/visualizar/atos/RESOLU%c3%87%c3%83O/SEC/2008/82> Acesso em: 10 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n°. 971, de 03 de maio de 2006 – Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 mai. 2006. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html. Acesso em: 14 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados principais**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf. Acesso em: 11 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos – **Formulário Terapêutico Nacional 2008: RENAME 2006**. Brasília, DF, 2008. 897p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario_terapeutico_nacional_2008.pdf. Acesso em: 14 nov. 2018.

BROHOLM, S. K. *et al.* A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9117–9122, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0801359105>.

BRUNING, M.C.R. *et al.* A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciencia & Saude Coletiva**, vol. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012001000017>.

BUGNO, A. *et al.* Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 40-45, 2006. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32967>. Acesso em: 16 mar. 2019.

CARDOSO, M. O.; GARCIA, L. C. **Hortaliças não-convencionais da Amazônia**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, p133-140, 1997. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/214084/1/Hortalicas-nao-convencionais-da-Amazonia-Feijao-de-metro.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CAVALCANTE, R. **Fitodontologia**. Rio Branco: ed. 1, p. 172, 2013. Disponível em: <https://www.google.com.br/books/edition/Fitodontologia/6tJxDwAAQBAJ?hl=pt-BR&gbpv=1&kptab=overview>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CAVALCANTE, R. **Plantas da Amazônia**. Brasil: Clube de Editores, 2011. 260 p. Disponível em: https://www.google.com.br/books/edition/Plantas_Da_Amaz%C3%94nia/iLhxDwAAQBAJ?hl=pt-BR&gbpv=0&kptab=overview. Acesso em: 14 abr. 2021.

CAVALHEIRO, A. B. *et al.* Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bactéria. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.45, n. 4, p.214-218, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1590/1807-2577.11015>.

CHAKRABORTY, A. *et al.* Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes Acmella* in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 148-150, 2004. Disponível em: <https://www.ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=2004;volume=36;issue=3;spage=148;epage=150;aulast=Chakraborty>. Acesso em: 17 jan. 2020.

CHAKRABORTY, A. *et al.* Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 277-279, 2010. DOI: <http://doi.org/10.4103/0253-7613.70106>.

CHENG, Y. *et al.* Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970-6977, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules20046970>.

CHEUNG, H. Y. *et al.* Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036659>.

CHUNG, K.F. *et al.* Notes on *Acmella* (Asteraceae): Helianthaceae in Taiwan. **Botanical Studies**, v. 49, p. 49:73-82, 2008. Disponível em: https://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture/Culture-plantes-alimentaires/FICHES_PLANTES/Cresson-de-para/007%20Notes%20on%20Acmella%20in%20Taiwan.pdf. Acesso em: 14 abr. 2021.

CONDE, N. C. de O. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm micro-organisms. **Journal of Dental Science**, v. 30, n. 4, p. 179-183, 2015. DOI: <http://doi.org/10.15448/1980-6523.2015.4.17794>.

COSTA, E. M. *et al.* A comprehensive study into the impact of a chitosan **mouthwash** upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 1081-1086, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.041>.

COSTA, M. do S. *et al.* Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 128, p. 158-161, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.036>.

COSTALONGA, M.; HERZBERG, M. C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. **Immunology Letters**, v. 162, n.2, p. 22-38, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>.

CRUZ, P. B. *et al.* Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137-143, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.026>.

DAVID, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114–122, 2003. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrd1008>.

DE SOUZA, E. B. *et al.* Sazonalidade da precipitação sobre a Amazônia legal brasileira: clima atual, e projeções futuras usando o modelo REGCM4. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 18, p. 293-306, 2016. DOI: <http://doi.org/10.5380/abclima.v18i0.43711>.

DIAS, A. M. A. *et al.* Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves, stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 62-70, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.09.020>.

DUBEY, S.; *et al.* Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v.3, 2013. DOI: <http://doi.org/10.1155/2013/423750>.

ELVIN-LEWIS, M. The therapeutic potential of plants used in dental folk medicine. **Tropical Dental Journal**, v. 5, n. 3, p. 107-117, 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6962424/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, p 83-91, 2010. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/103>. Acesso em: 28 set. 2019.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2011. 640 p. Disponível em: https://www.google.com.br/books/edition/C%C3%A1rie_Dent%C3%A1ria/q9dzNAAACAAJ?hl=pt-BR&kptab=overview. Acesso em: 15 nov. 2018.

FERNANDEZ Y MOSTAJO, M. *et al.* Effect of mouthwashes on the composition and metabolic activity of oral biofilms grown *in vitro*. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 4, p. 1221-1230, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00784-016-1876-2>.

FERREIRA, G. L. S. *et al.* Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 691-696, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1590/1519-6984.174147>.

FORZZA, R.C. *et al.* Introdução - síntese da diversidade brasileira. In: **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 21-42, 2010. Disponível em: <http://www.santoandre.sp.gov.br/pesquisa/ebooks/344899.pdf>. Acesso em: 09 mar. 2019.

FRANCA, J. V. *et al.* Distinct growth and extractive methods of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen rising different concentrations of spilanthol: An important bioactive compound in human dietary. **Food Research International**, n. 89, p. 781-789, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.018>.

FUNK, V.A. *et al.* Classification of Compositae In: FUNK V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R. **Systematics, evolution and biogeography of the Compositae**. Vienna: International Association for Plant Taxonomy, p. 171–189, 2009. Disponível em: <https://repository.si.edu/handle/10088/11409>. Acesso em: 14 abr. 2021.

GURENLIAN, J. R. The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health. **American Dental Hygienists Association**, v. 81, n. 116, 2007. Disponível em: https://jdh.adha.org/content/81/suppl_1/116/tab-references. Acesso em: 14 abr. 2021.

HELLWIG, F. H. Calyceraceae. In: KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, p. 19–25, 2007. 8 v. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-3-540-31051-8%2F1.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

HISERODT, R.D. *et al.* Proposed mechanisms for the fragmentation of doubly allylic alkenamides (tingle compounds) by low energy collisional activation in a triple quadrupole mass spectrometer. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v.15, p.1462–1470, 2004. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.06.009>.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 435-444, 2011. DOI: <http://doi.org/10.4161/viru.2.5.16140>.

INMET. **Instituto Nacional de Metereologia**: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

INNES, N.P. *et al.* Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. **Advances in dental research**, v. 28, p. 49–57, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034516639276>.

JABAILY, R. S. et al. Systematics of the Austral-Pacific family Goodeniaceae: establishing a taxonomic and evolutionary framework. **Taxon**, v. 61, n. 2., p. 419–436, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/tax.612012>.

JACOBSON, M. The structure of espilanthol. **Chemistry & Industry**, v.12, p. 50-51, 1957. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19570500914>. Acesso em: 14 abr. 2021.

JAKUBOVICS, N. S.; KOLENBRANDER, P. E. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. **Oral Diseases**, v. 16, n. 8, p. 729-739, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01701.x>.

JANSEN, R.K. **The systematics of *Acmella* (Asteraceae Heliantheae)**. Systematic Botany Monographs, v. 8, p. 1-115, 1985. DOI: <https://doi.org/10.2307/25027614>.

JEFFREY, C. Compositae: Introduction with key to tribes. In: KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer Verlag, p. 61– 87, 2007. 8 v. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-3-540-31051-8%2F1.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

JEPSEN, S. *et al.* Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 85-93, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12687>.

KATINAS, L. *et al.* The origin of the bifurcating style in Asteraceae (Compositae). **Annals of botany**, v. 117, n. 6, p. 1009–1021, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcw033>.

LAN, W. *et al.* Electrospun Polyvinyl Alcohol/D-Limonene Fibers Prepared by Ultrasonic Processing for Antibacterial Active Packaging Material. **Molecules**, v. 24, n. 4, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24040767>.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 27–46, 2009. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a4.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M., WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-222, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>.

LEMOS, J. A. *et al.* The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018>.

LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 154, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/023770-0>.

LI, M. N. *et al.* Global identification and quantitative analysis of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Qi-Fu-Yin by ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and**

Biomedical Analysis, v. 114, p. 376-389, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.030>.

LIMA, R. A. *et al.* Antimicrobial effect of anacardic acid-loaded zein nanoparticles loaded on *Streptococcus mutans* biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00320-2>.

LIN, G. *et al.* Determination of sodium tanshinone iia sulfonate in rat plasma by high performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics studies. **Pharmaceutica Analytica Acta**, n. 6, v. 383, 2015. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/determination-of-sodium-tanshinone-iia-sulfonate-in-rat-plasma-by-high-performance-liquid-chromatography-and-its-application-to-pharmacokinetics-studies-2153-2435-1000383.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

LIS-BALCNIN, M. *et al.* Differences in bioactivity between the enantiomers of α -pinene. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 3, p. 393-397, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701162>.

LIU, J. *et al.* Effect of sodium fluoride, ampicillin, and chlorhexidine on *Streptococcus mutans* biofilm detachment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4532-4535, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00885-12>.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p. 576. 2008. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/catalogo/REC000gbpasrvf02wx5ok07shnq94etlj3h.html. Acesso em: 02 jun. 2020.

LU, H.Y.; LIANG, Y.; LIU, X.J. Effect of limonene emulsion on post-harvest physiology and storage quality of spinaches. **Science and Technology of Food Industry**, v. 34, p. 338-341, 2013. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Effect-of-limonene-emulsion-on-post-harvest-and-of-Xian-jin/efa2a467d26f3ed85d1244dff46bea5315490ff2#citing-papers>. Acesso em: 14 abr. 2021.

LUNDBERG, J. Asteraceae and relationships within Asterales. In: FUNK V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R. **Systematics, evolution and biogeography of the Compositae**. Vienna: International Association for Plant Taxonomy, p. 157-169, 2009. Disponível em: <https://repository.si.edu/handle/10088/11409>. Acesso em: 14 abr. 2021.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO A. C. S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **International Journal of Dentistry**, v. 4, n. 4, p. 124-131, 2007. Disponível em: <https://periodicos.ufpe.br/revistas/dentistry/article/view/13895>. Acesso em: 02 jun. 2020.

MASKE, T. T. *et al.* *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review. **Biofouling**, v. 33, p. 661-75, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1354248>.

MCKENNA, D. J. *et al.* Receptor screening technologies in the evaluation of Amazonian ethnomedicines with potential applications to cognitive deficits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 475-492, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.037>.

MOLINA-TORRES, J. *et al.* Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced Amides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf034374y>.

MOLINA-TORRES, J; GARCIA-CHAVEZ, A; RAMIREZ-CHAVEZ, E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavoring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 241-248, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00134-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00134-2).

MONTEIRO, M. H. D. A. **Fitoterapia na odontologia**: levantamento dos principais produtos de origem vegetal para a saúde bucal. Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos, Pós-graduação em Gestão da Inovação em Fitomedicamentos, 2014. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/11121>. Acesso em: 20 fev. 2020.

MONTIRONI, I. D.; CARIDDI, L. N.; REINOSO, E. B. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 48, n. 3, p. 210-216, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.005>.

MORAIS, T. M. *et al.* Pacientes em unidades de terapia intensiva: atuação conjunta dos médicos e dos cirurgiões-dentistas. **Cardiologia e Odontologia - Uma visão integrada**. São Paulo: Santos, p. 70-249, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2006000400016>.

MOREIRA, A. C. A. *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, n. 2, p. 153-161, 2009. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4065>. Acesso em: 07 ago. 2019.

MORENO-RABIE, C.; SCHARAGER-LEWIN, D.; ARANGUIZ, V. Use of toothpastes and mouthwashes for the control of dentin hypersensitivity in adults: a narrative review. **Revista clínica de Periodoncia, Implantologia y Rehabilitación Oral**, v.11, n.3, p. 177-183, 2018. Disponível em: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072018000300177. Acesso em: 14 abr. 2021.

MOSADDAD, S. A. *et al.* Oral microbial biofilms: an update. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03641-9>.

MULUBWA, M. *et al.* Development and validation of high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for determination of tenofovir in small volumes of human plasma. **Journal of Chromatography and Separation Technique**, v. 6, n.300, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000300>.

NAHAR, L.; ONDER, A.; SARKER, S.D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019). **Phytochemical Analysis**, p. 1-45, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2906>.

NAHAR, L.; SARKER, S.D. UPLC in phytochemical analysis. **Trends in Phytochemical Research**, v. 3, p. 1-2, 2019. Disponível em: http://tpr.iau-shahrood.ac.ir/article_664175.html. Acesso em 02 jun. 2020.

NARAYANA, K. R. *et al.* Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 2-16, 2001. Disponível em: <https://www.ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=2001;volume=33;issue=1;spage=2;epage=16;aulast=Raj?type=0>. Acesso em: 02 jun. 2020.

NARAYANAM, M. *et al.*, Critical practical aspects in the application of liquid chromatography–mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 87, p. 191-217, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.027>.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 7, 2006. Disponível em: https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf. Acesso em: 02 jun. 2020.

NESS, J.; SHERMAN, F. T.; PAN, C. X. Alternative medicine: What the data say about common herbal therapies. **Geriatrics**, v. 54, n. 10, p. 33-38, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10542859/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

NEWBRUN, E. **Cariologia**. São Paulo: Santos, 1988. 326 p. Disponível em: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012118111/>. Acesso em: 09 out. 2019.

NGUYEN, D. T. T. *et al.* Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1836, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200600189>.

NIERO, R.; *et al.* Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas; contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. Disponível em: <https://www.worldcat.org/title/ciencias-farmaceuticas-contribuicao-ao-desenvolvimento-de-novos-farmacos-e-medicamentos/oclc/57564765/editions?referer=di&editionsView=true>. Acesso em: 09 out. 2019.

NIKOLIĆ, M.; STEVOVIĆ, S. Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 14, n. 4, p. 782–789, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2015.08.002>.

NOMURA, E. C. O. *et al.* Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, n. 2, p. 583-589, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.007>.

NOVÁKOVÁ, L.; SOLICHOVÁ, D.; SOLICH, P. Advantages of ultra-performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 16, p. 2433, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200600147>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Sugar and dental caries**. Geneva: WHO, 2017. Disponível em:

<https://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/sugars-dental-caries-keyfacts/en/>. Acesso em: 08 mai. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The world medicines situation 2011**. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: OMS, p. 14, 2011. Disponível em: <http://digicollection.org/hss/en/m/abstract/Js18063en/>. Acesso em: 08 mai. 2020.

PADHAN, D.; PATTNAIK, S.; BEHERA, A. K. Growth-arresting Activity of *Acmella* Essential Oil and its Isolated Component D-Limonene (1, 8 P-Mentha Diene) against *Trichophyton rubrum* (Microbial Type Culture Collection 296). **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 3, p. 555-560, 2017. Disponível em: <https://www.phcog.com/article.asp?issn=0973-1296;year=2017;volume=13;issue=51;spage=555;epage=560;aulast=Padhan;type=0>. Acesso em: 14 abr. 2021.

PEDRAZZI, V. *et al.* Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival. **Periodontia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 26-33, 2009. Disponível em: http://www.interativamix.com.br/SOBRAPE/arquivos/set_2009/artigo4.pdf. Acesso em: 08 mai. 2020.

PELANDER, A. *et al.* Evaluation of a High Resolving Power Time-of-Flight Mass Spectrometer for Drug Analysis in Terms of Resolving Power and Acquisition Rate. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, p. 379-385, 2011. Disponível em: <https://researchportal.helsinki.fi/en/publications/evaluation-of-a-high-resolving-power-time-of-flight-mass-spectrom>. Acesso em: 02 jun. 2020.

PEREIRA, J. V *et al.* Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (Romã): Efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 20, n. 49, 2005. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/27054415.pdf>. Acesso em: 09 out. 2019.

PINHEIRO, M. T. **Avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante, citotóxica, inseticida e repelente de extratos vegetais das folhas de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, *Acmella ciliata*(Kunth) Cass e *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) contra *Aedes aegypti***. Tese (Doutorado) - Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal-BIONORTE. Macapá, p. 40, 2016. Disponível em: <https://www2.unifap.br/bionorte/files/2019/02/TESE-FINAL-COMPLETA-Mayara-Tania-Pinheiro.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

PRACHAYASITTIKUL, S. *et al.* Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, p. 850-867, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14020850>.

PURUSHOTHAMAN, Y. *et al.* *Spilanthes acmella* and its medicinal uses – A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 6, p. 45-49, 2018. DOI: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i6.24697>.

RAJENDRAN, R. *et al.* Isolation and quantification of antimalarial N-alkylamides from flower-head derived in vitro callus cultures of *Spilanthes paniculata*. **Journal of Bioscience**

and **Bioengineering**, v. 124, n. 1, p. 99-107, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.02.001>.

RAMACHANDRAN, R. G.; RADHAKRISHNAN, R. Anatomical Characterization of Nine Taxa of Genus *Acmella* Rich. (Toothache Plant) in India. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132020000100402&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 12 abr. 2021.

REBOUÇAS DE ARAÚJO, I. D. *et al.* Chemical composition and evaluation of the antibacterial and Cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1918-6>.

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, v. I e II, 2002. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=671843&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22REVILLA,%20J.%22&qFacets=autoria:%22REVILLA,%20J.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 02 jun. 2020.

RIBEIRO, R.V. R. *et al.* Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.023>.

RÍOS, J. J.; ROCA, M.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Systematic HPLC/ESI-High Resolution-qTOF-MS Methodology for Metabolomic Studies in Nonfluorescent Chlorophyll Catabolites Pathway. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/490627>.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>.

ROGATSKY, E. Modern high performance liquid chromatography and HPLC 2016 International Symposium. **Journal of Chromatography and Separation Technique**, v. 7, n. 135, 2016. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/modern-high-performance-liquid-chromatography-and-hplc-2016international-symposium-2157-7064-1000e135.pdf>. Acesso em: 14 abr. 21.

RONDANELLI, M. *et al.* *Acmella oleracea* for pain management. **Fitoterapia**, v. 140, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104419>.

SAHU, J. A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella*. **Pharmacology online**, v. 2, p. 1105-1110, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/264044177_A_review_on_phytopharmacology_and_micropropagation_of_Spilanthes_acmella. Acesso em: 14 abr. 2021.

SAMARANAYAKE, L. P. **Essential Microbiology for Dentistry**. 5. ed. China: Elsevier, p. 4-222, 2018. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/essential-microbiology-for-dentistry/samaranayake/978-0-7020-7435-6>. Acesso em: 08 mai. 2020.

SAMPAIO, F. C.; *et al.* In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289-294, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.034>.

SANTANA DE FREITAS-BLANCO, V. *et al.* Development and Evaluation of a Novel Mucoadhesive Film Containing *Acmella oleracea* Extract for Oral Mucosa Topical Anesthesia. **PloS one**, v. 11, n. 9, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162850>.

SANTOS, H. H. D. *et al.* Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Averrhoa bilimbi* L. oriundas de dois estágios de maturação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 1995-2002, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130992>.

SATHYAPRASAD, S.; JOSE, B. K.; CHANDRA, H. S. Antimicrobial and antifungal efficacy of *Spilanthes acmella* as an intracanal medicament in comparison to calcium hydroxide: An in vitro study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 26, n. 5, p. 528-532, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26672426/>. Acesso em: 20 fev. 2020.

SCHIOZER, A. L. *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of extracts of the leaves of *Arrabidaea chica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 3, p. 409-414, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000300006>.

SCHULTZE, L. B. *et al.* The impact of the pH value on Biofilm Formation. **Monographs in Oral Science**, v. 29, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33427214/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SHEIHAM, A.; JAMES, W.P. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. **Journal of Dental Research**, v. 94, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034515590377>.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 59, n. 2, p.201-222, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239360/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SILVA, A. E. **Jambu (*Spilanthes oleracea* linn.) minimamente processado: compostos bioativos e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/6755/texto%20completo.pdf?sequence=1>. Acesso em: 20 fev. 2020.

SILVA, G. A. R.; SANTOS, J. U. M. *Acmella marajoensis* G.A.R. Silva & J.U.M. Santos: Uma nova espécie de Asteraceae para a Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 191-194, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000200002>.

SILVA, J. P. C. *et al.* Anti-Streptococcal activity of Brazilian Amazon Rain Forest plant extracts presents potential for preventive strategies against dental caries. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 2, p. 91-97, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-775720130366>.

SIMAS, N. *et al.* Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*.

Phytochemistry Letters, v. 6, n.1, p. 67-72, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.10.016>.

SINGH, J.; *et al.* Ethnomedicine: use in dental caries. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 6, n. 21, p. 1308-1312, 2007. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/bjos/article/view/8642970>. Acesso em: 02 jun. 2020.

SINGH, M.; CHATURVEDI, R. Evaluation of nutrient uptake and physical parameters on cell biomass growth and production of spilanthol in suspension cultures of *Spilanthes acmella* Murr. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 35, p.943–951, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0679-3>.

SO YEON, L., SI YOUNG, L. Susceptibility of oral streptococci to chlorhexidine and cetylpyridinium chloride. **Biocontrol Science**, v. 24, p. 13–21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4265/bio.24.13>.

SOLMAZ, G.; KORACHI, M. Inhibition and Disruption Properties of Chlorhexidine Gluconate on Single and Multispecies Oral Biofilms. **Journal of Microbiology**, n. 6, v. 1, p. 61-66, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5812/jjm.4852>.

SPELMAN, K. *et al.* The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* anti-malarial activity. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 7, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.3395>.

STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M.A.; COMBARIZA, M. Y. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 752, p. 223-232, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00480-3).

STEPANOVIC, C. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>.

SWARTZ, M. E. UPLC: An introduction and review. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 28, p. 1253-1263, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1081/JLC-200053046>.

TAHTIHARJU, S., *et al.* Evolution and diversification of the CYC/TB1 gene family in Asteraceae—a comparative study in Gerbera (Mutisieae) and Sunflower (Heliantheae). **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 4, p. 1155–1166, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/10.1093/molbev/msr283>.

TANG, M. *et al.* HPLC analysis of monomer release from conventionally and high temperature high-pressure polymerised urethane dimethacrylate intended for biomedical applications. **Journal of Chromatography and Separation Technique**, v. 5, n. 227, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000227>.

TRAN, P. L. *et al.* Efficacy of a silver colloidal gel against selected oral bacteria *in vitro*. **F1000 Research**, n. 8, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468711/>. Acesso em: 02 jun. 2020.

VANAMALA, U. *et al.* An updated review on diuretic plants-2012. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive**, v. 3, p. 29-31, 2012. Disponível em: <https://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/view/531/357>. Acesso em: 18 ago. 2020.

WONGSAWATKUL, O. *et al.* Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2724-2744, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms9122724>.

WU, J. *et al.* Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. **Isme Journal**, v. 10, p. 2435-2446, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.37>.

WU, L.C. *et al.* Antiinflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2341-2349, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf073057e>.

XAVIER, J. *et al.* Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, p. 2-13, 2003. Disponível em: <https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/biofilmes.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2020.

XAVIER, M. N.; RAMOS, I. N. C.; XAVIER FILHO, L. **A fitoterapia no combate às afecções bucais**. João Pessoa: Idéia, p. 212, 1995. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-222437>. Acesso em: 07 jan. 2021.

XIAO, J.; FISCELLA, K. A.; GILL, S. R. Oral microbiome: possible harbinger for children's health. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n.1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0082-x>.

ZANOTTI, C. A.; POZNER, R. E. Calyceraceae In: ZULOAGA, F.; MORRONE, O.; BELGRANO, M. J. **Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. Dicotyledoneae: Acanthaceae-Fabaceae (Abarema-Schizolobium)**. St. Louis: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, p. 1844–1853, 2008. v. 2. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2009000400012>.

ZENI, A. L. B. *et al.* Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciencia & Saude Coletiva**, vol. 22, n. 8, p. 2703-2712, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232017228.18892015>.

ZERO, D. T. *et al.* The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: scientific advances in the United States. **The Journal of the American Dental Association**, v. 140 p. 25-34, 2009. DOI: <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2009.0355>.

ZHANG, Z. F. *et al.* Characterization and quantification of the chemical compositions of *Scutellariae barbatae* herba and differentiation from its substitute by combining UHPLC-PDA-QTOF-MS/MS with UHPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 109, p. 62-66, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.025>.

ZIJNGE, V. *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS One**, v. 5, n. 2, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009321>.

ANEXO A – PARECER DE IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA



Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA
Núcleo de Biodiversidade – NUBIO
Herbário Amapaense - HAMAB

PARECER

Parecer Nº 13/2019 – HAMAB/NUBIO/IEPA

Macapá, 20 de setembro de 2019.

De: **Tonny David Santiago Medeiros – Curador HAMAB**

Para: **Paulo Peretti Junior – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá**

Assunto: **Identificação Taxonômica e Depósito de Amostras Botânicas**

Prezado Senhor,

Conforme procedimentos adotados à identificação taxonômica do material enviado a este herbário seguem as informações de depósito no HAMAB:

Família	Nome Científico	Coletor(res) / Nº	Local da Coleta / Data de coleta
Asteraceae	<i>Acmella oleracea</i> (L.) RKJansen	P. PERETTI / 01, 02	Brasil, Amapá, Macapá, APA da Fazendinha / 05.07.2019
Forma de Mencionar em Monografias e Manuscritos para Publicações			
<i>Acmella oleracea</i> (L.) RKJansen. Material examinado: Brasil, Amapá, Macapá, APA da Fazendinha, 05.VII.2019, P. PERETTI, 01 e 02 (HAMAB).			

Atenciosamente,

Tonny D.S.Medeiros
 Inst. Peq. Cient. e Téc.
 do Estado do Amapá - IEPA
 Pesquisador

Tonny David Santiago Medeiros

Me. Tonny David Santiago Medeiros
Curador do Herbário Amapaense – HAMAB/NUBIO/IEPA
 Decreto Nº 0125 – 23.01.2018/IEPA/GEA

ANEXO B – CERTIDÃO DE CADASTRO DO MATERIAL VEGETAL NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A0A8024

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: A0A8024
Usuário: MAYARA TANIA PINHEIRO
CPF/CNPJ: 658.503.603-44
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Acmella Acmella oleracea

Título da Atividade: ESTUDO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE PLANTAS MEDICINAIS
AMAZÔNICAS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIINFLAMATÓRIA IN VITRO E MICROBIOLÓGICA.

Equipe

MAYARA TANIA PINHEIRO	Unifap
fernanda cristina alcantara dos santos	UFG
Esther de Sousa Figueredo	UFG
EMANUELLE TAVARES RODRIGUES	UNIFAP
Paulo Peretti Junior	UNIFAP

Parceiras Nacionais

01.567.601/0001-43 / Universidade Federal de Goiás

Data do Cadastro: 05/12/2018 12:15:33
Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 15:41 de 12/02/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN