



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**Departamento de Farmácia**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**



**RAQUEL ISOLANI LUVIZOTTO**

**INIBIÇÃO DA ADESÃO BACTERIANA, ATIVIDADE DAS  
GINGIPAÍNAS E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE  
*Porphyromonas gingivalis* POR *Limonium brasiliense***

MARINGÁ

2023

RAQUEL ISOLANI LUVIZOTTO

**INIBIÇÃO DA ADESÃO BACTERIANA, ATIVIDADE DAS  
GINGIPAÍNAS E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE  
*Porphyromonas gingivalis* POR *Limonium brasiliense***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

L976i	<p>Luvizotto, Raquel Isolani</p> <p>Inibição da adesão bacteriana, atividade das gingipainas e da formação de biofilme de <i>Porphyromonas gingivalis</i> por <i>Limonium brasiliense</i> / Raquel Isolani Luvizotto. – Maringá, PR, 2023.</p> <p>79 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.</p> <p>1. Farmacognosia. 2. Plantas medicinais. 3. Fitoquímica. 4. Produtos naturais. 5. Periodontite. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.</p> <p>CDD 23.ed. 615.321</p>
-------	---

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
PARA FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A  
FONTE.

**Raquel Isolani Luvizotto**

INIBIÇÃO DA ADESÃO BACTERIANA, ATIVIDADE DAS GINGIPAÍNAS E DA  
FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Porphyromonas gingivalis* POR *Limonium*  
*brasiliense*

146ª Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 21 de junho de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Dr. João Carlos Palazzo de Mello  
*Universidade Estadual de Maringá*

Documento assinado digitalmente

**gov.br** CID AIMBIRE DE MORAES SANTOS  
Data: 21/06/2023 12:23:16-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos  
*Universidade Federal do Paraná*

Documento assinado digitalmente

**gov.br** DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES  
Data: 21/06/2023 13:43:08-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves  
*Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*

Documento assinado digitalmente

**gov.br** FLAVIO AUGUSTO VICENTE SEIXAS  
Data: 21/06/2023 14:51:04-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas  
*Universidade Estadual de Maringá*

Documento assinado digitalmente

**gov.br** MYCHELLE VIANNA PEREIRA COMPANHONI  
Data: 21/06/2023 16:25:54-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Mychelle Vianna Pereira Companhoni  
*Universidade Federal do Mato Grosso do Sul*

Este trabalho foi realizado no Laboratório Palafito, bloco T22 e bloco K80 (sala 14), na Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, Brasil, sob supervisão do Professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello e no Laboratório de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica, na Universidade de Münster, Münster – NRW, Alemanha, sob supervisão do Professor Dr. Andreas Hensel.

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

Raquel Isolani, Fernanda Pilatti da Silva, Mariana Nascimento de Paula, Andressa Blainski, João Carlos Palazzo de Mello, Andreas Hensel. Cell viability and no cytotoxic effect of *Limonium brasiliense* fractions and isolated compounds in KB cells and *Porphyromonas gingivalis*. In: 12<sup>th</sup> World Congress on Polyphenols Applications. Bonn, RDW, 25-28 de Setembro de 2018.

Raquel Garcia Isolani, Fernanda Pilatti da Silva, Mariana Nascimento de Paula, João Carlos Palazzo de Mello, Andreas Hensel. Avaliação do extrato bruto de *Limonium brasiliense* na inibição da formação de biofilme por *Porphyromonas gingivalis*. In: XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica. Petrópolis, RJ, 07-10 de Maio de 2019.

Raquel Garcia Isolani, Fernanda Pilatti da Silva, Mariana Nascimento de Paula, João Carlos Palazzo de Mello, Andreas Hensel. Evaluation of semipurified fractions of *Limonium brasiliense* in the inhibition of biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. In: II International Meeting of Pharmaceutical Sciences and X Seminário Annual do PCF. Maringá, PR, 19-22 de Novembro de 2019.

Raquel Isolani, Fernanda Pilatti, Larissa Valone, Andreas Hensel, João Carlos Palazzo de Mello. Samarangenin B from *Limonium brasiliense* inhibits the mucoadhesion of *Porphyromonas gingivalis*. In: 13<sup>th</sup> International Congress of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto, SP, 3-6 de Novembro de 2021.

Raquel Isolani, Fernanda Pilatti, Andreas Hensel, João Carlos Palazzo de Mello. *Limonium brasiliense* inhibits the virulence factor of *Porphyromonas gingivalis*. In: XI Seminário Anual do PCF, Maringá, PR, 25-26 de Novembro de 2021.

Raquel Isolani, Fernanda Pilatti, Andreas Hensel, João Carlos Palazzo de Mello. Epigallocatechin-3-*O*-gallate from *Limonium brasiliense* inhibits the mucoadhesion of *Porphyromonas gingivalis*. In: IV International Meeting of Pharmaceutical Sciences, XII Seminário Annual do PCF e II Seminário Anual do PROFAR, Maringá, PR, Novembro de 2022.

Dedico este trabalho às minhas filhas, Maria Eduarda e Rafaela, e ao meu esposo, Murilo Luvizotto Vieira.



## AGRADECIMENTOS

Às minhas filhas, Maria Eduarda e Rafaela, por me incentivarem e darem força para seguir meus sonhos. Se estou em busca de mais uma etapa profissional em minha vida, devo a elas.

Aos meus pais, Rosélio e Fátima, por sempre me incentivarem a estudar e principalmente ao apoio incondicional que recebi durante minha primeira gravidez aos meus 16 anos. Devo a eles tudo o que conquistei até hoje.

Ao meu esposo, Murilo Luvizotto Vieira, por estar ao meu lado desde o cursinho pré-vestibular, me impulsionando durante as fases de TCC, qualificação e dissertação de mestrado, qualificação do doutorado e agora na defesa. Me deu total apoio para realizar meu doutorado sanduíche, mesmo que isso custasse 11 meses de saudade, sem nos vermos pessoalmente.

Ao meu orientador João Carlos Palazzo de Mello, que me orienta desde 2013 na iniciação científica e durante este processo se tornou meu sócio e um amigo. Agradeço a orientação, ensinamentos, auxílio e portas abertas para o meu crescimento profissional.

Ao meu supervisor alemão, Prof. Dr. Andreas Hensel, que abriu as portas de seu laboratório para me receber, me orientou e ensinou muito, tanto com seus conhecimentos quanto com sua cultura.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste trabalho, em especial à Helena, por ser tão querida e disposta a ajudar.

Aos colegas do laboratório Palafito, pela amizade, apoio e ajuda sempre que necessário.

Às minhas sócias da Startup Saludem Farmacêutica Ltda e amigas, Fernanda Pilatti e Larissa Valone, que compartilham de cada momento vivido na vida profissional e pessoal.

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo o conhecimento que adquiri ao longo do processo.

Aos membros da banca de qualificação, por se disponibilizarem a avaliar o meu trabalho e contribuir significativamente para melhora deste.

Ao CNPq, CAPES, INCT-if, FINEP e Fundação Araucária, pelos auxílios e suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino” – Leonardo da Vinci.

## BIOGRAFIA



Raquel Isolani Luvizotto é farmacêutica pela Universidade Estadual de Maringá. Durante o período da graduação, realizou trabalhos de iniciação científica no laboratório Palafito, formando-se em 2016. No mesmo ano, ingressou no mestrado em Ciências Farmacêuticas na mesma universidade, o qual concluiu no ano de 2018. Em 2018, iniciou o doutorado em Ciências Farmacêuticas e realizou um período na Alemanha, na Universidade de Münster, sob supervisão do prof. Dr. Andreas Hensel (março/2018 – fevereiro/2019). No final de 2019, juntamente com três sócios, iniciou o projeto da Startup Saludem Farmacêutica para inovação científica na área de fitofármacos, na qual atua como administradora. Atuou como professora no Centro Universitário Metropolitano de Maringá, de 2020 a 2022, ministrando aulas para os cursos de Farmácia e Biomedicina. Atualmente é professora colaboradora no Departamento de Farmácia, da Universidade Estadual de Maringá.

## RESUMO

ISOLANI, R. 2023. Inibição da adesão bacteriana, atividade das gingipaínas e da formação de biofilme de *Porphyromonas gingivalis* por *Limonium brasiliense*. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 80 p.

*Limonium brasiliense* Kuntze (Plumbaginaceae), popularmente conhecido como baicuru, é uma planta nativa da região sul do Brasil. Seu uso popular se dá para o tratamento de tensão pré-menstrual, distúrbios menstruais e infecções do trato geniturinário. A periodontite é caracterizada clinicamente pela destruição do sistema de suporte do dente e pode levar à perda dental. A bactéria oportunista Gram-negativa anaeróbia *Porphyromonas gingivalis* desempenha um papel dominante na periodontite. Os produtos naturais, principalmente polifenóis, têm sido descritos para periodontite, destinados a reduzir a inflamação, bem como a adesão bacteriana nas células hospedeiras. As frações semipurificadas e substâncias isoladas de *L. brasiliense* foram testadas *in vitro* quanto a sua capacidade antiadesiva frente a *P. gingivalis* em células epiteliais humanas KB, bem como na inibição da formação de biofilme e inativação das gingipaínas, principal fator de virulência encontrado nesta bactéria. As amostras não influenciaram a fisiologia celular das células KB quando testadas pelo método de MTT. Em concentrações de 50 µg/mL a fração acetato de etila e subfração foram capazes de reduzir a adesão de *P. gingivalis* às células KB significativamente em torno de 63 e 70%, respectivamente, bem como as substâncias isoladas, com a samarangenina A inibindo 72% da adesão a 30 µM, samarangenina B 71% a 20 µM e epigalocatequina-3-O-galato 79% a 30 µM. As amostras de fração aquosa foram capazes de reduzir a atividade proteolítica da gingipaína Arg-específica de forma concentração-dependente em torno de 80% a 100 µg/mL. A fração acetato de etila e subfração 7 inibiram da mesma forma que a fração aquosa, porém a 5 µg/mL. As amostras também foram testadas quanto a capacidade de inibição da formação de biofilme, se mostrando capazes de inibir significativamente em torno de 96% a 1000 µg/mL. Análises *in silico* foram realizadas e determinou-se que as amostras atuam em alvos específicos de *P. gingivalis*, não afetando as células de mamíferos. Desta forma, as frações e substâncias isoladas de *L. brasiliense* se mostram efetivas para prevenção de doença periodontal.

Palavras-chave: Farmacognosia, fitoquímica, periodontite, plantas medicinais, produtos naturais.

## ABSTRACT

ISOLANI, R. 2023. Inhibition of bacterial adhesion, gingipain activity and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* by *Limonium brasiliense*. PhD thesis, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 80 p.

*Limonium brasiliense* Kuntze (Plumbaginaceae), popularly known as baicuru, is a plant native to southern Brazil. Its popular use is for the treatment of premenstrual tension, menstrual disorders, and genitourinary tract infections. Periodontitis is clinically characterized by destruction of the tooth support system and can lead to tooth loss. The anaerobic Gram-negative opportunistic bacterium *Porphyromonas gingivalis* plays a dominant role in periodontitis. Natural products, mainly polyphenols, have been described for periodontitis, intended to reduce inflammation as well as bacterial adhesion in host cells. The semipurified fractions and substances isolated from *L. brasiliense* were tested *in vitro* for their anti-adhesive capacity against *P. gingivalis* in human KB epithelial cells, as well as for the inhibition of biofilm formation and inactivation of gingipains, the main virulence factor found in this bacterium. The samples did not influence the cellular physiology of KB cells when tested by the MTT method. At concentrations of 50 µg/mL, ethyl acetate fraction and subfraction 7 were able to reduce the adhesion of *P. gingivalis* to KB cells significantly around 63 and 70%, respectively, as well as the isolated substances, with samarangenin A inhibiting 72% of adhesion at 30 µM, 71% samarangenin B at 20 µM and 79% epigallocatechin-3-*O*-gallate at 30 µM. The aqueous fraction samples were able to reduce the proteolytic activity of Arg-specific gingipain in a concentration-dependent manner around 80% at 100 µg/mL. ethyl acetate fraction and subfraction 7 inhibited in the same way as the aqueous fraction, but at 5 µg/mL. The samples were also tested for the ability to inhibit biofilm formation, showing to be able to significantly inhibit around 96% at 1000 µg/mL. *In silico* analyzes were performed and it was determined that the samples act on specific targets of *P. gingivalis*, not affecting mammalian cells. Thus, the fractions and substances isolated from *L. brasiliense* are shown to be effective for the prevention of periodontal disease.

Keywords: Pharmacognosy, phytochemistry, periodontitis, medicinal plants, natural products.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Limonium brasiliense</i> Kuntze, Plumbaginaceae, (A) partes aéreas e rizomas, (B) excisada das partes aéreas e (C) excisada dos rizomas.....	19
Figura 2 - Estratégias pelas quais <i>P. gingivalis</i> podem invadir o corpo todo, representado por um esquema simples associando a bactéria a doenças sistêmicas. ....	39
Figura 3 - Teste de ágar difusão do EB, FAQ, FAE e FLB7 a 1000, 100, 10 e 1 µg/mL, e samarangenina A, samarangenina B e epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato a 100, 10 e 1 µg/mL, CP amoxicilina 12,5 µg/mL. CN PBS estéril. ....	48
Figura 4 - Viabilidade relativa (teste de MTT) de células KB após 24 h de tratamento com diferentes concentrações das frações de <i>Limonium brasiliense</i> : FAQ, FAE e F7. A viabilidade relativa está relacionada ao controle não tratado (UC = 100%). Os experimentos são expressos como média ± DP (%) de três experimentos independentes com n=3 replicatas. *** p < 0,001. ....	50
Figura 5 - Intensidade de fluorescência relativa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> marcada com FITC incubada com FAQ em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média ± DP (%) de n=3 experimentos independentes. *** p < 0,0001. ....	53
Figura 6 - Intensidade de fluorescência relativa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> marcada com FITC incubada com FAE em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média ± DP (%) de n=3 experimentos independentes. *** p < 0,0001. ....	54
Figura 7 - Intensidade de fluorescência relativa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> marcada com FITC incubada com F7 em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média ± DP (%) de n=3 experimentos independentes. *** p < 0,0001. ....	54
Figura 8 - Intensidade de fluorescência relativa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> marcada com FITC incubada com epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato (EGCG), samarangenina A (SA) e samarangenina B (SB) em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média ± DP (%) de n=3 experimentos independentes. *** p < 0,0001. ....	55
Figura 9 - Influência da FAQ, FAE e F7 na adesão relativa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> marcada com FITC às células KB em experimento de coincubação (90 min)	

em placas de 96 poços. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média ± DP (%) de n = 3 experimentos independentes. *** p < 0,0001.	
Figura 10 - Influência da samarangenina A, samarangenina B e epigallocatequina-3-O-galato na adesão relativa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> marcada com FITC às células KB em experimento de coincubação (90 min) em placas de 96 poços. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média ± DP (%) de n = 3 experimentos independentes. *** p < 0,0001.	57
Figura 11 - As múltiplas atividades patogênicas das gingipaínas e suas associações com periodontite e outras doenças	60
Figura 12 - Influência da FAQ (12,5, 25, 50 e 100 µg/mL) na atividade das proteases Arg-gingipaína (A) e Lis-gingipaína (B) em relação a <i>Porphyromonas gingivalis</i> não tratada. Leupetina a 5µM serviu como controle positivo (PC), bactérias não tratadas como controle negativo (UC). Os dados são a média ± DP (%) de 3 experimentos independentes com n = 3 replicatas técnicas. *** < 0,0001.	61
Figura 13 - Influência da FAE 5, 10, 20 e 30 µg/mL nas proteases Arg-gingipaína (A) e 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL Lis-gingipaína (B) em relação a <i>Porphyromonas gingivalis</i> não tratada. Leupetina a 5µM serviu como controle positivo (PC), bactérias não tratadas como controle negativo (UC). Os dados são a média ± DP (%) de 3 experimentos independentes com n = 3 replicatas técnicas. *** < 0,0001.	62
Figura 14 - Influência da F7 5, 10, 20 e 30 µg/mL nas proteases Arg-gingipaína (A) e 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL Lis-gingipaína (B) em relação a <i>Porphyromonas gingivalis</i> não tratada. Leupetina a 5µM serviu como controle positivo (PC), bactérias não tratadas como controle negativo (UC). Os dados são a média ± DP (%) de 3 experimentos independentes com n = 3 replicatas técnicas. *** < 0,0001.	62
Figura 15 - Influência relativa das frações FAQ, FAE e F7 na formação de biofilme em relação ao controle não tratado (UC = 100%). Resultados expressos como média ± DP (%) de n = 3 experimentos independentes. *** p < 0,0001.	64



## LISTA DE SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase	F7 (FLB7) – Fração 7 da coluna cromatográfica de <i>Limonium brasiliense</i>
Arg – Arginina	FAE – Fração acetato de etila
B16-F10 – Células de melanoma	FAQ – Fração aquosa
BChE – Butirilcolinesterase	FITC – Isotiocianato de fluoresceína
BSA – Bovine Serum Albumine	FRAP – Ferric reducing ability of plasma
CCD – Cromatografia em camada delgada	GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
cDNA – DNA complementar	Glut – Transportador de glicose
CECs – Células endoteliais cerebrais	HCT116 – Células de câncer de cólon humano
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	HeLa – Células de carcinoma cervical humano
CUPRAC – Copper reducing antioxidant capacity	HEPG2 – Células de câncer de fígado humano
DMSO – Dimetilsulfóxido	HSCs – Células estreladas hepáticas
DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	HSV-1 – Herpes Simplex Vírus tipo 1
EB – Extrato bruto	HT-29 – Células de adenocarcinoma de cólon humano
EC <sub>50</sub> – Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo	I.P. – Intra-peritonal
ECA – Enzima conversora de angiotensina	IC – Inhibitory concentration
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetraacético	IL – Interleucina
EMEM – Earl's minimum essential medium	Lis – Lisina
	LPS – Lipopolissacarídeo

MCF~7 – Células de câncer de mama

MDBK – Células de rim humano

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MIC – Minimal inhibitory concentration

MRSA – Meticilin resistant  
*Staphylococcus aureus*

MTT – 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio bromida

NF-KB – Complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição

NMDA – *N*-metil D-Aspartato

NO – Óxido nítrico

OD – Optical density

PBS – Phosphate buffered saline

PTP1B – Protein tyrosine phosphatase 1B

qPCR – PCR em tempo real

RAW 264 – Células macrófagos murinos

RT-PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SH-SY5Y – Células de medula óssea

TLCK - *N* $\alpha$ -*p*-tosil—L-lisina clorometil cetona

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral

U2-OS – Osteosarcoma

UC – Untreated control

UV/VIS – Ultravioleta visível

VREfm – *Enterococcus faecium* resistente à Vancomicina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	24
2.1 Família Plumbaginaceae.....	24
2.2 Gênero <i>Limonium</i> .....	24
2.2.1 Atividades biológicas de plantas do gênero <i>Limonium</i> .....	24
2.3 <i>Limonium brasiliense</i> .....	31
2.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	34
3 METODOLOGIA.....	40
3.1 Droga vegetal.....	40
3.2 Preparo de extrato bruto e fração acetato de etila.....	40
3.2.1 Extrato bruto dos rizomas de <i>Limonium brasiliense</i> .....	40
3.2.2 Partição líquido-líquido a partir do EB .....	40
3.2.1 Isolamento cromatográfico .....	41
3.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	41
3.4 Cultura de células bucais humanas (KB).....	41
3.5 Ensaio de toxicidade .....	42
3.5.1 Toxicidade contra <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	42
3.5.2 Toxicidade contra células bucais humanas (KB) .....	42
3.6 Ensaio de inibição da adesão .....	43
3.6.1 Marcação da bactéria.....	43
3.6.2 Investigação da influência das amostras na marcação da bactéria ( <i>Quenching test</i> ) .....	43
3.6.4 Atividade antiadesão por ensaio fluorimétrico de placa.....	44
3.7 Ensaio de inibição da atividade das gingipaínas.....	44
3.8 Determinação da atividade antibiofilme.....	45
3.9 <i>Docking reverso</i> .....	45

3.10 Análise estatística .....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1 Escolha das amostras para realização da investigação de atividade antiadesiva..	47
4.2 Ensaio de toxicidade .....	47
4.2.1 Toxicidade contra <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	47
4.2.2 Toxicidade contra células epiteliais da mucosa oral humana (KB).....	49
4.3 Ensaio de inibição da adesão .....	52
4.3.1 Investigação da influência das amostras na marcação da bactéria ( <i>Quenching test</i> ) .....	52
4.3.2 Atividade antiadesão por ensaio fluorimétrico de placa.....	55
4.4 Ensaio de inibição da atividade das gingipainas .....	59
4.5 Determinação da atividade antibiofilme.....	63
4.6 <i>Docking reverso</i> .....	65
5 CONCLUSÕES .....	68
REFERÊNCIAS .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país com uma grande biodiversidade, com uma biota estimada entre 170 e 210 mil espécies, correspondendo a cerca de 13% da riqueza mundial. As plantas estão entre os grupos mais bem estudados no Brasil e reconhece-se a ocorrência de 34.916 espécies (Simões et al., 2016).

Entre as plantas estudadas encontra-se a espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (figura 1), que é conhecida popularmente como baicuru ou guaicuru e pertence à família Plumbaginaceae. É uma planta encontrada na América do Sul e vegeta no litoral, preferencialmente em terrenos baixos e banhados com água salgada, desde o Rio de Janeiro até o nordeste da Argentina (Correa e Penna, 1974).

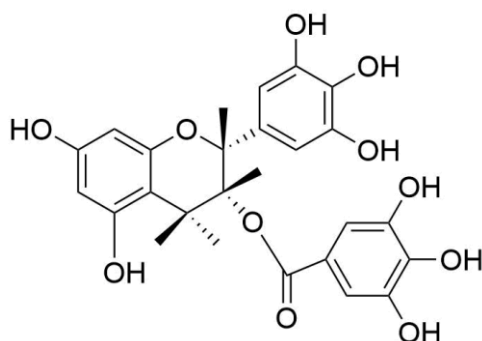


**Figura 1** - *Limonium brasiliense* Kuntze, Plumbaginaceae, (A) partes aéreas e rizomas, (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata dos rizomas. Fonte: Andressa Blainski (2010).

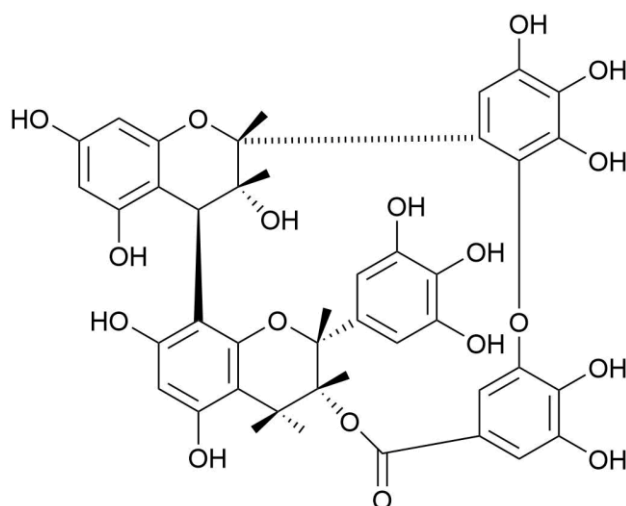
O farmacógeno do *L. brasiliense* é seu rizoma, que é empregado popularmente na forma de decocto ou infuso como antisséptico nas infecções geniturinárias e possui também a propriedade de ser adstringente. Tem como outras indicações seu uso como diurético, no tratamento do reumatismo, artrite, úlceras, na hemorragia intestinal e diarreia crônica (Cardoso, 1990b; Moura et al., 1985). Seus extratos são ainda recomendados para normalizar os períodos menstruais em mulheres com atraso ou irregularidades na menstruação (Lifchitz, 1981).

Foi relatada nos rizomas de *L. brasiliense* a presença de proantocianidinas e flavan-3-ol, como ácido gálico, epigalocatequina-3-*O*-galato (**1**), samarangenina A (**2**) e samarangenina B (**3**) (de Oliveira Caleare et al., 2017; Murray et al., 2004).

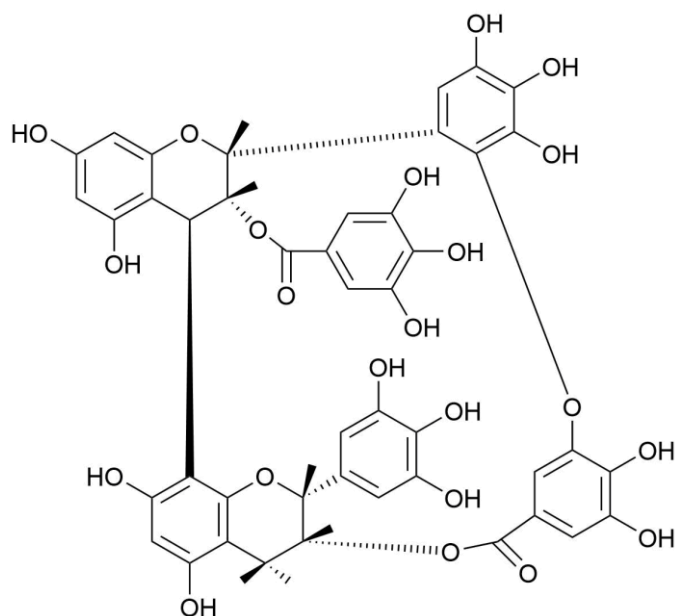
(1)



(2)



(3)



Análises de taninos condensados são complexas devido à diversidade de estruturas encontradas nesse grupo de substâncias (Schofield et al., 2001). Os taninos

condensados são polímeros de unidades de flavonóis e a presença de ésteres de galato pode alterar suas propriedades biológicas significativamente (Hagerman e Butler, 1989).

Sabe-se que o impacto da atividade antimicrobiana depende da configuração estrutural da molécula (Gyawali e Ibrahim, 2014) e os compostos fenólicos possuem variações estruturais e o que confere aos taninos suas propriedades características são os grupos hidroxila na posição fenólica (Haslam, 1974). A adstringência dos taninos pode induzir a formação de complexos com enzimas ou substratos microbianos, podendo afetar também o metabolismo do micro-organismo com alterações em sua morfologia. Podem ocorrer também alterações em membranas de bactérias, inibindo a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias ou o sistema de transporte de elétrons. Pode-se notar que para ter efeito nas membranas microbianas, os taninos têm a capacidade de cruzar a barreira da parede celular (Scalbert, 1991).

Grande parte da população mundial pode ser afetada por doenças periodontais, sendo a maior causa de perda de dentes em adultos devido à perda do tecido conectivo e do suporte ósseo, além disso, a incidência global de periodontite aumentou 83,4% em todas as divisões geográficas de 1990 - 2019 (Pihlstrom et al., 2005; Wu et al., 2022). A maioria dos micro-organismos que habitam a cavidade oral são comensais, porém existem algumas espécies oportunistas (Paster et al., 2001). Essas são bactérias que existem na flora bacteriana normal de um indivíduo e se tornam patogênicas devido a diminuição de defesas orgânicas como, por exemplo, a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, que causa doenças periodontais severas. A transmissão se dá comumente pelo contato pessoa-pessoa (Van Winkelhoff e Boutaga, 2005).

O complexo vermelho, o qual inclui *P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, consiste no mais importante grupo de patógenos em doenças periodontais adultas. Essas bactérias dificilmente são encontradas sozinhas, mas em combinação nas bolsas periodontais, sugerindo que causam destruição do tecido oral de uma maneira cooperativa (Suzuki et al., 2013).

*Porphyromonas gingivalis* coloniza a região subgengival, passando primeiramente entre os fluídos orais, alcançando os tecidos bucais (Lamont and Jenkinson, 2000). Para que a bactéria estabeleça infecção, é necessário que haja adesão à superfície das células hospedeiras (Boyle e Finlay, 2003). Para que isso ocorra, o micro-organismo deve possuir várias adesinas, tais como fímbrias, hemaglutininas e

proteínases, permitindo a adesão à células epiteliais, fibroblastos, eritrócitos e alguns componentes da matriz extracelular, como laminina, elastina, fibronectinas, entre outros (Lamont e Jenkinson, 2000).

As gingipaínas são as mais potentes adesinas e fatores de virulência dessa bactéria. São proteínas da membrana externa, do tipo cisteína proteínases. Baseada em sua especificidade lítica frente aos substratos, elas são divididas em arginina-específica (Arg-X) ou lisina-específica (Lis-X). Quando secretadas, se ligam a diversas proteínas do hospedeiro, o que acarreta a destruição dos tecidos e ativação de respostas imunológicas e inflamatórias (Curtis et al., 2001).

Além da adesão, a formação de biofilme é um mecanismo de sobrevivência indispensável para a bactéria escapar do sistema de defesa do organismo ao qual está hospedada. Após a primeira etapa de adesão, a formação de biofilme é a próxima etapa decisiva na manifestação da infecção (Jefferson, 2004).

Bactérias anaeróbias, como *P. gingivalis*, dependem dos primeiros colonizadores para formar um ambiente anaeróbico adequado. Os colonizadores precoces, incluindo *Streptococcus* e *Actinomyces*, aderem às películas salivares nos dentes utilizando adesinas. *Fusobacterium nucleatum* é um colonizador intermediário que serve como ponte central por coagregação seletiva, atraindo colonizadores tardios. Foi demonstrado que *P. gingivalis*, mesmo em baixas concentrações, pode elevar a virulência do biofilme periodontal, alterando as estruturas da comunidade do biofilme e facilitando um aumento na carga bacteriana geral, levando à sua designação como patógeno fundamental (Sakanaka et al., 2016).

Os organismos dentro dos biofilmes são protegidos contra os processos de limpeza da saliva, bem como contra os mecanismos de defesa dos fagócitos do hospedeiro. A partir do abrigo do biofilme, uma única bactéria mostra uma tolerância aumentada contra antibióticos e antissépticos (Jefferson, 2004). O mecanismo mais provável é a penetração diminuída ou incompleta dos antibióticos no biofilme e a acessibilidade prejudicada associada ao alvo. O microambiente alterado também influencia o pH e o nível de oxigênio, o que por sua vez tem consequências na eficácia dos antibióticos (Stewart, 2002).



O tratamento consiste em raspagem mecânica da massa bacteriana e utilização de agentes químicos, como antibióticos ou clorexidina. Somente o tratamento medicamentoso não é eficaz devido a fatores farmacocinéticos, como lavagem pelas secreções salivares, baixa concentração nos fluídos do sulco gengival e pela formação de biofilme (Löhr et al., 2011b).

Uma alternativa para o tratamento e prevenção de periodontite são as terapias antiadesivas (Ofek et al., 2003; Rasko e Sperandio, 2010) que evitam que as bactérias se liguem aos tecidos do hospedeiro (Sharon, 2006).

Testes realizados com o extrato bruto de *L. brasiliense* contra *P. gingivalis* demonstraram a capacidade do extrato da droga vegetal em inibir a adesão da bactéria nas células epiteliais por meio da interação com as gingipaínas (de Oliveira Caleare et al., 2017).

Conhecendo as dificuldades no tratamento das infecções por *P. gingivalis*, a necessidade de novas substâncias capazes de inibir esse micro-organismo é relevante. Para a obtenção de fármacos efetivos para o controle das doenças causadas por *P. gingivalis*, são necessários estudos para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro e a elucidação de novos alvos quimioterápicos presentes no biofilme da bactéria.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Plumbaginaceae

A família Plumbaginaceae Juss. é a maior família pertencente às Angiospermas e possui 24 gêneros, com cerca de 2340 espécies, sendo 635 nomes aceitos e 630 sinônimos, os demais não são avaliados (List, 2013b). Essas espécies vegetam regiões semiáridas, litorâneas e salgadas (Simões et al., 2016).

No Brasil existem dois gêneros pertencentes a essa família, *Plumbago* L. e *Limonium* Mill., porém apenas duas espécies os representam, *P. scandens* L. e *L. brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Zappi, 2015).

A família Plumbaginaceae representa ervas perenes e arbustos, com suas plantas caracterizadas por folhas simples e alternas, sem estípulas. As flores são vistosas, bissexuais e possuem simetria radial (Joly, 2005; W. John Kress, 2008).

### 2.2 Gênero *Limonium*

O gênero *Limonium* pertence à família Plumbaginaceae e possui cerca de 777 espécies, com 163 destas aceitas e 113 sinônimos, as demais não são avaliadas (Kunitake et al., 1995; List, 2013a). As plantas pertencentes ao gênero *Limonium* são usadas por floriculturas no preparo de arranjos, usando suas flores frescas ou desidratadas (Kunitake et al., 1995; Lopes et al., 2003). Esse gênero possui riquíssima composição química, com aminoácidos, taninos, flavonoides, polissacarídeos, entre outros (Eren and Özata, 2014).

#### 2.2.1 Atividades biológicas de plantas do gênero *Limonium*

##### 2.2.1.1 Atividade antimicrobiana

Diversos estudos relatam atividades biológicas distintas em plantas pertencentes a esse gênero. Yurchysyn e colaboradores (2017) relataram que o extrato acetônico e fração acetato de etila de *L. meyeri* (Boiss.) Kuntze e *L. hypanicum* Klokov possuem atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e isolados clínicos que apresentam MIC<sub>90</sub> 250 µg/mL. *L. hypanicum* demonstrou ainda atividade contra *Propionibacterium acnes* em diluições de 1:640-1:1280. Os autores correlacionam a atividade antimicrobiana à presença de taninos e ácido gálico e elágico livres presentes nas espécies.

Extratos de caules e folhas de *Limonium sokotranum* (Vierh.) Radcl.-Sm foram testados quanto a constituição fitoquímica e atividade antimicrobiana, demonstrando que o extrato metanólico das folhas possuem alta atividade contra *Micrococcus luteus* (MIC 15,6 µg/mL), *S. aureus* (MIC 125 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 125 µg/mL). Os achados fitoquímicos confirmam a presença de flavonoides, alcaloides e terpenoides (Al-Madhagi et al., 2019).

Um estudo comparativo entre os constituintes fitoquímicos de três espécies de *Limonium* foi realizado por Gadetskaya e colaboradores (2017), utilizando *L. myrianthum* (Schrenk ex Fisch. & C.A. Mey.) Kuntze, *L. leptophyllum* Kuntze e *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze, demonstrando que o composto (2*R*,3*S*)-2,3,4-trihidroxi-2-metilbutil galato possui boa atividade contra cepas de malária sensíveis e resistentes à cloroquina, enquanto o composto miricetina-3-*O*-(6"-galoilglucosídeo) demonstrou significativa atividade contra *Trypanosoma brucei*.

O óleo volátil e os extratos orgânicos (metanol, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol) de *L. oleifolium* Mill. tiveram sua capacidade antioxidante testada pelos métodos DPPH, ABTS, β-caroteno/ácido linolênico, CUPRAC e capacidade redutora de ferro. Os resultados comprovaram a capacidade antioxidante do óleo volátil de *L. oleifolium*. Além disso, o óleo essencial demonstrou possuir significativa atividade contra o trofozoíta *Acanthamoeba castellanii* (IC<sub>50</sub> 7,48 ± 0,41 µg/mL) e contra o promastigota de *Leishmania amazonensis* (IC<sub>50</sub> 19,36 ± 1,06 µg/mL), além de baixa citotoxicidade contra macrófagos murinos (LC<sub>50</sub> 90,23 ± 1,09 µg/mL), bem como boa atividade contra *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* e *P. aeruginosa* (Mennai et al., 2021).

Compostos isolados de *L. morisianum* Arrigoni foram testados contra HIV-1 transcriptase reversa associada à atividade de RNase e integrase. As substâncias (-)-epigalocatequina-3-*O*-galato e miricetina-3-*O*-(6"-*O*-galoil)-β-D-galactopiranosídeo inibiram a atividade de ambas as enzimas com valores de IC<sub>50</sub> entre 0,21 e 10,9 µM. Por outro lado, a triptamina e o ácido ferúlico inibiram somente a enzima integrase, mostrando uma seletividade por esta enzima (Sanna et al., 2019).

Uma triagem *in silico* e simulação dinâmica molecular (M<sup>Pro</sup>) dos isolados do extrato etanólico (70%) de *L. tubiflorum* (Delile) Kuntze foram executados contra a principal protease e glicoproteína *spike* de SARS-CoV2, as quais desempenham papel

crucial na replicação viral. Os estudos de *docking molecular* revelaram que os compostos miricetina-3-*O*-(2"-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e miricetina-3-*O*-(2"-galoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo podem ser efetivos contra a principal protease e glicoproteína *spyke*, respectivamente. Além disso, a relação estrutura-atividade comprovou que a presença da unidade galoil é essencial para a atividade dos compostos (Hassan et al., 2021).

#### 2.2.1.2 Atividade citotóxica

Uma avaliação de *L. bicolor* (Bunge) Kuntze a partir de um fracionamento e isolamento bioguiado demonstrou que os compostos luteolina e quercetina presentes no extrato da planta produzido com acetato de etila, possuem boa citotoxicidade contra células de câncer de cólon, além da substância canferol que inibiu o crescimento de células de câncer de mama (MCF~7) e osteosarcoma (U2-OS) em uma concentração de 100  $\mu$ g/mL (Chen et al., 2017).

Extratos de *L. tubiflorum* (Delile) Kuntze var. *tubiflorum* foram testados para determinação de atividade citotóxica *in vitro* contra células de câncer de mama MCF~7, células de câncer de fígado humano HEPG2 e células de câncer de cólon humano HCT116, exibindo citotoxicidade moderada comparada com doxorrubicina (controle positivo), demonstrando valores de IC<sub>50</sub> de  $2,97 \pm 0,9$ ,  $4,57 \pm 0,5$  e  $3,73 \pm 0,6$   $\mu$ g/mL, respectivamente (El-Kousy et al., 2021).

Hamadou e colaboradores (2019) testaram a propriedade pró-apoptótica do extrato *n*-butanólico de *L. duriusculum* (Girard) Fourr. e suas substâncias majoritárias, apigenina e apigenina-7-*O*- $\beta$ -D-(6"-metilglucuronídeo), obtendo valores de IC<sub>50</sub> de 7,60  $\mu$ g/mL para o extrato e 25,74  $\mu$ M para apigenina, enquanto apigenina-7-*O*- $\beta$ -D-(6"-metilglucuronídeo) não afetou a proliferação celular em linhagem de HCT116 selvagem.

Extratos etanólicos de diferentes partes de *L. effusum* (Boiss.) Kuntze foram usados para determinar atividade mutagênica e citotóxica. Foi realizado o teste de Ames com cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 para determinação da mutagenicidade, demonstrando que o extrato das raízes possuem efeito mutagênico. O teste de MTT foi realizado para determinação de toxicidade em células MDBK, resultando em aumento da taxa de proliferação celular em 24 h de tratamento com 50, 25, 12,5 e 6,25  $\mu$ g/mL (Eren, 2019).

As atividades antiproliferativas (em HT-29 – adenocarcinoma de cólon humano e HeLa – carcinoma cervical humano), antioxidantes e inibidoras do dano oxidativo do DNA do extrato *n*-butanólico das partes aéreas de *L. bonduelli* foram avaliadas e demonstraram valores de IC<sub>50</sub> significativos nos testes de peroxidação lipídica (IC<sub>50</sub> 181,18 ± 0,65 µg/mL) e 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (IC<sub>50</sub> 14,92 ± 0,032 µg/mL). O extrato também protegeu o plasmídeo do DNA contra o dano causado por estresse oxidativo e também apresentou efeitos antiproliferativos concentração-dependente (Amrani et al., 2019).

As propriedades antimelanogênicas de extratos *L. tetragonum* também foram testadas, bem como de dois flavonoides glicosilados isolados desta planta (miricetina-3-galactosídeo e quercetina-3-*O*-β-galactopiranosídeo). Os experimentos foram conduzidos em modelo de célula de melanoma em camundongo B16-F10 com foco na atividade e produção de tirosinase. A capacidade antimelanogênica dos extratos e compostos foi confirmada por seus efeitos inibitórios da tirosinase, prevenção da oxidação de DOPA e supressão da produção de melanina (Lee et al., 2017).

Em uma revisão sistemática realizada por Gancedo e colaboradores (2023) foi demonstrado que *L. tetragonum* foi a espécie mais avaliada, com efeitos anti-melanogênese *in vitro* promissores. Compostos isolados da classe dos flavonoides, como a apigenina de *L. duriusculum*, também demonstraram efeito citotóxico favorável contra o câncer colorretal, assim como as lignamidas de *L. gmelinii* contra linhas celulares de adenocarcinoma de colo do útero e mama.

### 2.2.1.3 Atividade anti-inflamatória

*Limonium duriusculum* e sua apigenina foram testados também quanto a capacidade anti-inflamatória em linhagens celulares e *in vivo*. A propriedade anti-inflamatória do extrato *n*-butanólico e da apigenina foram medidas em atividade transcripcional NF-KB e em células estimuladas com TNFα e LPS, também foram avaliadas *in vivo* no modelo de edema de pata induzido por carragenina. O tratamento com o extrato foi capaz de inibir a atividade do gene de NF-KB em HCT116 na presença e na ausência de TNFα exógeno, usado como um NF-KB indutor (Hamadou et al., 2021).

### 2.2.1.5 Atividade em doenças metabólicas

A prevenção de ganho de peso em excesso, obesidade e problemas relacionados com tais condições foram avaliados com o uso de fração acetato de etila de *L. tetragonum* a 100 mg/kg, demonstrando resultados positivos quanto à redução do ganho de tecido adiposo, aumento de triacilglicerídeos e colesterol total em ratos alimentados com dieta rica em gordura durante 8 semanas. Além disso, a tolerância à glicose e resistência à insulina nos ratos obesos foi melhorada após a administração desta fração. Os componentes majoritários presentes são (-)-epicatequina-3-(3"-*O*-metil)-galato, (-)-epicatequina-3-*O*-galato e miricetina-3-*O*-β-D-galactopiranosídeo (Kim et al., 2017).

No estudo de Kwon e colaboradores (2019), foram avaliadas diferentes subfrações de *L. tetragonum* quanto a habilidade de prevenir a adipogênese em pré-adipócitos em diferenciação (3T3-L1), demonstrando a capacidade de supressão da adipogênese e redução da expressão de fatores de transcrição relacionados à adipogênese. Foram testadas subfrações produzidas com água, butanol, metanol 85% e hexano, dentre estas, as produzidas com água e hexano foram as mais efetivas na redução do acúmulo lipídico e regulação da diferenciação de adipócitos.

Extrato etanólico das raízes de *L. axillare* (Forssk.) Kuntze foi administrado a ratos diabéticos em uma concentração de 500 mg/kg e foi capaz de reduzir a glicemia induzida por estreptozotocina em 44%, restaurou os níveis séricos de insulina, reestabeleceu a expressão de Glut2 e Glut4 e melhorou o dano tecidual no pâncreas. Estudos *in vitro* revelaram potente atividade antioxidante e inibitória de α-glicosidase e α-amilase, com valores de IC<sub>50</sub> de 25,2, 44,8 e 89,1 μg/mL, respectivamente. Análises em CLAE revelaram que umbeliferona (cumarina) é o composto que está presente em maior quantidade no extrato (10 ± 0,081 mg/g de extrato) (Abdel-Sattar et al., 2021).

O extrato acetato de etila e lignamidas isoladas de *L. gmelinii* foram submetidos a testes antidiabetes contra PTP1B e α-glucosidase, demonstrando inibição significativa de ambas as vias, com IC<sub>50</sub> 0,44 ± 0,03 μg/mL e 1,48 ± 0,09 μg/mL, respectivamente. A partir disto, uma análise de relação estrutura-atividade foi realizada e comprovou que, compostos que contém maior quantidade de hidroxilas apresentam atividade inibitória superior do que aqueles que possuem grupamentos metoxilas (Tuohongerbieke et al., 2021).

### 2.2.1.6 Atividade antioxidante

*Limonium spatulatum* (Desf.) Kuntze foi testado quanto a sua capacidade antioxidante, inibidora da acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE),  $\alpha$ -glucosidase e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de murinos (RAW 264). Os extratos da planta foram preparados com metanol, metanol:água (5:1) e clorofórmio. Os extratos polares demonstraram maior concentração de polifenóis totais, exibindo também o maior potencial antioxidante. O extrato produzido com metanol:água foi o que melhor inibiu AChE e BChE (origem animal), com valores de IC<sub>50</sub> de  $3,28 \pm 0,16$   $\mu\text{g/mL}$  e  $26,64 \pm 0,96$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Esse mesmo extrato e o extrato produzido com metanol foram mais efetivos na inibição da  $\alpha$ -glucosidase do que o controle utilizado (acarbose). Além disso, o extrato metanólico apresentou o melhor resultado anti-inflamatório inibindo a liberação NO em 86,21% a 100  $\mu\text{g/mL}$  em células RAW 264 (Mazouz et al., 2020).

*Limonium delicatulum* (Girard) Kuntze e *L. quesadense* Erben foram testados quanto a capacidade antioxidante (fosfomolibidênio, DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP e atividade quelante de metais), bem como capacidade inibitória de enzimas (AChE, BChE, tirosinase, amilase, glucosidase e lipase), demonstrando que os extratos metanólicos de ambas as espécies contêm maior concentração de polifenóis totais e são mais bioativos que os extratos aquosos. *L. quesadense* exibiu atividade mais potente em todos os ensaios (Ruiz-Riaguas et al., 2020). Os resultados para a capacidade antioxidante de *L. delicatulum* também foram confirmados por Bakhouche e colaboradores (2021), comprovando ainda que o extrato metanólico de suas raízes é capaz de inibir a enzima tirosinase com mais potência que o extrato metanólico de suas folhas. Os extratos foram capazes ainda, de inibir a desnaturação de BSA por calor em atividade dose-dependente.

Extratos das partes aéreas e das raízes de *L. bellidifolium* (Gouan) Dumort., *L. globuliferum* Kuntze, *L. gmelinii*, *L. lilacinum* (Boiss.) Wagenitz, *L. sinuatum* (L.) Mill. e *L. iconicum* (Boiss. & Heldr.) Kuntze foram testados quanto a capacidade antioxidante e inibitória de enzimas. As espécies *L. gmelinii*, *L. iconicum* e *L. globuliferum* apresentaram significativos resultados antioxidantes pelos métodos de DPPH e ABTS (Senizza et al., 2021).

A capacidade antioxidante, antimicrobiana e inibidora de enzima foi avaliada nos extratos metanólicos de *L. effusum* Kuntze e *L. sinuatum*. Os autores confirmam que

a capacidade antioxidante é maior nas frações acetato de etila e que ambas as espécies são mais efetivas contra bactérias Gram positivas do que Gram negativas. Atividade anticolinesterásica também foi observada em *L. sinuatum*. A fração acetato de etila das duas espécies possuem atividade antitirosinase e a fração acetato de etila e extrato metanólico de *L. sinuatum* ainda é capaz de inibir significativamente a ação da lipase pancreática (Baysal et al., 2021).

Amrani e colaboradores (2017) determinaram a atividade antioxidante e a habilidade protetiva do extrato *n*-butanólico das partes aéreas de *L. bonduelli* (T.Lestib.) Kuntze na peroxidação lipídica induzida por FeSO<sub>4</sub> em cérebro de rato, revelando que o extrato inibiu a produção de malondialdeído em cerca de 89,80%, similar a vitamina C na mesma concentração (100 µg/mL), demonstrando um efeito antiperoxidação lipídica importante, sendo útil na prevenção de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

#### 2.2.1.7 Outras atividades biológicas

*Limonium michelsonii* Lincz. possui capacidade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA) e seus componentes foram estudados a fim de determinar quais eram os responsáveis por essa atividade. Vinte compostos foram isolados e todos eles, com exceção dos galatos (ácido gálico, metilgalato e ácido vanílico), apresentaram significativa inibição da ECA, com valores de IC<sub>50</sub> entre 7,1 e 138,4 µM, demonstrando ainda que os glicosídeos de flavonóis são ainda mais potentes que suas agliconas correspondentes (Jenis et al., 2017).

No estudo de Nurkenov e colaboradores (2020), foi aplicado o método de oclusão da artéria cerebral média para induzir acidente vascular cerebral isquêmico (AVC) focal em ratos Wistar. O grupo de ratos tratado com extrato de *L. gmelinii* recuperou parcialmente as funções sensório-motoras que estavam deficientes após a isquemia depois de duas semanas com uma diminuição adicional na deficiência sensório-motora em comparação aos animais não tratados, que por sua vez tiveram ligeira melhora na função sensório-motora após 2 e 4 semanas. O extrato de *L. gmelinii* foi administrado por 28 dias após a isquemia, em uma dose de 200 mg/kg por dia. A análise histológica demonstrou que o tecido necrosado dos animais foi parcialmente recuperado após tratamento, comprovando as propriedades neuroprotetoras da planta. Em outro estudo de Nurkenov e colaboradores (2021), foi aplicado um modelo oxidativo e inflamatório induzido por NMDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TNF-α em neurônios primários



humanos e astrócitos, e em células endoteliais cerebrais (CECs) de camundongos *in vitro*, comprovando que um pré-tratamento das células com extrato de *L. gmmelinii* suprimiu o estresse oxidativo em todos os tipos celulares e as respostas pró-inflamatórias nos astrócitos e CECs.

### 2.3 *Limonium brasiliense*

Inicialmente designado como *Statice brasiliense* Boiss. (Candolle, 1864), foi apresentada por Kuntze (1891) pelo nome botânico *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze\*. É conhecida, popularmente, como baicuru, guaicuru ou guaicurá, sendo uma erva perene, distribuída pela Argentina, Uruguai e Brasil – desde o Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul – preferencialmente em terrenos baixos e sujeitos à maré (solo salino) e nas margens do Rio da Prata (Moura et al., 1985; Murray et al., 2004). Segundo Der Pflanzenfamilien (1964), *L. brasiliense* é uma espécie pertencente à família Plumbaginaceae e à subfamília Staticeae. A espécie apresenta duas sinónímias – *L. brasiliense* var. *brasiliense* e *L. brasiliense* var. *patagonicum* (Speg.) Burkart (The Plant List, 2013)

A descrição morfo-anatômica das raízes de baicuru foi realizada pela primeira vez por Dias da Silva e estão relatadas somente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (Dias da Silva, 1920). Além disso, o baicuru é uma erva de 30 a 50 cm de altura, com folhas basilares, longamente pecioladas, disposta em rosetas, com flores pequenas, de cálice avermelhado e corola azulada dispostas em panículas piramidais (Moura et al., 1985).

Estudos morfo-anatômicos foram realizados para auxiliar ao controle de qualidade da matéria prima, a fim de evitar amostras trocadas ou adulteradas. Devido à sua cor e crescimento parcialmente enterrado no solo arenoso do litoral, o rizoma desta espécie pode ser confundido com uma raiz principal tuberosa, podendo ser observado nas descrições de Reitz (1965). Como descrito por Dias da Silva (1920) a periderme possui tecidos pretos e no interior é castanho avermelhado. Assim, Antonelli-Ushirobira et al. (2015b) determinaram que para *L. brasiliense* o farmacógeno trata-se de rizomas e não raízes. O rizoma de *L. brasiliense* é longo e grosso, com superfície marrom escura, carregando estrias longitudinais delicadas e pequenas e profundas fissuras transversais.

Quimicamente a planta foi descrita inicialmente por Rosito (1975) o qual analisou um extrato hidroetanólico e verificou a presença de taninos hidrolisáveis,

---

\* *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze de acordo com Flora e Funga do Brasil (2023)

condensados, ácido-4-metóxi-gálico,  $\beta$ -sitosterol e saponinas triterpênicas. Posteriormente foi descrito a presença de taninos, leucoantocianinas, ácido hidroxicinâmico e ácido elágico nos rizomas (Medina et al., 1977; Ragonese e Milano, 1984). Cardoso (1990a) verificou a presença de ácido gálico, epicatequina e taninos condensados por técnica de CCD. De um extrato metanólico das raízes de *L. brasiliense* foi isolado miricetina-3-*O*- $\alpha$ -raminopiranosídeo, ácido gálico, epigalocatequina, galocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galato. Também foi verificada a presença de ácido-4-metóxi-gálico, benzoato de benzila, sacarose, flavona, isoflavona, flavonona e cumarina (Moura et al., 1985; Murray et al., 2004).

O conteúdo de polifenóis totais do extrato dos rizomas de *L. brasiliense* foi determinado por método espectrofotométrico UV/VIS. O método desenvolvido e validado determinou 23,5% de polifenóis totais no extrato, expressos em porcentagem de pirogalol (Blainski et al., 2013).

Foram verificadas atividades biológicas do extrato etanólico dos rizomas, como bacteriostática, anti-inflamatória e antagonista de bradicinina e ocitocina em associação com paracetamol (Jahns e Crescente, 1976).

Alguns estudos de avaliação biológica de extratos de *L. brasiliense* têm sido relatados. Rosito (1975) verificou a atividade do extrato hidroetanólico das raízes de baicuru frente à *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. Faral-Tello et al. (2012) demonstraram interessante atividade antiviral de extrato etanólico de *L. brasiliense* frente ao vírus HSV-1, o qual inibiu a replicação *in vitro*, com EC<sub>50</sub> de 185  $\mu$ g/ml.

Murray et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante, pela determinação do IC<sub>50</sub> através da habilidade de quelar radicais livres usando o método de DPPH. Foi avaliado o extrato metanólico das raízes de *L. brasiliense*. Foi isolado miricetina-3-*O*- $\alpha$ -raminopiranosídeo como componente mais ativo (IC<sub>50</sub> 40,0  $\mu$ M). O extrato metanólico, rico com esta substância apresentou IC<sub>50</sub> de 20,7  $\mu$ M. Também foi verificada a presença de ácido gálico, epigalocatequina, galocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galato.

Moura et al. (1985) demonstraram ação anti-inflamatória do extrato etanólico, por via i.p., na dose de 250 mg/kg no teste do edema de pata induzido por carragenina.

Foi testada *in vitro* a atividade anti-inflamatória de extrato semipurificado de *L. brasiliense* e do composto isolado miricetina-3-*O*-ramnosídeo frente à superprodução de óxido nítrico pela linhagem de células RAW 264.7 estimuladas por LPS

(lipopolissacarídeos), sendo que o composto isolado apresentou o melhor resultado (Rodriguez et al., 2011).

No teste de toxicidade excessiva, o extrato, na dose de 2 g/kg, por meio da administração intravenosa (veia caudal), apresentou sinais expressivos de toxicidade (Moura et al., 1985).

Testes toxicológicos *in vivo* executados por Antonelli-Ushirobira e colaboradores (2015a) mostraram que os ratos e camundongos machos são mais susceptíveis aos efeitos do extrato hidroacetônico de *L. brasiliense*, quando este é administrado em tratamento prolongado. Já os animais do sexo feminino toleraram a utilização prolongada do extrato. De acordo com os dados obtidos pelos autores pode-se concluir que o extrato de *L. brasiliense* apresenta baixa ou nenhuma toxicidade nas doses administradas aos animais (50, 100 e 200 mg/kg).

O extrato bruto produzido com acetona:água (70:30 v/v) de *L. brasiliense* foi administrado, via oral, em ratas imaturas, nas doses de 400, 800 e 1200 mg/kg, e verificou-se que houve uma tendência em diminuir a idade de abertura do canal vaginal comparado com o grupo controle; uma tendência na atividade uterotrópica negativa sobre o útero; pela análise citológica da secreção vaginal, houve um prolongamento do ciclo estral com predomínio da fase diestro (período progesterônico) das ratas; e, pela avaliação histológica notou-se presença de estruturas morfológicas características da ação progesterônica. Esses dados sugerem que o extrato seco de *L. brasiliense* tem ação sobre o sistema hormonal feminino do tipo antiestrogênico (Blainski, 2010).

Estudos foram elaborados para desenvolver parâmetros de controle de qualidade dos rizomas de *L. brasiliense*, a fim de contribuir para a qualidade farmacognóstica dos extratos por meio de método validado por CLAE, que se mostrou específico, simples, sensível, preciso e reprodutível (Blainski et al., 2013).

Um modelo Simplex Centroides foi realizado para produzir 15 diferentes tipos de extratos de *L. brasiliense* com misturas de água, metanol, etanol e acetona. Os extratos brutos e frações acetato de etila (FAE) foram testados para atividade antimicrobiana, demonstrando que VREfm (*Enterococcus faecium* resistente à Vancomicina) e MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina) são susceptíveis (MIC < 78 µg/mL) às FAEs de várias amostras. Além disso, foi confirmada a presença de ácido gálico, galocatequina e epigalocatequina através de análises de massas, podendo sugerir também a presença de monômeros e dímeros de galato de prodelfinidinas dos tipos A e

B, bem como um galato de metila nos extratos de rizomas de *L. brasiliense* (Blainski et al., 2017).

O extrato bruto de *L. brasiliense* produzido com acetona:água (7:3) foi testado *in vitro* para determinar o potencial antiadesivo frente à *Porphyromonas gingivalis* em células KB epiteliais humanas, demonstrando que em concentrações  $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$ , o extrato não possui citotoxicidade e não influencia na fisiologia celular. Na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , o extrato reduziu a capacidade de adesão de *P. gingivalis* em 80% nas células. Em concentrações de 20  $\mu\text{g/mL}$ , foi reduzida a ação proteolítica da arginina-gingipaína em 75%. Ademais, o perfil fitoquímico do extrato bruto indicou a presença de ácido gálico, epigallocatequina-3-*O*-galato e samarangeninas A e B como compostos majoritários (de Oliveira Caleare et al., 2017). Após microencapsulação da fração acetado de etila de *L. brasiliense*, foi demonstrado que as micropartículas contendo a fração semipurificada pode inibir a formação de biofilme e a adesão de *P. gingivalis*, atuando eficientemente contra os principais mecanismos de virulência da bactéria (Pilatti et al., 2022).

Sereia e colaboradores (2019) fizeram uma varredura de extratos brutos e frações acetato de etila de plantas, dentre elas *L. brasiliense*, avaliando inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade antioxidante e conteúdo de polifenóis totais, para selecionar frações com efeitos protetivos contra toxicidade de  $\text{A}\beta_{25-35}$  em células SH-SY5Y de neuroblastoma. A fração acetato de etila de *L. brasiliense* foi capaz de proteger as células contra a toxicidade induzida por  $\text{A}\beta_{25-35}$ , com  $\text{IC}_{50} = 0,47 \pm 0,01$ .

A fração aquosa de *L. brasiliense* foi avaliada quanto a capacidade inibitória da xantina oxidase, usando o sistema enzimático hipoxantina (HX)-XO *in vitro*, para avaliar ação contra hiperuricemia. De todos os compostos isolados, prodelfinidina B1-3,3'-digalato demonstrou possuir a maior atividade inibitória, com  $\text{IC}_{50}$  6,61  $\mu\text{M}$ , comparado ao halopurinol. Este estudo fornece bases para comprovar a ação da fração aquosa de *L. brasiliense* contra hiperuricemia, com  $\text{IC}_{50}$  48,3  $\mu\text{g/mL}$ . Este efeito é compatível com a presença de prodelfinidina B1-3,3'-digalato (Rodriguez et al., 2020).

#### 2.4 *Porphyromonas gingivalis*

*Porphyromonas. gingivalis* é considerado o segundo patógeno periodontal mais estudado, ficando atrás somente de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Fiorillo et al., 2019). É uma bactéria Gram negativa e sem capacidade de motilidade. Os sulcos gengivais (espaços de 0,5 mm entre o dente e a gengiva) funcionam como porta de

entrada e um nicho para um ecossistema bacteriano único, composto por micro-organismos adaptados a esta região, tal como *P. gingivalis*. Esta espécie pode crescer nos sulcos gengivais, língua, mucosa bucal e área tonsilar em humanos com ou sem periodontite (Cutler et al., 1995).

Evidências indicam que *P. gingivalis* é um micro-organismo oportunista que possui fatores de virulência que não estão presentes em cepas que colonizam indivíduos saudáveis. Além disso, possui mecanismos de aderência em tecidos orais, como a presença de fímbrias, hemaglutininas, cápsula, fatores de coagregação com outras bactérias orais e proteinases, como as gingipaínas (Cutler et al., 1995).

Gingipaínas são cisteína-proteases extracelulares de *P. gingivalis* e são consideradas o principal fator de virulência desta bactéria. Podem degradar uma grande variedade de proteínas do organismo hospedeiro, ajudam a bactéria a se esquivar do sistema imune, desregulam vias sinalizadoras e causam destruição tecidual. As gingipaínas conseguem inativar seus substratos pela clivagem destes em um ou mais lugares, ou por completa degradação (Hočevár et al., 2018).

Quando cultivadas em meio de cultura ágar sangue, as colônias de *P. gingivalis* são inicialmente brancas/creme e com o tempo (4-8 dias), tendem a se tornar pretas no centro e vermelhas escuras nas bordas, o que está correlacionado com a concentração de protoheme (Holt et al., 1999).

*Porphyromonas gingivalis* é a espécie mais associada a forma crônica da periodontite, e pode ser detectada nas bolsas periodontais. Uma de suas estratégias de sobrevivência no organismo hospedeiro é a invasão de células e tecidos, evitando o sistema imune do indivíduo. Ao invadir o tecido, consegue manter sua viabilidade e multiplicação. Essa propriedade se dá por meio de suas fímbrias (Bostanci e Belibasakis, 2012). Sua contribuição para a patogênese das formas agressivas de periodontite se dá pela indução de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-1 $\beta$  (Mysak et al., 2014).

As doenças periodontais também estão associadas à problemas sistêmicos nos seres humanos (figura 2, página 38), como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, doenças respiratórias, esteatose hepática e depressão (Fiorillo et al., 2019; Mei et al., 2020). Já foi notado que a periodontite é um fator de risco para o aparecimento e agravamento de doença de Alzheimer, afetando a permeabilidade da

barreira hematoencefálica e inibindo a resposta imune local, não permitindo a entrada de células imunes ao cérebro. Essa escassez de células imunes resulta na infecção do cérebro por *P. gingivalis*, provavelmente causando deficiência na depuração de amiloide insolúvel e induzindo imunossupressão (Babenya e Garaschuk, 2021).

No cérebro de pacientes afetados pela doença de Alzheimer também já foram identificadas, por meio de autópsia, as gingipaínas, com seus níveis correlacionados com a patologia de tau e ubiquitina, encontrando-as também no fluido cérebro-espinhal de indivíduos diagnosticados com a doença (Dominy et al., 2019; Ryder, 2020). Estudos *in vivo* demonstraram que uma infecção por *P. gingivalis* em camundongos resultou em colonização cerebral e aumento da produção de  $A\beta_{1-42}$ , um componente das placas amiloides. Uma inibição das gingipaínas reduziu o crescimento bacteriano e estabilizou a infecção cerebral por *P. gingivalis*, sugerindo que os inibidores de gingipaínas podem ser utilizados para tratamento de colonização cerebral por *P. gingivalis*, neurodegeneração e doença de Alzheimer (Dominy et al., 2019).

A manutenção de uma microbiota oral saudável e o manejo da doença periodontal com vigilância regular e boa higiene bucal ao longo da vida, provavelmente reduzirão a carga desnecessária da doença de Alzheimer em alguns indivíduos (Singhrao e Olsen, 2019).

De acordo com a revisão sistemática de Fiorillo e colaboradores (2019), existe uma importante correlação entre doença periodontal e doença cardiovascular. Em resumo, os médicos poderiam prevenir doenças cardiovasculares apenas prevenindo uma doença periodontal e seus produtos, devendo ser a terapia periodontal o primeiro passo na terapia cardiovascular.

Ainda existem relações entre doença periodontal e doenças imunológicas. Essa correlação se dá pelos anticorpos circulantes, liberados pela presença das bactérias, podendo ter ligação com casos de artrite reumatoide (Perricone et al., 2019). Outros eventos também podem ocorrer devido à presença destes anticorpos, como gravidez de risco e doença inflamatória intestinal. As doenças periodontais também afetam pacientes que apresentam outras condições inflamatórias, como resistência à insulina (Fiorillo et al., 2019).

*Porphyromonas gingivalis* possui vesículas de membrana externa, que são nanopartículas derivadas da membrana de bactérias Gram negativas. As gingipaínas são

entregues ao organismo hospedeiro por meio dessas vesículas e essa entrega é capaz de atingir órgãos distantes por meio da circulação sanguínea, provocando alterações no metabolismo da glicose no fígado do hospedeiro, com a inibição da síntese de glicogênio estimulada pela insulina nas células hepáticas e contribui para a progressão de Diabetes Mellitus (Seyama et al., 2020).

Estudos prévios focaram nos efeitos psicossociais causados por *P. gingivalis*, como vergonha, isolamento e solidão, por conta da perda dental, pobre higiene oral e halitose causadas pela infecção por esta bactéria. Foi reportado que indivíduos com periodontite possuem uma maior incidência de depressão subsequente (Mei et al., 2020).

Recentemente, *P. gingivalis* tem atraído atenção a uma possível relação com doença de Parkinson. Uma revisão realizada por Olsen et al. (2020) revelou que alguns desfechos como inflamação sistêmica, hipercoagulação, presença de fibrinogênio amiloide no plasma e mudanças ultraestruturais em plaquetas, provavelmente induzidos por *P. gingivalis*, podem afetar o desenvolvimento de doença de Parkinson.

*Porphyromonas gingivalis* está associada a vários desfechos adversos em gravidez, como pré-eclâmpsia, nascimento prematuro, aborto espontâneo, diabetes gestacional e restrição de crescimento fetal. Os fatores de virulência, como adesão e enzimas desta bactéria podem alterar a morfologia e microbiota de tecidos fetais e maternos, podendo ainda aumentar exageradamente a produção de citocinas, radicais livres e proteínas de fase aguda no compartimento uterino, aumentando o risco de contrações e nascimento prematuro. Evidências confirmam a presença de *P. gingivalis* no líquido amniótico e placenta (Chopra et al., 2020). Além disso, um estudo conduzido por Curi e colaboradores (2021), investigou e comparou a presença de *P. gingivalis* e *A. actinomicetemcomitans* em amostras biológicas de mulheres que tiveram parto a termo com diagnóstico de gengivite. Os resultados mostraram que todas as amostras de saliva das participantes apresentaram *P. gingivalis* e *A. actinomicetemcomitans*, 60% das mulheres com gengivite apresentaram *P. gingivalis* nas amostras de sangue do cordão umbilical e sangue periférico e 46,6% no colostro.

Recentemente, *P. gingivalis* tem sido associada ao carcinoma espinocelular oral, que é uma neoplasia maligna comum da cavidade oral, com prognóstico reservado e baixa taxa de sobrevida e, de acordo com a revisão sistemática de Mendoza e

colaboradores (2020), a bactéria pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento desta neoplasia.

Existem evidências crescentes de uma associação entre a periodontite e câncer gastrointestinal e pancreático, relacionando *P. gingivalis* aos cânceres orodigestivos. A bactéria regula positivamente receptores específicos em células, ativando a metaloproteinase-9 e interleucina-8 em cultura de células de carcinoma. Além disso, acelera o ciclo celular e suprime a apoptose. *P. gingivalis* promove metástase à distância e quimiorresistência a agentes anticancerígenos, acelerando a proliferação de células tumorais orais. Foram encontradas bactérias vivas em células pancreáticas cancerosas *in vitro* e o aumento da proliferação de células tumorais foi relacionado à infecção com *P. gingivalis in vivo*. Ademais, *P. gingivalis* pode estar associada à lesões pré-cancerosas gástricas e do cólon, carcinoma de células escamosas esofágicas, carcinoma de cabeça e pescoço e câncer de pâncreas, enfatizando que a bactéria possui efeitos tumorigênicos sistêmicos além dos efeitos locais na cavidade oral (Gnanasekaran et al., 2020; Olsen e Yilmaz, 2019).

Uma disbiose microbiana no trato digestivo superior está relacionada a um aumento no risco de câncer em células escamosas esofágicas e uma abundância de *P. gingivalis* é associada com a baixa taxa de sobrevivência de pacientes com este tipo de câncer. A invasão intracelular de *P. gingivalis* potencializa a proliferação, migração, invasão e metástase neste tipo de célula (Qi et al., 2020). Estudos recentes mostram que a ingestão oral de *P. gingivalis* leva a uma inflamação intestinal e alteração da microbiota, com redução significativa na diversidade bacteriana, induzindo indiretamente a produção de células T IL9+ CD4+ (Sohn et al., 2021).

Teorias ou hipóteses sobre a ligação entre COVID-19 e a doença periodontal têm aumentado durante a pandemia. Foi relatado que o SARS-CoV-2 possui resultados adversos devido ao estabelecimento de uma tempestade de citocinas, que é semelhante ao perfil de expressão de citocinas e às células envolvidas na periodontite. O fenômeno dos macrófagos irritados pode ser explicado pela polarização dos macrófagos M1-M2. Pacientes com periodontite têm uma relação M1/M2 maior do que pacientes saudáveis, tendo macrófagos M1 mais ativos produzindo citocinas pró-inflamatórias. A hipótese criada por Utomo e colaboradores (2021) é que a doença periodontal pode dificultar o mecanismo de defesa contra COVID-19.



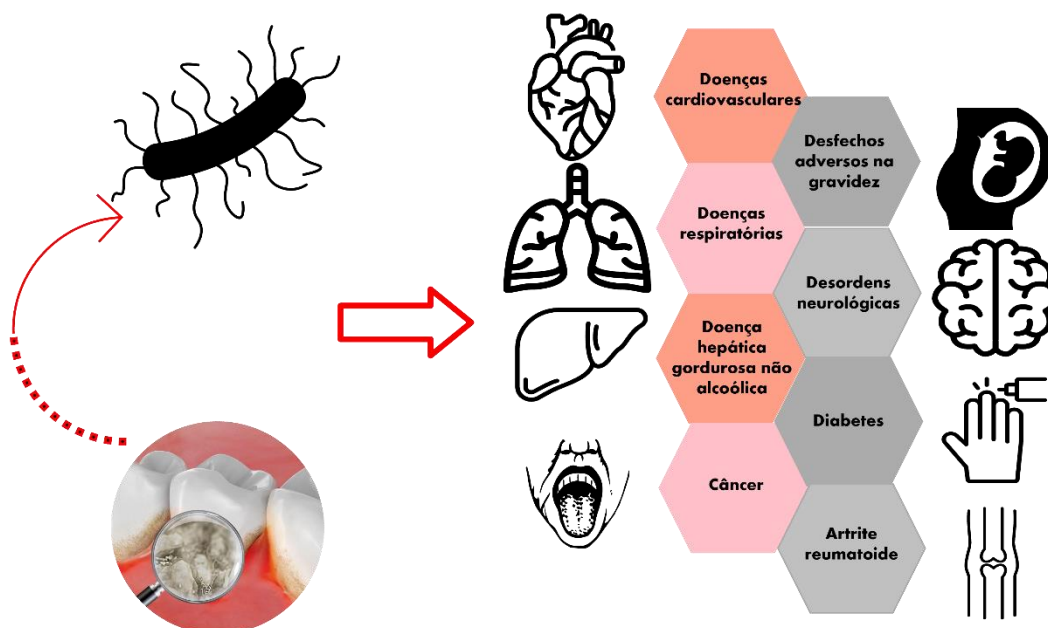


Figura 2 - Estratégias pelas quais *P. gingivalis* podem invadir o corpo todo, representado por um esquema simples associando a bactéria a doenças sistêmicas. Fonte: adaptado de Mei et al., (2020).

Plantas medicinais são tradicionalmente usadas para higiene oral e têm papel antibacteriano contra patógenos orais. Em uma revisão realizada por Carrol e colaboradores (2020), um total de 416 espécies pertencentes a 110 famílias e 305 gêneros estão documentadas com essa finalidade.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Droga vegetal

Os rizomas de *Limonium brasiliense* foram coletados em Rio Grande, Ilha dos Marinheiros (31°59'33"S, 52°10'43"W, altitude= 9 m), Rio Grande do Sul, Brasil, em maio de 2010. Exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob número HUEM 21151 sob responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. O material vegetal foi coletado com permissão do IBAMA-SISBIO e registrado sob número 11995-3 em dois de novembro de 2010, código de autenticação 46367613, sob responsabilidade de J. C. P. Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registrado pelo número 010252/2015-0. A droga vegetal foi seca em estufa de circulação de ar em temperatura de  $37,0 \pm 2$  °C, em seguida moída em moinho de martelos (Tigre ASN-6).

#### 3.2 Preparo de extrato bruto e fração acetato de etila

##### 3.2.1 Extrato bruto dos rizomas de *Limonium brasiliense*

A droga vegetal foi submetida a processo de extração por Ultra-Turrax (UTC115KT, Ika Works), utilizando acetona:água (7:3; v/v) como líquido extrator, numa proporção de 1:10 (m/v). A extração foi realizada durante 30 min, com intervalos de cinco min para que a temperatura de extração fosse mantida abaixo de 40,0 °C, não degradando as substâncias presentes na droga vegetal (Blainski et al., 2013).

O extrato foi filtrado em funil de Büchner, concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação de todo solvente orgânico. Após, o extrato foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto (EB).

##### 3.2.2 Partição líquido-líquido a partir do EB

Foi realizada a partição líquido-líquido utilizando acetato de etila como líquido extrator. Foram dissolvidos 40 g do EB em 400 mL de água destilada e adicionados 400 mL de acetato de etila em funil de separação. A fase acetato de etila (FAE) foi separada e reservada. Após, retornou-se a fase aquosa (FAQ) ao funil de separação e o processo foi repetido (adicionando acetato de etila por mais nove vezes), a fim de extrair o máximo possível de compostos fenólicos que possuem afinidade com o solvente orgânico (Mello et al., 1996). As fases acetato de etila foram reunidas e concentradas

em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até que todo o solvente orgânico fosse eliminado. A fase orgânica foi congelada com nitrogênio líquido e liofilizada. Esse mesmo processo foi realizado com a fração aquosa.

### 3.2.1 Isolamento cromatográfico

A FAE foi fracionada empregando-se uma coluna de vidro (altura: 750 mm e diâmetro: 55 mm) contendo Sephadex LH20 como fase estacionária. O fracionamento, análise das subfrações por CLAE e análise estrutural das substâncias isoladas por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear foram realizados de acordo com Isolani (2017). A partir do isolamento, foi obtida a subfração F7, uma fração semipurificada da FAE, que contém as três substâncias majoritárias de *L. brasiliense*: epigalocatequina-3-*O*-galato, samarangenina A e samarangenina B e foram obtidas cada uma dessas substâncias isoladamente.

### 3.3 *Porphyromonas gingivalis*

A bactéria *P. gingivalis* (ATCC 33277) foi cultivada em ágar (para 1 L: 16 g de ágar, 15 g de peptona triptcase, 5 g de peptona neutralizada de soja, 5 g de cloreto de sódio, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de L-cisteína) suplementado com sangue de carneiro desfibrinado a 5% e enriquecido com 10 mg de vitamina K e 5 mg de hemina, sob condições de anaerobiose (Anaerocult, Merck, Darmstadt, Germany) à 37,0 °C conforme Löhr et al. (2011b).

Para os experimentos, foi utilizada uma cultura líquida cultivada *overnight*, na fase de crescimento exponencial da bactéria. A cultura líquida foi preparada a partir do crescimento de *P. gingivalis* em ágar. A bactéria foi ressuspensa no meio de cultura líquido a uma OD<sub>660</sub> 0,1<sup>†</sup>. Para obter a bactéria em sua fase exponencial do crescimento da cultura, a cultura líquida foi incubada sob condições de anaerobiose por 24 h.

### 3.4 Cultura de células bucais humanas (KB)

As células epiteliais da mucosa bucal humana KB (ATCC CCL-17, HeLa), derivadas de um carcinoma epidermoide oral, foram cultivadas em *Earl's minimum essential medium* (EMEM) (Lonza, Basel, Switzerland), suplementado com 8% de soro fetal bovino (SFB) (v/v) (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) e 50 µg/mL de gentamicina (MP Biomedicals, Irvine, USA), sendo incubadas à 37,0 °C em uma

---

<sup>†</sup> OD<sub>660</sub> 0,05 corresponde a 0,32 x 10<sup>8</sup> UFC/mL.

atmosfera de 5,0% de CO<sub>2</sub> (Löhr et al., 2011a). As passagens foram realizadas duas vezes na semana, até 80-100% de confluência, até 15 passagens no máximo.

As células foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. S. Eick (University of Jena, Germany).

### 3.5 Ensaio de toxicidade

#### 3.5.1 Toxicidade contra *Porphyromonas gingivalis*

Para verificar que determinado extrato, fração ou substância isolada tenha efeito somente pela interação com as adesinas e não influenciando o metabolismo da bactéria, testes de difusão em ágar foram feitos para eliminar uma possível atividade antibacteriana. Para isso, uma cultura de 3 dias foi coletada e ressuspensa em PBS estéril. A densidade óptica foi ajustada para OD<sub>660</sub> 0,2 e 100 µL da suspensão bacteriana foi plaqueada no ágar sangue com a ajuda de uma espátula drigalski e um petriturn-MPLUS. Discos de papel foram carregados com 20 µL das amostras testes (extratos, frações e substâncias isoladas), colocados circularmente na placa inoculada em distâncias iguais e testados nas concentrações de 1000, 100, 10 e 1 µg/mL para EB, FAQ, FAE e F7 e 100, 10 e 1 µg/mL para samarangenina A, samarangenina B e epigalocatequina-3-*O*-galato. Discos de amoxicilina a 12,5 µg/mL foram utilizados como controle positivo e PBS estéril como controle negativo. As placas foram incubadas em condições ditas acima por cinco dias. Após este período, os halos de inibição foram mensurados (Löhr et al., 2011a).

#### 3.5.2 Toxicidade contra células bucais humanas (KB)

As células foram depositadas em placas de 96 poços em uma concentração de 5 x 10<sup>4</sup> células / poço e incubadas por 24 h a 37,0 °C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência. Após alcançarem este valor, o meio foi descartado e as células lavadas duas vezes com PBS (100 µL por poço). As soluções testes contendo o extrato e frações foram dissolvidas em meio de cultura EMEM e diluídas a 100, 50 e 10 µg/mL, adicionadas (100 µL por poço) e incubadas por 24 h (Löhr et al., 2011a).

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do ensaio de redução do MTT descrito por Mosmann (1983). Brevemente depois do tempo de tratamento, o meio sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS (200 µL por poço). 50 µL de uma solução de 5 mg/mL de MTT em PBS foi adicionada a cada

poço. Após 4 h de incubação a 37,0 °C e 5,0% CO<sub>2</sub>, a solução de MTT foi descartada e 50 µL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais insolúveis de formazan. Após 5 min a absorvância foi mensurada em leitor de microplacas a 492 nm contra um comprimento de onda de referência de 690 nm.

A viabilidade relativa foi relacionada ao controle não tratado (UC = 100%) e os experimentos são expressos em média ± desvio padrão (%) para três experimentos independentes \*\*\* p < 0,001.

### 3.6 Ensaios de inibição da adesão

#### 3.6.1 Marcação da bactéria

Uma cultura líquida cultivada *overnight* de *P. gingivalis* foi lavada uma vez com PBS por centrifugação a 3600 x g por 5 min e ressuspensa em tampão bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 0,5 M (pH 8). As suspensões foram padronizadas em uma OD<sub>660</sub> 4,0, marcadas com uma solução de isotiocianato de fluoresceína (FITC) 50 µg/mL em DMSO e incubadas por 30 min à 37,0 °C, sob o abrigo da luz e intensidade de agitação de 100% no Thermal Shaker. Para remover o FITC remanescente, as bactérias foram centrifugadas à 3600 x g por 5 min, lavadas três vezes com 2,0 mL de PBS e ressuspensas em meio EMEM, ajustando a OD<sub>660</sub> para 0,3 (Löhr et al. (2011a).

#### 3.6.2 Investigação da influência das amostras na marcação da bactéria (*Quenching test*)

Para excluir efeitos das amostras no teste de fluorescência, foi testado o comportamento da bactéria marcada frente às amostras. Para isso, a bactéria foi marcada com a fluorescência conforme descrito na sessão 3.6.1. A bactéria marcada foi incubada com as amostras testes durante 90 min. As amostras foram testadas nas concentrações de 100, 10 e 1 µg/mL para FAQ, FAE e F7 e 10, 1 e 0,5 µg/mL para samarangenina A, samarangenina B e epigallocatequina-3-*O*-galato. Após, a intensidade de fluorescência da suspensão bacteriana foi determinada por um leitor de fluorescência em um comprimento de onda de excitação de λ 485 nm e emissão λ 538 nm.

A inibição da fluorescência foi relacionada ao controle não tratado (UC = 100%) e os experimentos são expressos em média ± desvio padrão (%) para três experimentos independentes.

### 3.6.4 Atividade antiadesão por ensaio fluorimétrico de placa

As bactérias marcadas com FITC (sessão 3.6.1), foram adicionadas às células KB (semeadas em placa de 96 poços e incubadas por 24 h a 37,0 °C e 5,0% de CO<sub>2</sub>). Duas horas antes de adicionar as bactérias marcadas, as células foram lavadas duas vezes com PBS, para remover qualquer antibiótico existente no meio. EMEM sem suplementação foi adicionado e a placa foi incubada. As soluções testes contendo uma proporção bactéria:célula de 100:1, foram adicionadas às células nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL para FAQ, FAE, e F7 e 50, 40, 30 e 20 µM para samarangenina A, samarangenina B e epigallocatequina-3-*O*-galato. A placa foi incubada por 90 min. A monocamada foi lavada duas vezes com PBS e 100 µL de PBS foram adicionados. A leitura foi realizada a  $\lambda_{exc}$  485 nm e  $\lambda_{em}$  538 nm em um leitor de fluorescência em placa Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A adesão relativa foi relacionada ao controle não tratado (UC = 100%) e os experimentos são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (%) para três experimentos independentes \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.7 Ensaio de inibição da atividade das gingipaínas

Para determinar a influência das frações de *L. brasiliense* nas principais adesinas de *P. gingivalis*, as atividades específicas para arginina e lisina foram monitoradas durante a incubação com as amostras testes. Para diferenciação dos efeitos da atividade de gingipaína sobre arginina ou lisina, foram usados substratos específicos com uma porção colorimetria (nitroanilida) para determinação da protease após incubação com a FAQ, FAE e F7, chamados Bz-Arg-pNA (*N* $\alpha$ -benzoyl-L-lysine-4-nitroanilide) para Arg-gingipaína e Ac-Lys-pNA (*N* $\alpha$ -acetyl-L-lysine-4-nitroanilide) para Lis-gingipaína. O tripeptídeo leupeptina (5 µM), que é um inibidor específico de Arg-gingipaína, foi usado como controle positivo e a bactéria não tratada como controle negativo.

Bactérias a partir de uma cultura de três dias em ágar sangue foram ressuspendidas em tampão (200 mM Tris Cl, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02%, cisteína HCl 20 mM) e ajustadas para uma OD<sub>660</sub> 0,5. 50 µL desta suspensão, para a medida da atividade de Lys-gingipaína, e 10 µL para determinação da atividade de Arg-gingipaína, foi misturado com as amostras de FAE, FAE e F7 de *L. brasiliense* em concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. Leupeptina (10 µM) foi usada como controle positivo. A mistura teste foi incubada por 10 min a 37,0 °C. 10 µL de *N*- $\alpha$ -acetil-L-lisina-4-nitroanilida HCl (4 µg/µL em DMSO) ou *N*- $\alpha$ -benzoil-L-

arginina-4-nitroanilida HCl (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em DMSO) respectivamente foram adicionados e uma medição contínua da absorção a  $\lambda$  405 nm durante um período de 15 min foi realizada (Tecan-Reader Sunrise). Os poços sem substrato corresponderam ao valor do branco. A atividade da protease foi relacionada com o controle não tratado e TLCK (*N* $\alpha$ -*p*-tosil—L-lisina clorometil cetona) foi utilizado como inibidor da protease.

A inibição foi relacionada ao controle não tratado e os experimentos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (%) para três experimentos independentes \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.8 Determinação da atividade antibiofilme

Uma cultura líquida de *P. gingivalis* de 24 h foi usada para investigar a influência do extrato e frações de *L. brasiliense* na formação de biofilme de acordo com o protocolo descrito por Labrecque e colaboradores (2006). Em sua fase de crescimento exponencial, a bactéria foi lavada com PBS e ressuspensa em meio de cultura líquido pré-aquecido. 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão bacteriana em uma  $\text{OD}_{660}$  0,2 foram transferidos para placa de 96 poços. As amostras (100  $\mu\text{L}$ ), diluídas em PBS, foram adicionados no dobro da concentração desejada, para que fosse obtido a concentração requerida em 200  $\mu\text{L}$  por poço (1000, 500, 250, 125 e 32,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Depois de uma incubação anaeróbica por 24 h a 37,0  $^{\circ}\text{C}$ , o biofilme foi lavado três vezes com 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapurificada estéril. Após, o biofilme estabilizado foi corado com 100  $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 0,4% durante 15 min. O biofilme foi lavado quatro vezes com água ultrapurificada para remoção do corante remanescente. Depois de 2 h secando, o biofilme corado foi dissolvido em etanol 95% e a placa foi gentilmente agitada por 10 min. Para quantificação, a absorvância em 550 nm foi determinada em um leitor de microplacas.

A atividade antibiofilme foi relacionada ao controle não tratado (UC = 100%) e os experimentos são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (%) para três experimentos independentes \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.9 Docking reverso

Os taninos identificados no extrato de *L. brasiliense* foram utilizados na montagem da biblioteca de compostos deste trabalho. Foram listados três compostos, Epigallocatequina-3-*O*-galato, Samarangenina A e Samarangenina B, cujas estruturas foram obtidas na base de dados Pubchem (Kim et al., 2016) ou Zinc15 (Sterling and

Irwin, 2015). Em seguida, as estruturas foram analisadas pelo servidor SEA predictions (Keiser et al., 2007) para identificação dos prováveis alvos metabólicos em *P. gingivalis*. A identificação de outros alvos conhecidos destes taninos também foi realizada por meio da Binding database (Gilson et al., 2016).

### 3.10 Análise estatística

Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de três experimentos independentes. Os números de repetições de ensaios individuais eram diferentes e são exibidos nos respectivos protocolos. O Student test foi realizado considerando valores de  $p \leq 0,05$  como estatisticamente significativos. GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) foi usado para computação estatística e gráficos.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Escolha das amostras para realização da investigação de atividade antiadesiva

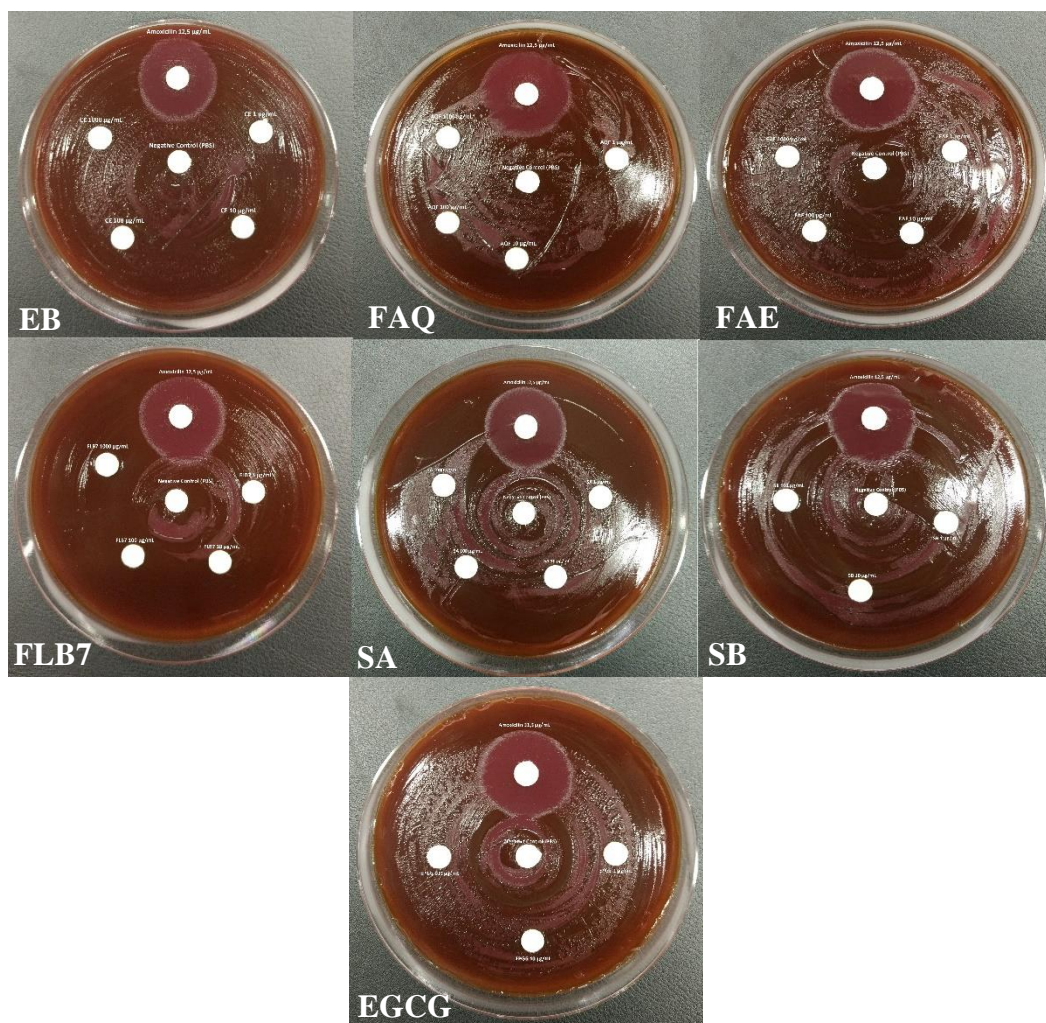
Com base nos resultados de uma triagem realizada com o extrato bruto de *L. brasiliense* e sua atividade antiadesiva contra *P. gingivalis*, que foi realizada no trabalho de de Oliveira Caleare (2017), houve evidências de que o extrato acetona-água de *L. brasiliense* possui atividade antiadesiva contra tal patógeno periodontal, reduzindo a adesão em aproximadamente 80% em concentrações menores ou iguais a 100 µg/mL. Para a seleção do material vegetal, foram considerados os conhecimentos atuais e o *status* da pesquisa, utilizando as frações e substâncias isoladas de *L. brasiliense* que, até o momento, são insuficientemente estudadas.

### 4.2 Ensaio de toxicidade

#### 4.2.1 Toxicidade contra *Porphyromonas gingivalis*

O princípio da técnica de difusão em ágar consiste na difusão do composto teste no meio de cultura sólido e a subsequente interação com o crescimento da bactéria (Bondi Jr et al., 1947; Bonev et al., 2008). Influências no crescimento da bactéria podem ser observadas pela medição da zona de inibição, dentro da cultura bacteriana. No caso de atividade antibacteriana direta, o diâmetro da zona de inibição se correlaciona com a concentração do composto de teste antibiótico ou com a atividade amostra teste.

Para avaliar se o extrato, frações e substâncias isoladas possuem toxicidade contra a bactéria, foi realizado o teste de ágar difusão. O intuito foi diferenciar os efeitos citotóxicos da atividade antiadesiva. Os resultados estão demonstrados na figura 3 a seguir.



**Figura 3** - Teste de ágar difusão do EB, FAQ, FAE e FLB7 a 1000, 100, 10 e 1 µg/mL, e samarangenina A, samarangenina B e epigalocatequina-3-*O*-galato a 100, 10 e 1 µg/mL., CP amoxicilina 12,5 µg/mL. CN PBS estéril.

Nos resultados encontrados, a incubação com amoxicilina induz a formação de uma zona de inibição com diâmetro de 2,5 cm. Já extrato, frações e substâncias isoladas de *L. brasiliense*, bem como o PBS (controle negativo) não influenciaram o crescimento de *P. gingivalis* nesse sistema de teste nas concentrações testadas, demonstrando que a atividade contra o patógeno não se deve a esse efeito, portanto, extrato, frações e substâncias isoladas de *L. brasiliense* não são capazes de inibir o crescimento de *P. gingivalis*.

Os resultados estão de acordo com os encontrados por Schmuck (2015), que testou o extrato bruto de *Rumex acetosa* L., o qual é muito parecido na composição

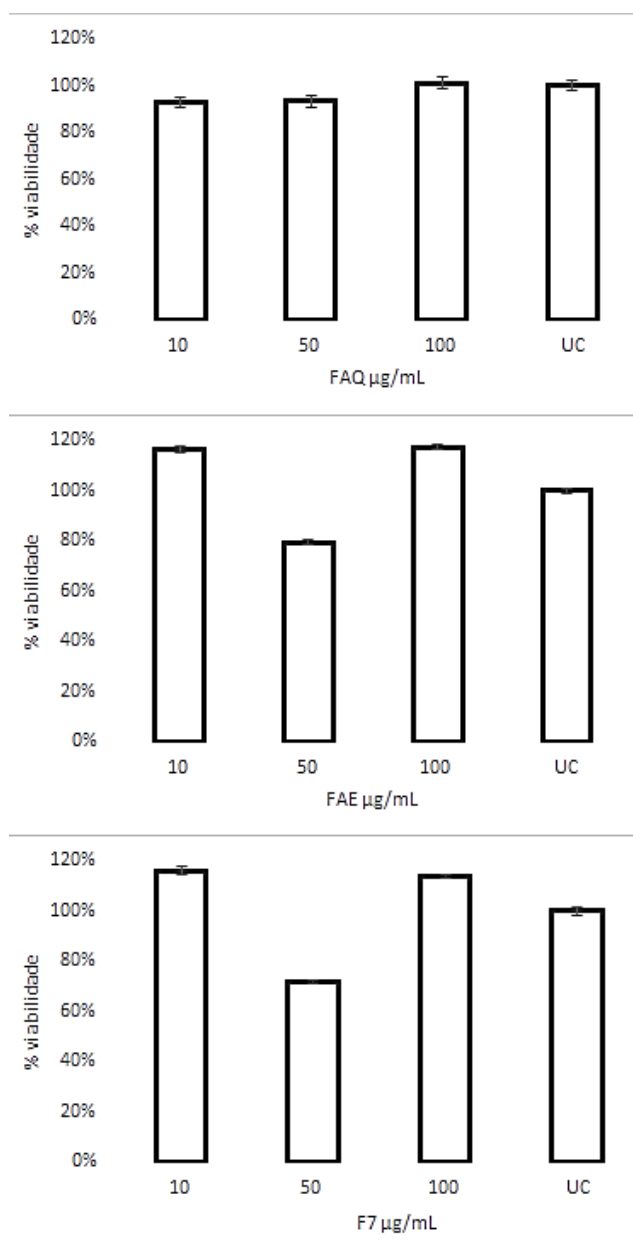
molecular com o extrato de *L. brasiliense*, e não apresentou nenhuma inibição no crescimento de *P. gingivalis*.

Este teste é importante para que nos próximos experimentos seja possível diferenciar a atividade de *L. brasiliense* contra *P. gingivalis*, sabendo que o extrato, frações e substâncias não exercem efeitos citotóxicos à bactéria e sim antiadesivos. Ao observar a incapacidade das amostras testadas em inibir o crescimento do patógeno, ficaram dispensados os testes de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

#### 4.2.2 Toxicidade contra células epiteliais da mucosa oral humana (KB)

Para determinação do efeito dos compostos nas células, é necessário medir a atividade celular como um indicador de dano ou citotoxicidade. Um dos testes mais utilizados para este fim é o 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio bromida (MTT), um composto amarelo solúvel em água que é captado pelas células viáveis e reduzido à formazan, um cristal azul insolúvel em água. Este cristal deve ser dissolvido em algum solvente, preferivelmente DMSO, para leitura colorimétrica. A produção de formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Morgan, 1998).

No que diz respeito a um potencial uso profilático em um produto bucal, o teste de citotoxicidade *in vitro* do extrato e frações contra células KB foi realizado visando excluir potenciais efeitos de inibição do crescimento das células frente às amostras testadas e os experimentos devem definir um intervalo de concentração das amostras para futuras investigações *in vitro* sobre a atividade funcional. O teste de MTT foi utilizado para determinar a influência na viabilidade celular. A figura 4 demonstra a influência das frações semipurificadas de *L. brasiliense* nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL na viabilidade celular de células KB depois de um período de incubação de 24 h.



**Figura 4** - Viabilidade relativa (teste de MTT) de células KB após 24 h de tratamento com diferentes concentrações das frações de *Limonium brasiliense*: FAQ, FAE e F7. A viabilidade relativa está relacionada ao controle não tratado (UC = 100%). Os experimentos são expressos como média  $\pm$  DP (%) de três experimentos independentes com n=3 replicatas. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Após incubação por 24 h com a FAE e F7, podemos observar um ligeiro aumento da viabilidade celular nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, a taxa de viabilidade diminuiu significativamente na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  para o EB em comparação ao controle não tratado, com redução de  $25 \pm 1\%$ .

Para FAQ, não houve influência na viabilidade nas concentrações testadas em um intervalo de 24 h (figura 4). Tanto para FAE quanto para F7, houve redução

significativa também na concentração de 50 µg/mL, de  $21 \pm 1\%$  e  $28 \pm 1\%$ , respectivamente (figura 4). Deve-se ressaltar que o tempo de incubação de 24 h é considerado tempo prolongado e resulta em redução significativa da desidrogenase mitocondrial, enzima responsável pela redução do MTT.

De acordo com as investigações de Oliveira Caleare (2017), o potencial citotóxico de clorexidina foi bastante alto frente às células KB, com redução da viabilidade celular de quase 100% em concentração de 20 µg/mL e aproximadamente 80% a 10 µg/mL. Este medicamento é utilizado como padrão-ouro no tratamento clínico de doença periodontal e seu potencial citotóxico em células de mamíferos *in vitro* e tecidos periodontais já é bastante conhecido, tendo sido relatado que afeta negativamente a proliferação celular (Hidalgo and Dominguez, 2001). Ao comparar a concentração inibitória mínima (CIM) de clorexidina contra *P. gingivalis* com a toxicidade contra células KB encontrada por de Oliveira Caleare (2017), foi encontrado um índice de seletividade de 0,7, mostrando que o medicamento é muito mais tóxico a células eucarióticas do que procarióticas.

Hidalgo e Dominguez (2001) demonstraram que clorexidina é tóxico frente a fibroblastos dérmicos em concentrações *in vitro* de 5 a 2.400 vezes em relação àquelas usadas na prática clínica (0,12% como enxaguatório oral), eliminando totalmente a proliferação celular. Pesquisas ainda afirmam que clorexidina influenciou na cicatrização de feridas ósseas de rato, perturbando e atrasando o progresso normal de cicatrização em soluções com concentração de 0,5%, determinando que este medicamento, em concentrações semelhantes às usadas na prática clínica, tem efeitos adversos significativos no crescimento de fibroblastos dérmicos (Bassetti and Kallenberger, 1980).

A clorexidina é um enxaguatório bucal que possui substantividade, ou seja, capacidade de permanecer no local de ação ativo, sendo liberada lentamente e evitando que seu efeito seja rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar, sendo indicado o uso duas vezes ao dia em concentração de 0,12% (Hortense et al., 2010). Ao comparar os resultados de extratos e frações de drogas vegetais com a clorexidina, devemos levar em consideração a riqueza de compostos moleculares presentes nesses produtos, que podem atuar em sinergismo para a atividade biológica.

Dessa forma, com os resultados encontrados neste trabalho, é possível concluir que o extrato e frações de *L. brasiliense* não exercem efeitos tóxicos contra células KB nas concentrações de 10 e 100 µg/mL em 24 h de incubação. O que nos leva a pensar, também, que ao utilizar extrato ou fração de *L. brasiliense* para tratamento ou prevenção de periodontite, o contato destes com a mucosa oral humana seria inferior às 24 h utilizadas para incubação do teste de MTT, podendo supor, então, que em intervalos mais curtos de incubação a toxicidade seria ainda menor, o que está de acordo com os resultados encontrados por Oliveira Caleare (2017), que testou a citotoxicidade do extrato bruto de *L. brasiliense* em tempo de incubação de 2 h e não houve redução da viabilidade celular em concentrações inferiores a 100 µg/mL.

Os resultados encontrados neste trabalho estão concordantes com os encontrados por Antonelli-Ushirobira e colaboradores (2015a), nos quais o extrato bruto de *L. brasiliense* apresentou baixa ou nenhuma toxicidade contra camundongos Swiss machos e fêmeas em um teste de toxicidade aguda e nenhuma toxicidade contra ratos Wistar em testes de toxicidade crônica. Os autores comprovam ainda a ausência de potencial mutagênico e atividade hepatotóxica do extrato.

As conclusões deste trabalho e da literatura científica definem o extrato bruto e frações de *L. brasiliense* como seguros e adequados para as futuras investigações sobre o potencial das amostras para o tratamento e/ou prevenção de periodontite.

Devemos levar em consideração que a literatura diz que o ensaio de MTT não é completamente fiel e capaz de estimar a viabilidade celular na presença de compostos que influenciam o nível intracelular de radicais livres (Jaszczyszyn and Gąsiorowski, 2008), que é o caso dos compostos fenólicos presentes em *L. brasiliense*.

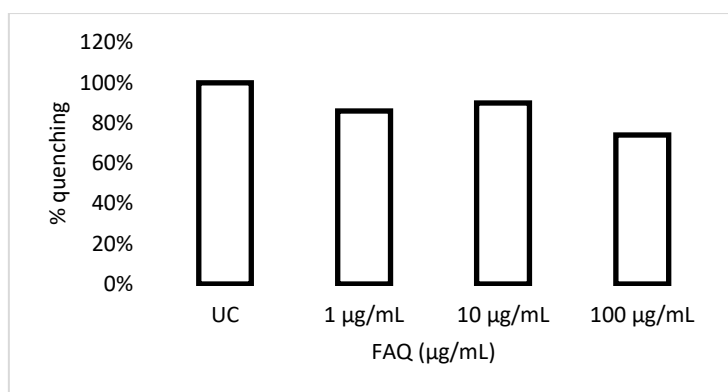
#### 4.3 Ensaio de inibição da adesão

##### 4.3.1 Investigação da influência das amostras na marcação da bactéria (*Quenching test*)

Para excluir resultados falsos positivos em ensaios *in vitro*, foi investigada a extinção da fluorescência das frações e substâncias isoladas para FITC. A extinção inclui os processos nos quais o rendimento quântico de fluorescência é reduzido sem alterações no espectro de emissão de fluorescência. Como a reação de polifenóis com proteínas leva a uma alteração da estrutura tridimensional da proteína, não é surpreendente que os polifenóis sejam capazes de extinguir potentemente a

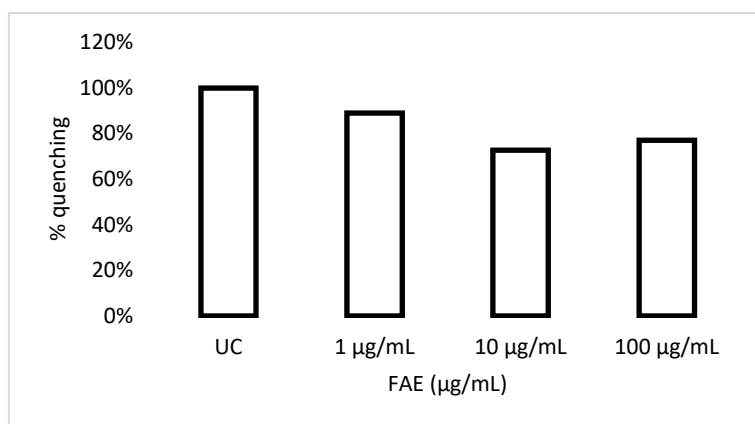
fluorescência intrínseca da proteína por extinção estática (Soares et al., 2007). Devido a isto, é necessário verificar a atividade de extinção de fluorescência das amostras para *P. gingivalis* marcada com FITC. A extinção de fluorescência foi relacionada ao controle não tratado (UC = 100%) e os experimentos são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (%) para três experimentos independentes.

A medição de intensidade de fluorescência da bactéria marcada com FITC frente a diferentes concentrações da FAQ de *L. brasiliense* é apresentada na figura 5 e revelou que uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  é capaz de diminuir a intensidade em  $26 \pm 0,01\%$ . Nas concentrações de 10  $\mu\text{g/mL}$  e 1  $\mu\text{g/mL}$  a redução é de  $10 \pm 0,05\%$  e  $14 \pm 0,02\%$ , respectivamente, redução que ainda é tolerável, mas deve ser incluída na avaliação dos resultados.



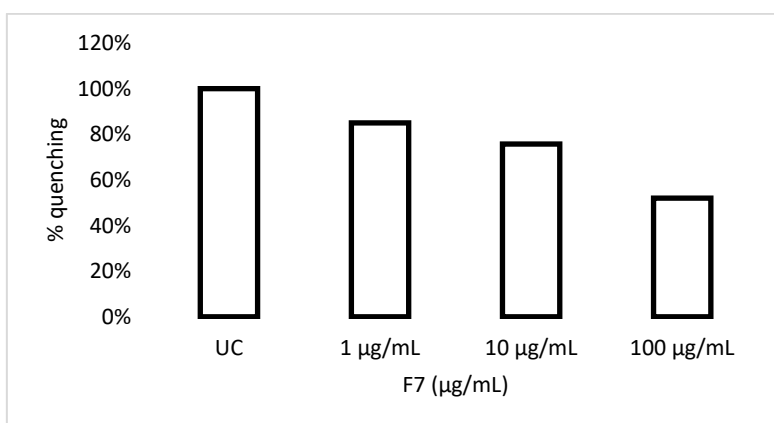
**Figura 5** - Intensidade de fluorescência relativa de *Porphyromonas gingivalis* marcada com FITC incubada com FAQ em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média  $\pm$  DP (%) de n=3 experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Para a incubação com a FAE (figura 6), houve redução da intensidade de fluorescência nas concentrações de 100, 10 e 1  $\mu\text{g/mL}$ , reduzindo em  $23 \pm 0,01\%$ ,  $27 \pm 0,1\%$  e  $11 \pm 0,04\%$ , devendo ser considerada na análise dos próximos resultados.



**Figura 6** - Intensidade de fluorescência relativa de *Porphyromonas gingivalis* marcada com FITC incubada com FAE em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média  $\pm$  DP (%) de n=3 experimentos independentes. \*\*\* p < 0,0001.

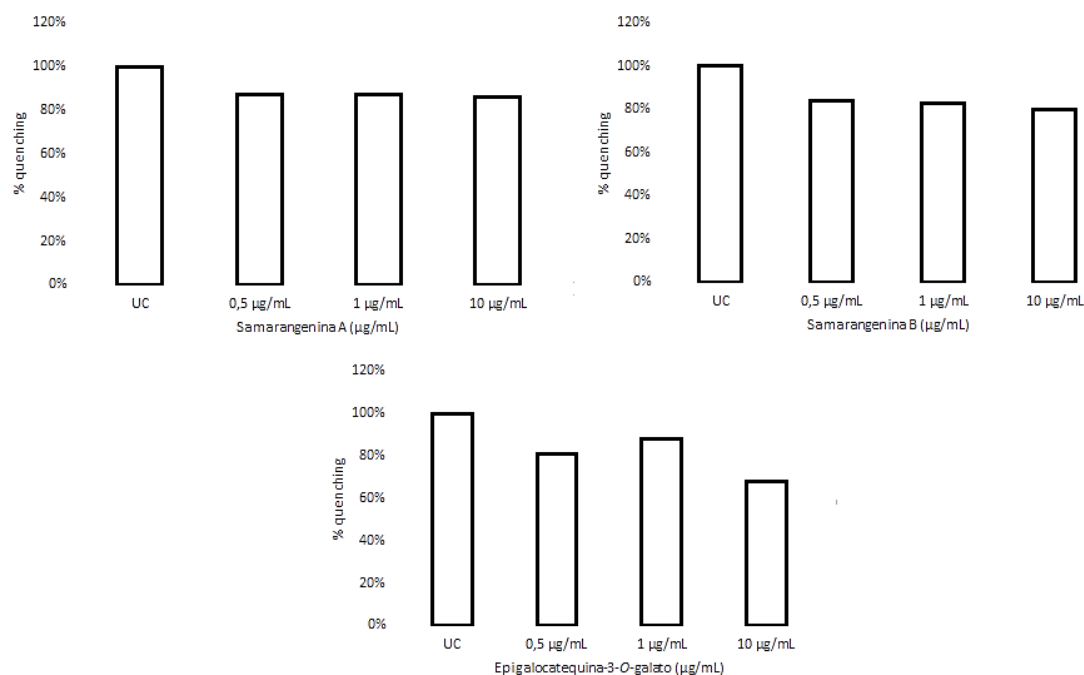
Já na incubação com a F7 (figura 7), a redução de fluorescência na incubação em concentrações de 100 µg/mL foi de  $52 \pm 0,06\%$ . Nas concentrações de 10 e 1 µg/mL, a redução foi de  $24 \pm 0,02\%$  e  $15 \pm 0,04\%$ , podendo ser considerada tolerável, mas levada em consideração nas próximas análises.



**Figura 7** - Intensidade de fluorescência relativa de *Porphyromonas gingivalis* marcada com FITC incubada com F7 em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média  $\pm$  DP (%) de n=3 experimentos independentes. \*\*\* p < 0,0001.

Nas incubações com diferentes concentrações das substâncias isoladas samarangenina A, samarangenina B e epigallocatequina-3-*O*-galato (figura 8), com exceção da concentração de 10 µg/mL da epigallocatequina-3-*O*-galato que reduziu a fluorescência em  $32 \pm 0,05\%$ , todas as concentrações mantiveram redução por volta de 20%. Resultados considerados toleráveis, porém, devem ser levados em consideração nas próximas análises.



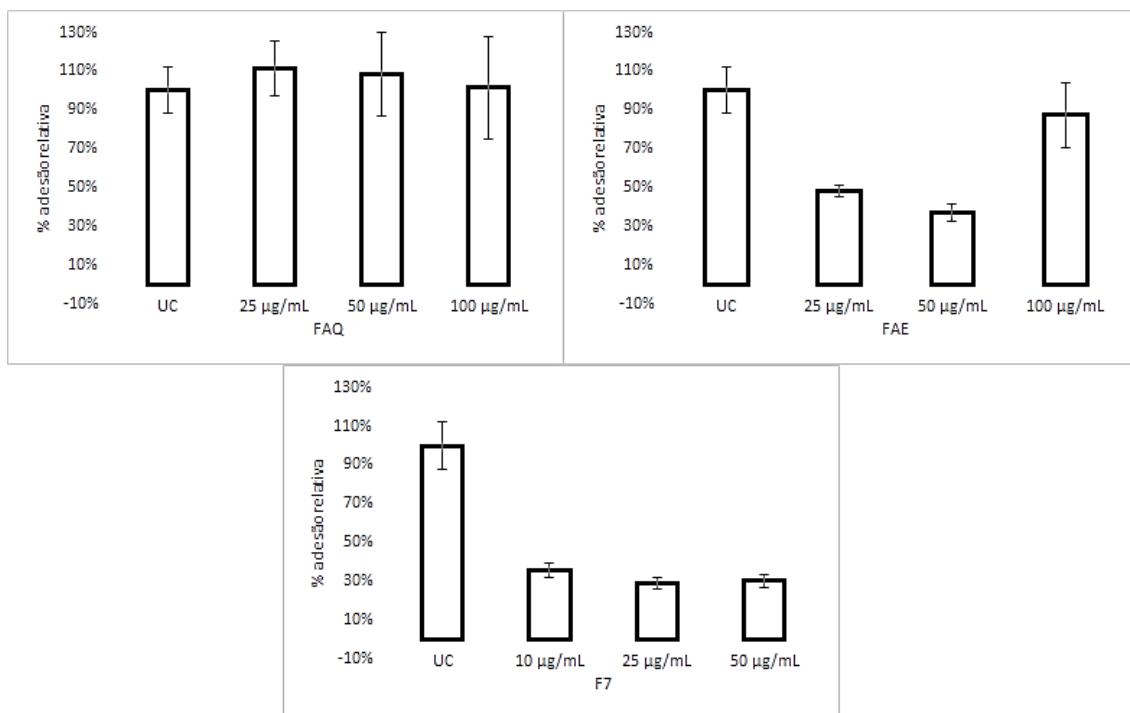


**Figura 8** - Intensidade de fluorescência relativa de *Porphyromonas gingivalis* marcada com FITC incubada com epigallocatequina-3-*O*-galato (EGCG), samarangenina A (SA) e samarangenina B (SB) em diferentes concentrações. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média  $\pm$  DP (%) de n=3 experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.3.2 Atividade antiadesão por ensaio fluorimétrico de placa

De acordo com os resultados encontrados por de Oliveira Caleare e colaboradores (2017), o extrato bruto acetona:água de *L. brasiliense* demonstrou forte atividade antiadesiva pela mesma metodologia, com redução da adesão em  $79 \pm 11\%$  a  $100 \mu\text{g/mL}$ , o que justificou as buscas pela atividade das frações e compostos isolados, a fim de relacionar a estrutura molecular à atividade relatada.

O ensaio fluorimétrico de placa foi utilizado para quantificar o efeito antiadesivo das frações e substâncias isoladas de *L. brasiliense* em células KB. De acordo com os dados apresentados na figura 9, nos quais houve coincubação da FAQ em diferentes concentrações com as células KB e bactérias marcadas com FITC, não houve redução da adesão relativa das bactérias às células, o que demonstra que os componentes ativos de *L. brasiliense* contra *P. gingivalis* não estão presentes nesta fração.



**Figura 9** - Influência da FAQ, FAE e F7 na adesão relativa de *Porphyrromonas gingivalis* marcada com FITC às células KB em experimento de coincubação (90 min) em placas de 96 poços. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média  $\pm$  DP (%) de n = 3 experimentos independentes. \*\*\* p < 0,0001.

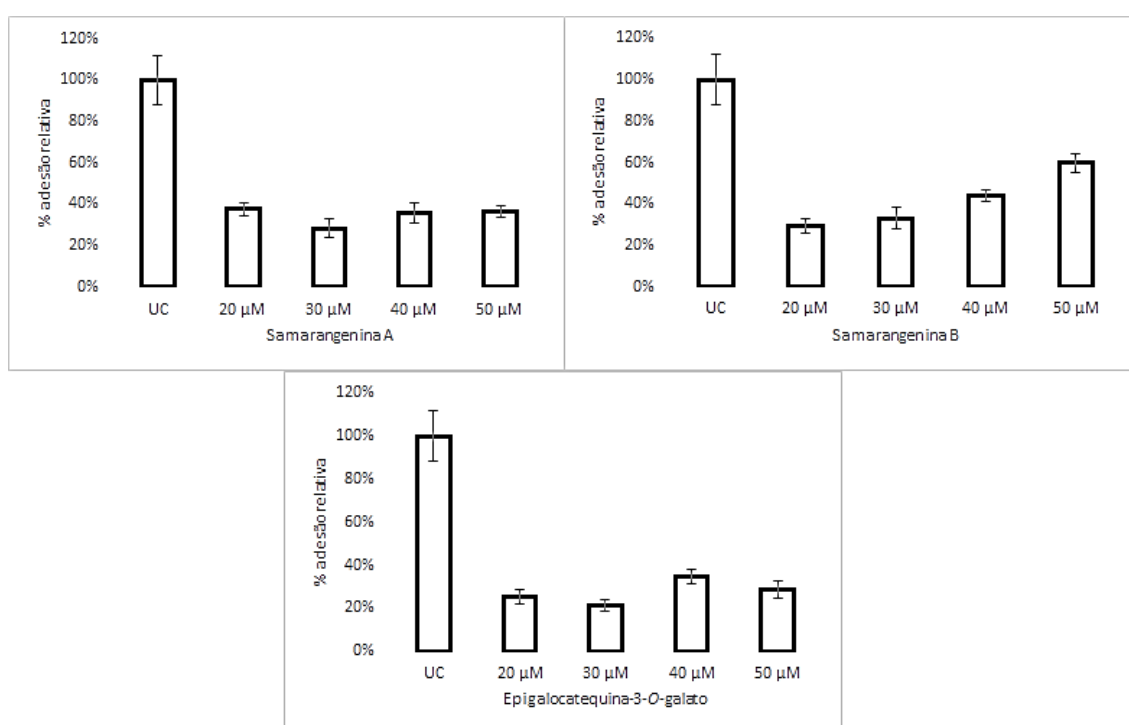
A FAE na concentração de 50 µg/mL foi capaz de reduzir em  $63 \pm 4\%$  a adesão relativa das bactérias às células KB. Na concentração de 100 µg/mL não houve redução significativa, o que pode ser devido à falta de atividade nessa concentração, ou aos compostos polifenólicos absorvidos pelo material da placa e efeitos típicos de extinção da fluorescência, ou até mesmo à precipitação e insolubilidade dos compostos em altas concentrações (figura 9).

A F7 (figura 9) demonstrou redução significativa na adesão das bactérias em todas as concentrações testadas. Esta fração é uma subfração da FAE, contendo os três compostos majoritários juntos (samarangenina A, samarangenina B e epigallocatequina-3-O-galato). A concentração que apresentou o maior potencial antiadesivo foi a de 25 µg/mL, capaz de reduzir em  $71 \pm 3\%$  a adesão das bactérias às células KB.

Os testes com as frações nos direcionam aos resultados esperados, de que os compostos galoilados são os responsáveis por tal atividade antiadesiva frente à *P. gingivalis*. Com isto, os testes com as substâncias majoritárias isoladas também foram realizados.

Todas as substâncias isoladas (figura 10) demonstraram significativa redução na adesão das bactérias às células em todas as concentrações testadas. Os resultados com

os compostos isolados se mostram não dependentes de concentração, com a samarangenina A apresentando redução da adesão da bactéria às células em  $72 \pm 5\%$  na concentração de  $30 \mu\text{M}$ . Já a samarangenina B apresentou resultado semelhante na concentração de  $20 \mu\text{M}$ , reduzindo a adesão em  $71 \pm 4\%$ , porém, ao aumentar a concentração do ativo, a atividade foi reduzida, podendo ser devido à insolubilidade do composto em alta concentração, que varia de acordo com o coeficiente de partição de cada um. A epigalocatequina-3-*O*-galato foi o composto que apresentou a maior atividade antiadesiva, sendo capaz de inibir a adesão em  $79 \pm 3\%$  em concentração de  $30 \mu\text{M}$  e  $75 \pm 3\%$  em  $20 \mu\text{M}$ . Todos os resultados encontrados foram significativos, com valores de  $p < 0,0001$ .



**Figura 10** - Influência da samarangenina A, samarangenina B e epigalocatequina-3-*O*-galato na adesão relativa de *Porphyromonas gingivalis* marcada com FITC às células KB em experimento de coincubação (90 min) em placas de 96 poços. Resultados relacionados ao controle não tratado (UC = 100%) e expressos em média  $\pm$  DP (%) de  $n = 3$  experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Schmuck e colaboradores (2015) fizeram estudos com compostos galoilados e não galoilados na inibição da adesão de *P. gingivalis* às células KB pelo método de citometria de fluxo, comprovando que os compostos que não continham a presença do ácido gálico eram inativos frente à bactéria e os galoilados apresentaram atividade, afirmando então que a presença do ácido gálico funciona como pré-requisito para a atividade antiadesiva, o que vai de encontro com os resultados obtidos neste trabalho,

nos quais os compostos fenólicos galoilados apresentaram forte atividade inibidora da adesão das bactérias, e a FAQ não foi ativa neste teste.

Adicionalmente, sabe-se também que a tri-hidroxiilação de flavan-3-ols influencia positivamente na atividade destes compostos, estando presente nos compostos que foram testados neste trabalho (Schmuck et al., 2015), que por sua vez estão presentes em altas concentrações na FAE de *L. brasiliense*.

Foram realizados testes com o extrato aquoso de *Rhododendron ferrugineum* L., o qual possui 8,7% de taninos, na redução da adesão de *P. gingivalis* às células KB pelo método de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram redução da adesão após pré-tratamento das bactérias com o extrato aquoso de uma forma dose-dependente, entre 0,5 e 10 mg/mL (Löhr et al., 2015).

A adesão de *P. gingivalis* a outras bactérias é importante para a formação do biofilme oral, por isso, a atividade antiadesiva de frações de *cranberry* foi avaliada em ensaios de coagregação entre pares de bactérias, incluindo *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Os resultados demonstraram que a fração rica em polifenóis foi efetiva na inibição da agregação bacteriana, com MIC 940 µg/mL. Os autores sugerem que os polifenóis presentes na fração são os maiores contribuintes para a atividade antibacteriana, comprovando ainda que os principais constituintes polifenólicos são proantocianidinas e flavonoides, especialmente quercetina, miricetina, cianidina-3-galactosídeos, procianidina A2 e epicatequina (Neto et al., 2017).

Compostos fenólicos e extratos de vinho tinto foram analisados quanto sua capacidade antiadesiva frente a *P. gingivalis* e demonstraram alto potencial inibitório em concentrações de 10 µg/mL para os compostos e 50 µg/mL para os extratos. Os autores encontraram significativa degradação do ácido gálico e proantocianidina B1 após incubação com as bactérias, sugerindo que o patógeno é capaz de catabolizar os taninos oligoméricos (Esteban-Fernández et al., 2018).

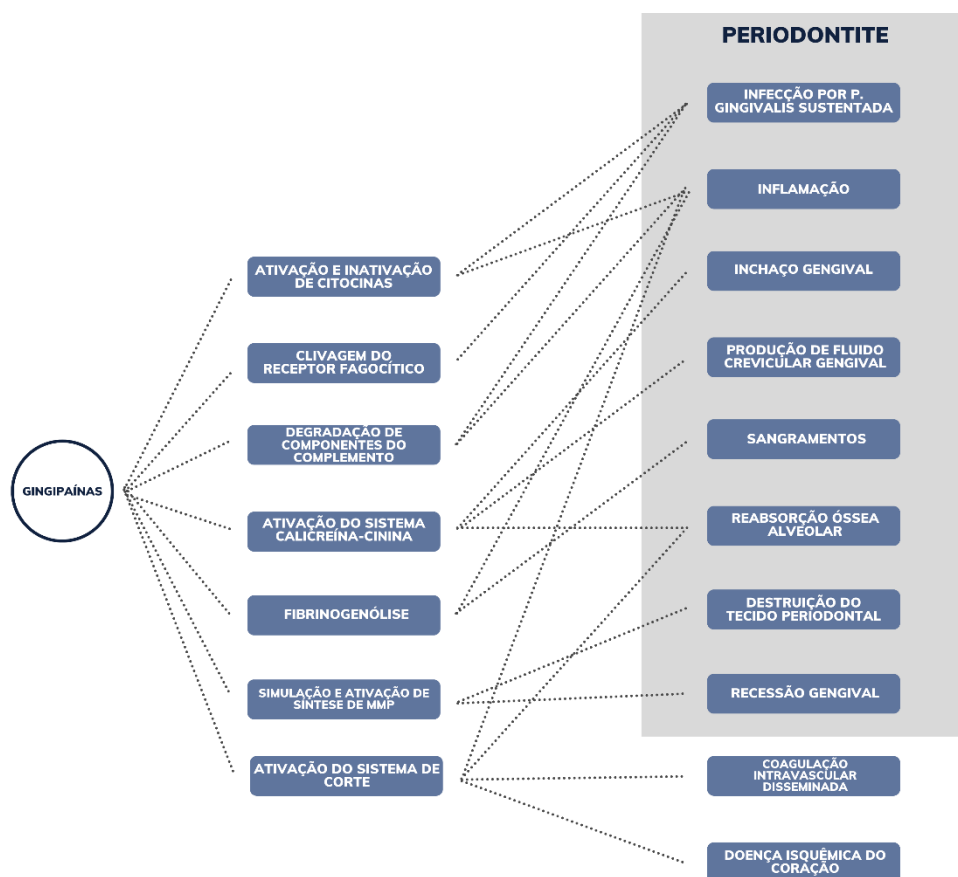
Ações benéficas do resveratrol contra doenças periodontais foram associadas à sua habilidade em neutralizar os fatores patogênicos de *P. gingivalis* (Minagawa et al., 2015; Park et al., 2009). Da mesma maneira, o chá verde, o qual possui alta concentração de epigallocatequina-3-*O*-galato, foi capaz de inibir a adesão de *P. gingivalis* às células bucais em concentrações de 250-500 µg/mL (Sakanaka et al.,

1996) e o resveratrol (1 – 10  $\mu$ M) bloqueia a expressão de proteínas adesivas da bactéria (Park et al., 2009).

Um dos mecanismos sugeridos para o potencial antiadesivo dos polifenóis é que eles são capazes de gerar um impedimento estérico para a fixação bacteriana aos receptores celulares (Kline et al., 2009). Além disso, há um número limitado de receptores de superfície nas células eucariotas para as adesinas bacterianas e, por conta disso, existe um efeito inibitório máximo dos polifenóis que é alcançado em concentrações específicas, por isso um aumento na concentração fenólica não necessariamente se traduzirá em melhor efetividade (Esteban-Fernández et al., 2018). Isso explica o porquê da atividade antiadesiva das frações e substâncias isoladas de *L. brasiliense* não serem concentração-dependente.

#### 4.4 Ensaio de inibição da atividade das gingipaínas

As proteinases estão presentes nas bactérias para auxiliar na obtenção de nutrientes, sendo consideradas um fator de virulência importante, pois garante vantagens à sobrevivência bacteriana e ainda são consideradas patogênicas ao organismo hospedeiro, visto que causam ativação ou inativação específica de proteínas bioativas, desequilibrando o sistema hospedeiro, incluindo seus mecanismos de defesa (figura 11) (Imamura, 2003). As gingipaínas são estritamente específicas para clivagem de proteínas nos peptídeos de arginina ou lisina. Essa especificidade se dá pela estrutura química dos bolsos S1 da enzima, o qual é otimizado para acomodar preferencialmente as cadeias laterais de arginina (Potempa et al., 2003).



**Figura 11** - As múltiplas atividades patogênicas das gingipaínas e suas associações com periodontite e outras doenças. **Fonte:** adaptado de Imamura (2003).

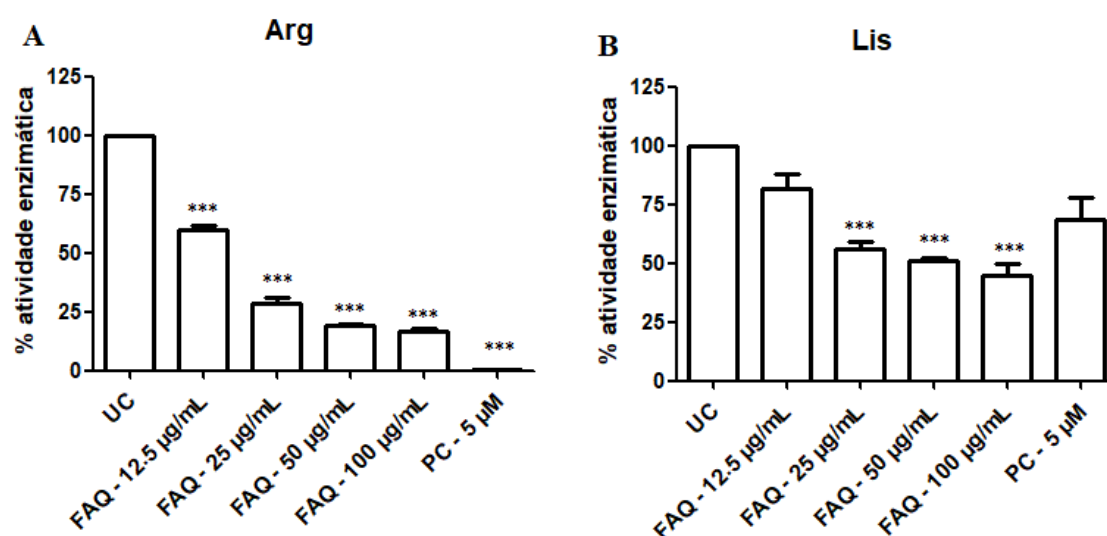
As análises de Chen e colaboradores (2001) indicaram que as atividades catalíticas das gingipaínas modulam a adesão de *P. gingivalis* às células epiteliais, apresentando domínios envolvidos na aderência das bactérias às células.

O organismo, em si, não produz inibidores endógenos para o controle da atividade das gingipaínas, por isso, o desenvolvimento de inibidores dessas enzimas será útil no controle do que parece ser um dos fatores de virulência primários utilizados por *P. gingivalis* durante o desenvolvimento e continuação da doença periodontal (Potempa et al., 2003). A contribuição potencial das gingipaínas para a fisiopatologia da periodontite sugere que essa enzima deve ser alvo das terapias para tratamento de doenças periodontais, justificando a busca pela atividade de inibição enzimática pelas amostras testadas neste trabalho.

De acordo com os dados encontrados por de Oliveira Caleare e colaboradores (2017), o extrato bruto de *L. brasiliense* é capaz de inibir a atividade de Arg-gingipaína de forma concentração-dependente, apresentando resultados significantes com 10 e 20

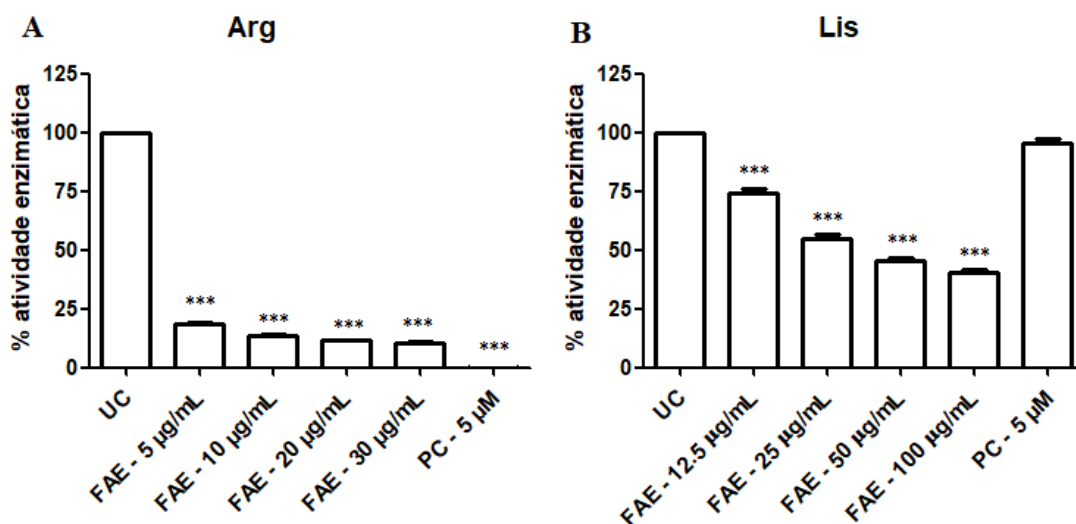
$\mu\text{g/mL}$  de extrato, reduzindo a atividade da enzima em aproximadamente 60 e 75%, respectivamente.

Ao testar a atividade das frações e subfração do extrato, FAQ, FAE e F7 (figuras 12, 13 e 14), foi observado que a maior inibição enzimática aconteceu nos testes com Arg-gingipaína, e que quanto mais purificada for a fração, maior será a atividade inibitória. A FAQ (figura 12) inibiu de maneira concentração-dependente Arg-gingipaína, apresentando inibição de aproximadamente 80% da atividade enzimática em  $100 \mu\text{g/mL}$ , com valores de  $p < 0,001$ .



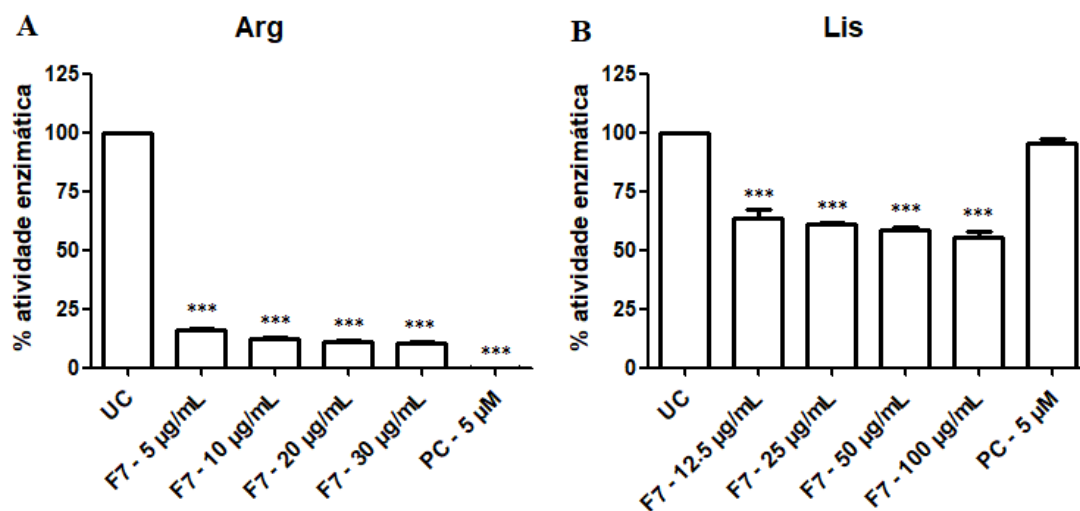
**Figura 12** - Influência da FAQ (12,5, 25, 50 e  $100 \mu\text{g/mL}$ ) na atividade das proteases Arg-gingipaína (A) e Lis-gingipaína (B) em relação a *Porphyromonas gingivalis* não tratada. Leupetina a  $5 \mu\text{M}$  serviu como controle positivo (PC), bactérias não tratadas como controle negativo (UC). Os dados são a média  $\pm$  DP (%) de 3 experimentos independentes com  $n = 3$  replicatas técnicas. \*\*\*  $< 0,0001$ .

Já a FAE de *L. brasiliense* (figura 13) foi capaz de inibir na mesma intensidade da FAQ, porém em concentração muito inferior, de  $5 \mu\text{g/mL}$  e com significância nos resultados. Isso se explica pela alta concentração de compostos fenólicos presentes nesta fração. A atividade é superior ao encontrado por de Oliveira Caleare e colaboradores (2017), pois é uma fração semipurificada do extrato bruto.



**Figura 13** - Influência da FAE 5, 10, 20 e 30 µg/mL nas proteases Arg-gingipaína (A) e 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL Lis-gingipaína (B) em relação a *Porphyromonas gingivalis* não tratada. Leupetina a 5µM serviu como controle positivo (PC), bactérias não tratadas como controle negativo (UC). Os dados são a média ± DP (%) de 3 experimentos independentes com n = 3 replicatas técnicas. \*\*\* < 0,0001.

Os resultados de F7 (figura 14), a qual é uma subfração da FAE, são muito semelhantes aos encontrados para a FAE, pois reúne somente três substâncias fenólicas, ajudando a explicar melhor a atividade encontrada na FAE e comprovando que, as substâncias responsáveis pela efetividade na inibição de gingipaínas, são os polifenóis obtidos desta planta.



**Figura 14** - Influência da F7 5, 10, 20 e 30 µg/mL nas proteases Arg-gingipaína (A) e 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL Lis-gingipaína (B) em relação a *Porphyromonas gingivalis* não tratada. Leupetina a 5µM serviu como controle positivo (PC), bactérias não tratadas como controle negativo (UC). Os dados são a média ± DP (%) de 3 experimentos independentes com n = 3 replicatas técnicas. \*\*\* < 0,0001.

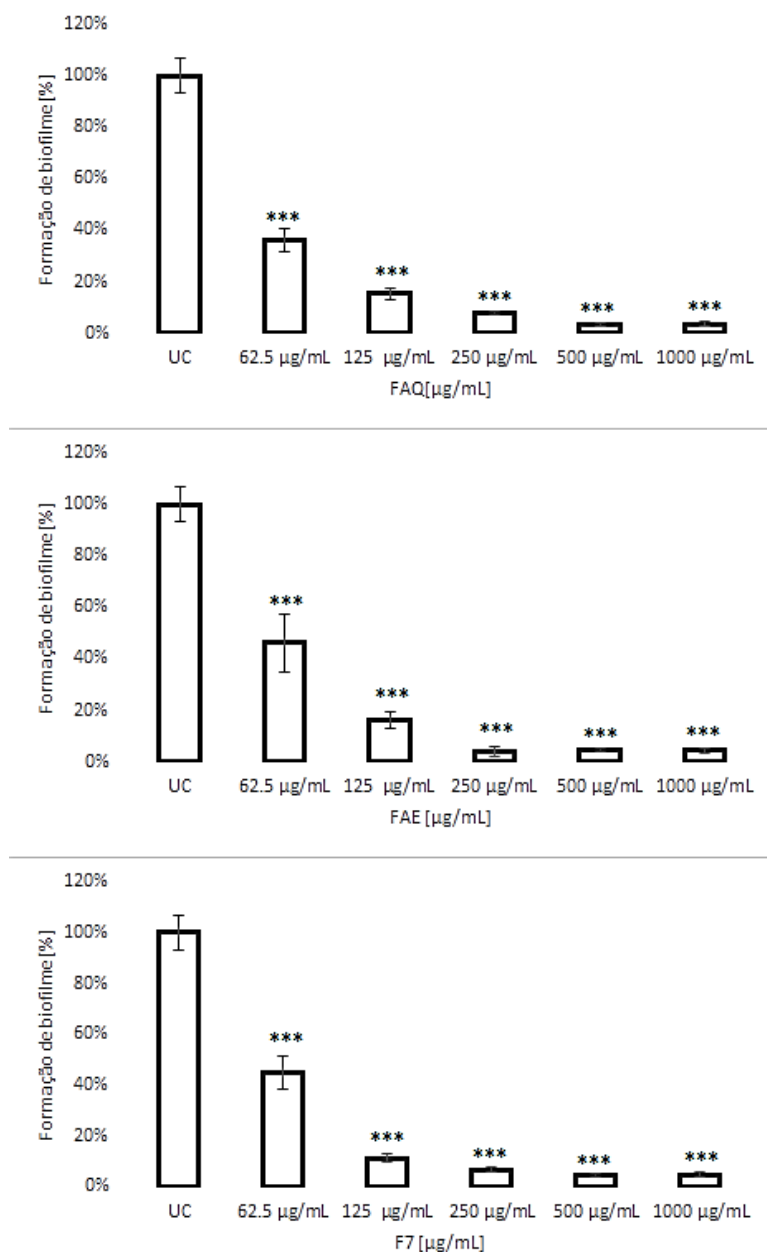


#### 4.5 Determinação da atividade antibiofilme

A formação de biofilme é um alvo importante para um agente terapêutico ou profilático. Em um modelo simples de biofilme de monocultura, que foi estabelecido em placa de 96 poços, a influência do extrato e frações de *L. brasiliense* foi testada pelo método de cristal violeta. É necessário ressaltar que este modelo de determinação de biofilme usa condições estáticas, as quais não são comparáveis com os biofilmes maduros tipicamente associados aos sistemas celulares. Entretanto, esse método é importante para estudar os estágios iniciais de formação de biofilme e permite uma rápida avaliação do potencial de formação do biofilme.

A figura 15 demonstra a formação de biofilme por *P. gingivalis* em um período de 24 h, sob condições anaeróbicas, frente a ação do extrato bruto e frações de *L. brasiliense* em diferentes concentrações.

Nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  de todas as amostras houve redução significativa na formação de biofilme, enquanto a concentração de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  apesar de reduzir significativamente em todas as amostras testadas, foi a que apresentou a menor redução. Os resultados demonstram que a formação de biofilme foi consideravelmente inibida de uma forma concentração dependente e em concentrações iguais ou maiores que 250  $\mu\text{g/mL}$  a redução foi tanta que pode ser considerada uma prevenção completa da formação de biofilme. Entretanto, deve ser considerado que nessas concentrações pode haver citotoxicidade frente às células KB, visto que não foram concentrações testadas previamente.



**Figura 15** - Influência relativa das frações FAQ, FAE e F7 na formação de biofilme em relação ao controle não tratado (UC = 100%). Resultados expressos como média  $\pm$  DP (%) de  $n = 3$  experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Os resultados das investigações sobre a influência das frações na formação de biofilme de *P. gingivalis*, revelaram um forte potencial inibidor das amostras nos estágios iniciais de formação de biofilme em concentrações de 125 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, deve-se sempre lembrar que essas condições de incubação estática não correspondem ao desenvolvimento de um biofilme totalmente maduro.

Entretanto, para concentrações  $\geq 125 \mu\text{g/mL}$  em todas as amostras testadas, foi demonstrada uma inibição considerável na formação de biofilme. Além da inibição da

adesão, o estabelecimento do biofilme constitui um segundo alvo decisivo para um potencial uso profilático.

#### 4.6 Docking reverso

Foram identificados três compostos no extrato de *L. brasiliense*, epigalocatequina-3-*O*-galato (CID 65064), samarangenina A (CID 85131379) e samarangenina B (Zinc 230098288), os quais foram utilizados para análises *in silico*. Em seguida, as moléculas foram avaliadas pelo servidor SEA, o qual compara à similaridade da molécula avaliada (*query*) com bancos de dados de ligantes que sabidamente se ligam a determinadas proteínas. Se houver similaridade entre a molécula *query* com o ligante de uma dada enzima, é muito provável que a molécula *query* também se ligue a esta enzima. Quanto maior a similaridade, maior o *score* (*MaxTC*). Se o *MaxTC* for igual a 1.00 significa que a molécula *query* já foi descrita como um ligante para aquela enzima. O *p-value* indica a probabilidade do resultado obtido ser um falso positivo, portanto, quanto menor, melhor. A tabela 1 resume os resultados, mostrando os alvos que estão presentes em *P. gingivalis* em comparação com os humanos.

**Tabela 1** - Status na base de dados Uniprot das enzimas identificadas pelo servidor SEA predictios que estão presentes em *Porphyromonas gingivalis*, em comparação com humanos

Target name (gene)	<i>P. gingivalis</i>	<i>H. sapiens</i>
<b>fabG</b>	Putativo	-
<b>fabZ</b>	Confirmado	-
<b>pgd</b>	-	Confirmado

A tabela 1 mostra que as enzimas 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (*fabG*), EC:1.1.1.100 e beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase (*fabZ*), EC:4.2.1.59 estão presentes em *P. gingivalis* e não existem em humanos, tornando-as alvos mais prováveis dos compostos avaliados. Estas duas enzimas fazem parte de um sistema de biossíntese de ácidos graxos comum a plantas e bactérias, chamado de FAS II. Os mamíferos, por sua vez, produzem ácidos graxos por um sistema distinto, chamado de FAS (Asturias et al., 2005). Quando uma substância atua em um alvo específico, é dito que ela atua como *drug like*, tornando-se, neste caso, um agente antibacteriano eficaz (Wright e Reynolds, 2007). Isso justifica o extrato ter tido atividade antiadesiva sem afetar a viabilidade de células de mamíferos.

Esta hipótese é reforçada pelo fato de que as enzimas fabG e fabZ já foram descritas como inibidas pela epigalocatequina-3-*O*-galato (Sharma et al., 2007; Tasdemir et al., 2006). Contudo, a busca por potenciais alvos metabólicos utilizou apenas as informações disponíveis no banco de dados SEA, então, não significa que os componentes do extrato possam se ligar apenas nas proteínas listadas. Outras proteínas que poderiam ser alvo dos taninos avaliados neste trabalho podem não estar notadas no banco de dados SEA.

Neste sentido, a base de dados Binding apresenta estudos que mostram que a epigalocatequina-3-*O*-galato pode se ligar nas seguintes enzimas humanas: Hepatocyte growth factor receptor (Larsen et al., 2009),  $\beta$ -secretase (Cheng et al., 2012), Plasminogen activator inhibitor-1 (Cale et al., 2010), P-glycoprotein 1 (Wong et al., 2015), Dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A (Gourdain et al., 2013), DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1) (Erdmann et al., 2015), Beta amyloid A4 protein (Zhao et al., 2015), alpha-(1,3)-fucosyltransferase VII (Niu et al., 2004), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) (Shin et al., 2008), Telomerase reverse transcriptase (Cohn et al., 2012), Mitogen-activated protein kinases 10 e 14 (Schmidt et al., 2010), 72 kDa type IV collagenase (Niu et al., 2004), Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2 (Sinha e Sen, 2011), Matrix metalloproteinases 7 (MMP7) (Niu et al., 2004) e MMP14 (Aihara et al., 2009), Leukocyte elastase (Xu et al., 2010), Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (Moore and Potter, 2013), ADAM17 (Niu et al., 2004), alpha-(2,3)-(N)-sialyltransferase (Niu et al., 2004), Histone acetyltransferases p300, KAT5 e PCAF (Simon et al., 2016), CREB-binding protein (Simon et al., 2016), HSP90 and hnRNPA2/B1 (Bhat et al., 2014), Bile salt export pump (BSEP) (Wang et al., 2003), alpha-Amylase (Al-Asri et al., 2015), Transcription Factor STAT1 (Masullo et al., 2014) e Transthyretin (Gimeno et al., 2017).

Apesar de todas estas enzimas humanas terem sido descritas experimentalmente como alvos da epigalocatequina-3-*O*-galato, não há relatos sobre efeitos tóxicos desta substância natural em humanos. Também não há relatos na literatura de que a samarangenina A ou B, possam se ligar a proteínas em específico. Sendo assim, os resultados destas análises sugerem que o efeito antibacteriano observado contra cepas de *P. gingivalis* possa ser devido a inibição das enzimas do sistema FAS II, que interfere na biossíntese de ácidos graxos essenciais a esse micro-organismo.

A análise por *docking reverso* dos componentes do extrato de *L. brasiliense* sugeriu que as enzimas 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (fabG), EC:1.1.1.100 e Beta-hydroxyacyl-ACP desidratase (fabZ), EC:4.2.1.59 presentes em *P. gingivalis*, podem se ligar à epigalocatequina-3-*O*-galato (CID 65064). Esta ligação pode afetar o funcionamento destas enzimas, o que promove um efeito deletério nestas bactérias, sem afetar as células de mamíferos.

## 5 CONCLUSÕES

As frações semipurificadas de *L. brasiliense*, juntamente com sua subfração enriquecida com as três substâncias majoritárias samarangenina A, samarangenina B e epigallocatequina-3-*O*-galato, bem como as substâncias isoladamente podem ter um grande impacto no desenvolvimento de produtos para cuidado oral contra periodontite, pois possuem inibição específica contra gingipaínas, o principal fator de virulência da bactéria *P. gingivalis*, patógeno associado ao desenvolvimento de formas crônicas da doença periodontal. Além disso, são capazes de reduzir significativamente a adesão dessa bactéria às células da mucosa oral humana, não apresentando efeitos tóxicos e ainda inibindo a formação de biofilme bacteriano.

É a primeira vez que são apresentados resultados das substâncias de *L. brasiliense* na inibição de gingipaínas e formação de biofilme bacteriano de *P. gingivalis*. São necessários mais estudos para desenvolvimento de uma formulação oral contendo *L. brasiliense*, para que seja testada em estudos clínicos detalhados em humanos a fim provar a eficácia dessas amostras e substâncias, e para que a população possa se beneficiar das atividades biológicas propostas nesse trabalho, melhorando o quadro geral de periodontite e aumentando a adesão do paciente ao tratamento.

Ao reduzir a incidência da doença periodontal, maiores gastos com saúde pública poderão ser também reduzidos, pois a doença está associada ao desenvolvimento de diversos problemas sistêmicos que se desenvolvem em seres humanos. Devemos citar também o crescente aumento da resistência bacteriana a nível mundial que, de acordo com a OMS, poderá causar a morte de 10 milhões de pessoas anualmente até 2050, além de um prejuízo econômico de 100 trilhões de dólares.

Por isso, investir no conhecimento científico acerca da periodontite e combate à *P. gingivalis* deve ser de interesse público e governamental, pois envolve a saúde da população mundial e a economia global que gira em torno disso.

## REFERÊNCIAS

\*Referências de acordo com as normas da Revista Brasileira de Farmacognosia

Abdel-Sattar, E., Shams, M.M., Abd-Rabo, M.M., Mahmoud, N., Mahrous, E.A., 2021. Chemical and biological investigations of *Limonium axillare* reveal mechanistic evidence for its antidiabetic activity. Plos one 16, e0255904.

Aihara, Y., Yoshida, A., Furuta, T., Wakimoto, T., Akizawa, T., Konishi, M., Kan, T., 2009. Regioselective synthesis of methylated epigallocatechin gallate via nitrobenzenesulfonyl (Ns) protecting group. Bioorganic & medicinal chemistry letters 19, 4171-4174.

Al-Asri, J., Fazekas, E., Lehoczki, G., Perdih, A., Görick, C., Melzig, M.F., Gyémánt, G., Wolber, G., Mortier, J., 2015. From carbohydrates to drug-like fragments: Rational development of novel  $\alpha$ -amylase inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry 23, 6725-6732.

Al-Madhagi, W., Hashim, N., Ali, N., Othman, R., 2019. Phytochemical screening, cytotoxic and antimicrobial activities of *Limonium socotranum* and *Peperomia blanda* extracts. Tropical Biomedicine 36, 11-21.

Amrani, A., Boubekri, N., Amrani, A., 2017. *Limonium bonduelli* extract against non peroxidation in brain and testes induced by iron in vitro. International Journal of Phytomedicine 9, 72-78.

Amrani, A., Lahneche, A.M., Benaissa, O., Boubekri, N., Demirtaş, I., Benayache, F., Benayache, S., Zama, D., 2019. *In vitro* Antiproliferative and inhibition of oxidative DNA damage activities of n-butanol extract of *Limonium bonduelli* from Algeria. Brazilian Archives of Biology and Technology 62.

Antonelli-Ushirobira, T.M., Blainski, A., Fernandes, H.G., Moura-Costa, G.F., Costa, M.A., Campos-Shimada, L.B., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Kaneshima, E.N., Becker, T.C., Leite-Mello, E.V., 2015a. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. Journal of ethnopharmacology 174, 293-298.

Antonelli-Ushirobira, T.M., Blainski, A., Gancedo, N.C., Gaburo, F., Cardoso, K.A.K., de Souza Leite-Mello, E.V., de Mello, J.C.P., Milaneze-Gutierrez, M.A., 2015b. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. Revista Brasileira de Farmacognosia 25, 320-327.

Asturias, F.J., Chadick, J.Z., Cheung, I.K., Stark, H., Witkowski, A., Joshi, A.K., Smith, S., 2005. Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase. Nature structural & molecular biology 12, 225-232.

Babanya, H., Garaschuk, I., 2021. *Porphyromonas gingivalis* as a risk factor for the Alzheimer's disease. InterConf.

Bakhouch, I., Aliat, T., Boubellouta, T., Gali, L., Şen, A., Bellik, Y., 2021. Phenolic contents and *in vitro* antioxidant, anti-tyrosinase, and anti-inflammatory effects of leaves and roots extracts of the halophyte *Limonium delicatulum*. South African Journal of Botany 139, 42-49.

Bassetti, C., Kallenberger, A., 1980. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions: A histomorphometric study on experimental animals. Journal of clinical periodontology 7, 443-456.

- Baysal, I., Ekizoglu, M., Ertas, A., Temiz, B., Agalar, H.G., Yabanoglu-Ciftci, S., Temel, H., Ucar, G., Turkmenoglu, F.P., 2021. Identification of Phenolic Compounds by LC-MS/MS and Evaluation of Bioactive Properties of Two Edible Halophytes: *Limonium effusum* and *L. sinuatum*. *Molecules* 26, 4040.
- Bhat, R., Adam, A.T., Lee, J.J., Gasiewicz, T.A., Henry, E.C., Rotella, D.P., 2014. Towards the discovery of drug-like epigallocatechin gallate analogs as Hsp90 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 24, 2263-2266.
- Blainski, A., 2010. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade in vivo de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (plumbaginaceae) – Baicuru. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
- Blainski, A., Gionco, B., Oliveira, A.G., Andrade, G., Scarminio, I.S., Silva, D.B., Lopes, N.P., Mello, J.C., 2017. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. *Journal of ethnopharmacology* 198, 313-323.
- Blainski, A., Lopes, G.C., de Mello, J.C., 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18, 6852-6865.
- Bondi Jr, A., Spaulding, E., Smith, D.E., Dietz, C., 1947. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *American Journal of medical sciences* 213, 221-225.
- Bonev, B., Hooper, J., Parisot, J., 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 61, 1295-1301.
- Bostanci, N., Belibasakis, G.N., 2012. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS microbiology letters* 333, 1-9.
- Boyle, E.C., Finlay, B.B., 2003. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Current opinion in cell biology* 15, 633-639.
- Cale, J.M., Li, S.-H., Warnock, M., Su, E.J., North, P.R., Sanders, K.L., Puscau, M.M., Emal, C.D., Lawrence, D.A., 2010. Characterization of a novel class of polyphenolic inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1. *Journal of Biological Chemistry* 285, 7892-7902.
- Candolle, A.L.P.P., 1864. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis sive enumeratio contracta ordinum, generum specierumque plantarum huc usque cognitarum, juxta methodi naturalis normas digesta. sumptibus sociorum Treuttel et Würtz.*
- Cardoso, M.L.C., 1990b. *Limonium brasiliensis* (boiss.) kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): desenvolvimento galênico e extratos.
- Carrol, D.H., Chassagne, F., Dettweiler, M., Quave, C.L., 2020. Antibacterial activity of plant species used for oral health against *Porphyromonas gingivalis*. *PloS one* 15, e0239316.
- Chen, J., Teng, J., Ma, L., Tong, H., Ren, B., Wang, L., Li, W., 2017. Flavonoids isolated from the flowers of *Limonium bicolor* and their *in vitro* antitumor evaluation. *Pharmacognosy magazine* 13, 222.



- Chen, T., Nakayama, K., Belliveau, L., Duncan, M.J., 2001. *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infection and immunity* 69, 3048-3056.
- Cheng, X.-R., Zhou, J.-W., Cheng, J.-P., Yang, R.-F., Zhou, W.-X., Zhang, Y.-x., Yun, L.-H., 2012. The green tea polyphenol (2)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is not a  $\beta$ -secretase inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 22, 1408-1414.
- Chopra, A., Radhakrishnan, R., Sharma, M., 2020. *Porphyromonas gingivalis* and adverse pregnancy outcomes: a review on its intricate pathogenic mechanisms. *Critical reviews in microbiology* 46, 213-236.
- Cohn, E.P., Wu, K.-L., Pettus, T.R., Reich, N.O., 2012. A new strategy for detection and development of tractable telomerase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 55, 3678-3686.
- Correa, M., Penna, L.d.A., 1974. *Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exoticas cultivadas: volume 5. MR. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal 687p.-illus.. Por Icones. Geog 4.*
- Curi, M.A.M., Borges, M.C.L., Geraldo-Martins, V.R., Silva, C.B., Rodrigues, R.R., Rodrigues, D.B.R., Pereira, S.A.L., Nogueira, R.D., 2021. *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em sangue do cordão umbilical e periférico, saliva e colostro de mulheres com gengivite. *Research, Society and Development* 10, e372101623791-e372101623791.
- Curtis, M., Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M., 2001. Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 12, 192-216.
- Cutler, C.W., Kalmar, J.R., Genco, C.A., 1995. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in microbiology* 3, 45-51.
- de Oliveira Caleare, A., Hensel, A., Mello, J.C., Pinha, A.B., Panizzon, G.P., Lechtenberg, M., Petereit, F., Nakamura, C.V., 2017. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia* 118, 87-93.
- der Pflanzenfamilien, A.E.S., 1964. *Gebruder Borntraeger. Berlin.*
- Dias da Silva, R., 1920. Plantas medicinaes do Brasil, o guaycuru. *Bol. Assoc. Bras. Pharm* 1, 4-14.
- Dominy, S.S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., 2019. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science advances* 5, eaau3333.
- El-Kousy, S.M., Emam, S.S., Hassan, A.R., Sanad, I.M., 2021. Metabolites profiling of *Limonium tubiflorum* (Delile) Kuntze var *tubiflorum* via UPLC-qTOF-MS technique in relation to its cytotoxic activity. *Jordan Journal of Biological Sciences. All rights reserved-Volume 14, 664.*
- Erdmann, A., Halby, L., Fahy, J., Arimondo, P.B., 2015. Targeting DNA methylation with small molecules: what's next? *Miniperspective. Journal of medicinal chemistry* 58, 2569-2583.
- Eren, Y., 2019. Effects of *Limonium effusum* Ethanol Extracts on Cell Proliferation and Mutagenicity. *Biology Bulletin* 46, 577-582.

- Eren, Y., Özata, A., 2014. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24, 51-59.
- Esteban-Fernández, A., Zorraquín-Peña, I., Ferrer, M.D., Mira, A., Bartolomé, B., González de Llano, D., Moreno-Arribas, M.V., 2018. Inhibition of Oral Pathogens Adhesion to Human Gingival Fibroblasts by Wine Polyphenols Alone and in Combination with an Oral Probiotic. *J Agric Food Chem* 66, 2071-2082.
- Faral-Tello, P., Mirazo, S., Dutra, C., Pérez, A., Geis-Asteggiant, L., Frabasile, S., Koncke, E., Davyt, D., Cavallaro, L., Heinzen, H., 2012. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *The Scientific World Journal* 2012.
- Fiorillo, L., Cervino, G., Laino, L., D'Amico, C., Mauceri, R., Tozum, T.F., Gaeta, M., Cicciù, M., 2019. *Porphyromonas gingivalis*, periodontal and systemic implications: a systematic review. *Dentistry journal* 7, 114.
- Gadetskaya, A.V., Mohamed, S.M., Tarawneh, A.H., Mohamed, N.M., Ma, G., Ponomarev, B.N., Zhusupova, G.E., Cantrell, C.L., Cutler, S.J., Ross, S.A., 2017. Phytochemical characterization and biological activity of secondary metabolites from three *Limonium species*. *Medicinal Chemistry Research* 26, 2743-2750.
- Gancedo, N.C., Isolani, R., de Oliveira, N.C., Nakamura, C.V., de Medeiros Araújo, D.C., Sanches, A.C.C., Tonin, F.S., Fernandez-Llimos, F., Chierrito, D., de Mello, J.C.P., 2023. Chemical Constituents, Anticancer and Anti-Proliferative Potential of *Limonium Species*: A Systematic Review. *Pharmaceuticals* 16, 293.
- Gilson, M.K., Liu, T., Baitaluk, M., Nicola, G., Hwang, L., Chong, J., 2016. BindingDB in 2015: a public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic acids research* 44, D1045-D1053.
- Gimeno, A., Santos, L.M., Alemi, M., Rivas, J., Blasi, D., Cotrina, E.Y., Llop, J., Valencia, G., Cardoso, I., Quintana, J., 2017. Insights on the interaction between transthyretin and A $\beta$  in solution. A saturation transfer difference (STD) NMR analysis of the role of iododiflunisal. *Journal of medicinal chemistry* 60, 5749-5758.
- Gnanasekaran, J., Binder Gallimidi, A., Saba, E., Pandi, K., Eli Berchoer, L., Hermano, E., Angabo, S., Makkawi, H., Khashan, A., Daoud, A., 2020. Intracellular *Porphyromonas gingivalis* promotes the tumorigenic behavior of pancreatic carcinoma cells. *Cancers* 12, 2331.
- Gourdain, S., Dairou, J., Denhez, C., Bui, L.C., Rodrigues-Lima, F., Janel, N., Delabar, J.M., Cariou, K., Dodd, R.H., 2013. Development of DANDYs, new 3, 5-diaryl-7-azaindoles demonstrating potent DYRK1A kinase inhibitory activity. *Journal of medicinal chemistry* 56, 9569-9585.
- Gyawali, R., Ibrahim, S.A., 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46, 412-429.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology* 15, 1795-1810.
- Hamadou, M.H., Kerkatou, M., Gatto, P., Pancher, M., Bisio, A., Inga, A., Menad, A., Benayache, S., Benayache, F., Ameddah, S., 2019. Apigenin rich-*Limonium duriusculum* (de Girard) Kuntze promotes apoptosis in HCT116 cancer cells. *Natural product research*, 1-5.

- Hamadou, M.H., Kerkatou, M., Zucal, C., Bisio, A., Provenzani, A., Inga, A., Menad, A., Benayache, S., Benayache, F., Ameddah, S., 2021. *Limonium duriusculum* (de Girard) Kuntze Exhibits Anti-inflammatory Effect Via NF- $\kappa$ B Pathway Modulation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 64.
- Haslam, E., 1974. Polyphenol–protein interactions. *Biochemical Journal* 139, 285.
- Hassan, A.R., Sanad, I.M., Allam, A.E., Abouelela, M.E., Sayed, A.M., Emam, S.S., El-Kousy, S.M., Shimizu, K., 2021. Chemical constituents from *Limonium tubiflorum* and their *in silico* evaluation as potential antiviral agents against SARS-CoV-2. *Rsc Advances* 11, 32346-32357.
- Hidalgo, E., Dominguez, C., 2001. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicology in vitro* 15, 271-276.
- Hočevár, K., Potempa, J., Turk, B., 2018. Host cell-surface proteins as substrates of gingipains, the main proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Biological chemistry* 399, 1353-1361.
- Holt, S.C., Kesavalu, L., Walker, S., Genco, C.A., 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 20, 168-238.
- Hortense, S.R., de Carvalho, F.S., da Silva, R.P.R., de Magalhães Bastos, J.R., da Silva Bastos, R., 2010. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo* 22, 178-184.
- Imamura, T., 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology* 74, 111-118.
- Isolani, R.G., 2017. Avaliação da atividade de extratos e substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes Simplex tipo I, 62.
- Jahns, R., Crescente, A., 1976. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluído de *Limonium statice brasiliense* Boiss, e N-acetil-p-aminofenol em musculatura lisa. *Trib. Farm. Curitiba* 44, 105-111.
- Jaszczyszyn, A., Gąsiorowski, K., 2008. Limitations of the MTT assay in cell viability testing. *Advances in clinical and experimental medicine* 17, 525-529.
- Jefferson, K.K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters* 236, 163-173.
- Jenis, J., Kim, J.Y., Uddin, Z., Song, Y.H., Lee, H.-H., Park, K.H., 2017. Phytochemical profile and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Limonium michelsonii* Lincz. *Journal of natural medicines* 71, 650-658.
- Joly, A., 2005. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 777 p. Editora Companhia Editora Nacional. Brasil.
- Keiser, M.J., Roth, B.L., Armbruster, B.N., Ernsberger, P., Irwin, J.J., Shoichet, B.K., 2007. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nature biotechnology* 25, 197-206.
- Kim, N.-H., Heo, J.-D., Rho, J.-R., Yang, M.H., Jeong, E.J., 2017. Anti-obesity effect of halophyte crop, *Limonium tetragonum* in high-fat diet-induced obese mice and 3T3-L1 adipocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 40, 1856-1865.

Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A., 2016. PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research* 44, D1202-D1213.

Kline, K.A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., Henriques-Normark, B., 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe* 5, 580-592.

Kunitake, H., Koreeda, K., Mii, M., 1995. Morphological and cytological characteristics of protoplast-derived plants of statice (*Limonium perezii* Hubbard). *Scientia horticultrae* 60, 305-312.

Kwon, M.S., Kim, J., Oh, J.H., Karadeniz, F., Lee, J.I., Seo, Y., Kong, C.-S., 2019. Antiadipogenic activity of solvent-partitioned fractions from *Limonium tetragonum* in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Life Science* 29, 60-68.

Labrecque, J., Bodet, C., Chandad, F., Grenier, D., 2006. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 439-443.

Lafuente Ibáñez de Mendoza, I., Maritxalar Mendia, X., Garcia de la Fuente, A.M., Quindos Andres, G., Aguirre Urizar, J.M., 2020. Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral squamous cell carcinoma development: A systematic review. *Journal of periodontal research* 55, 13-22.

Lamont, R., Jenkinson, H., 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular Oral Microbiology* 15, 341-349.

Larsen, C.A., Bisson, W.H., Dashwood, R.H., 2009. Tea catechins inhibit hepatocyte growth factor receptor (MET kinase) activity in human colon cancer cells: kinetic and molecular docking studies. *Journal of medicinal chemistry* 52, 6543-6545.

Lee, S.-G., Karadeniz, F., Seo, Y., Kong, C.-S., 2017. Anti-melanogenic effects of flavonoid glycosides from *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock via inhibition of tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Molecules* 22, 1480.

Lifchitz, A., 1981. *Plantas medicinales: guía práctica de botánica medicinal*. Ediciones Arneo. List, T.P., 2013a. Version 1.1.

List, T.P., 2013b. The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=limonium>.

Löhr, G., Beikler, T., Podbielski, A., Standar, K., Redanz, S., Hensel, A., 2011b. Polyphenols from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. inhibit in vitro adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and exert anti-inflammatory cytoprotective effects in KB cells. *Journal of clinical periodontology* 38, 457-469.

Lopes, M., Stumpf, E., Carvalho, F., 2003. Efeito do substrato na reprodução assexuada da *Limonium brasiliense* (Boiss.) O. Kuntze. *Current Agricultural Science and Technology* 9.

Masullo, M., Menegazzi, M., Di Micco, S., Beffy, P., Bifulco, G., Dal Bosco, M., Novelli, M., Pizza, C., Masiello, P., Piacente, S., 2014. Direct interaction of garcinol and related polyisoprenylated benzophenones of *Garcinia cambogia* fruits with the transcription factor STAT-1 as a likely mechanism of their inhibitory effect on cytokine signaling pathways. *Journal of natural products* 77, 543-549.

- Mazouz, W., Haouli, N.E.H., Gali, L., Vezza, T., Bensouici, C., Mebrek, S., Hamel, T., Galvez, J., Djeddi, S., 2020. Antioxidant, anti-alzheimer, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities of the endemic halophyte *Limonium spathulatum* (Desf.) Kuntze on LPS-stimulated RAW264 macrophages. *South African Journal of Botany* 135, 101-108.
- Medina, J., Rondina, R., Coussio, J., 1977. Phytochemical screening of argentine plants with potential pharmacological activity (part VII) 1. *Planta medica* 31, 136-140.
- Mei, F., Xie, M., Huang, X., Long, Y., Lu, X., Wang, X., Chen, L., 2020. *Porphyromonas gingivalis* and its systemic impact: current status. *Pathogens* 9, 944.
- Mello, J.P., Petereit, F., Nahrstedt, A., 1996. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 41, 807-813.
- Mennai, I., Lamera, E., Slougui, N., Benaicha, B., Gasmi, S., Samai, Z., Rahmouni, N., Bensouici, C., CGA Pinto, D., 2021. Chemical Composition and Antioxidant, Antiparasitic, Cytotoxicity and Antimicrobial Potential of the Algerian *Limonium oleifolium* Mill. Essential Oil and Organic Extracts. *Chemistry & Biodiversity* 18, e2100278.
- Minagawa, T., Okui, T., Takahashi, N., Nakajima, T., Tabeta, K., Murakami, S., Yamazaki, K., 2015. Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT 1 independent manner. *Journal of Periodontal Research* 50, 586-593.
- Moore, J.D., Potter, A., 2013. Pin1 inhibitors: Pitfalls, progress and cellular pharmacology. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23, 4283-4291.
- Morgan, D.M., 1998. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity, Polyamine protocols. Springer, pp. 179-184.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.
- Moura, T.F.A., Schenkel, E.P., Simoes, C.M.O., Santos, R.I.d., Schapoval, E.E.S., 1985. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze-Plumbaginaceae (Baicuru). *Caderno de farmácia*. Porto Alegre, RS.
- Murray, A.P., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A., Mulet, M.C., 2004. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 59, 477-480.
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J., 2014. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *Journal of immunology research* 2014.
- Neto, C.C., Penndorf, K.A., Feldman, M., Meron-Sudai, S., Zakay-Rones, Z., Steinberg, D., Fridman, M., Kashman, Y., Ginsburg, I., Ofek, I., Weiss, E.I., 2017. Characterization of non-dialyzable constituents from cranberry juice that inhibit adhesion, co-aggregation and biofilm formation by oral bacteria. *Food Funct* 8, 1955-1965.
- Niu, X., Fan, X., Sun, J., Ting, P., Narula, S., Lundell, D., 2004. Inhibition of fucosyltransferase VII by gallic acid and its derivatives. *Archives of biochemistry and biophysics* 425, 51-57.
- Nurkenov, T., Tsoy, A., Olzhayev, F., Abzhanova, E., Turgambayeva, A., Zhussupova, A., Avula, B., Ross, S., Aituarova, A., Kassymova, D., 2021. Plant Extract of *Limonium gmelinii* Attenuates Oxidative Responses in Neurons, Astrocytes, and Cerebral Endothelial Cells *In Vitro*

and Improves Motor Functions of Rats after Middle Cerebral Artery Occlusion. *Antioxidants* 10, 1814.

Nurkenov, T., Tsoy, A., Zhusupova, G., Olzhayev, F., Shertay, M.Z., Shalakhmetova, T., Lee, J.-M., Askarova, S.N., 2020. Therapeutic effectiveness of *Limonium gmelinii* extract in experimentally-induced ischemic brain damage in vivo. *International Journal of Biology and Chemistry* 13, 4-13.

Ofek, I., Hasty, D.L., Sharon, N., 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 38, 181-191.

Olsen, I., Kell, D.B., Pretorius, E., 2020. Is *Porphyromonas gingivalis* involved in Parkinson's disease? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 39, 2013-2018.

Olsen, I., Yilmaz, Ö., 2019. Possible role of *Porphyromonas gingivalis* in orodigestive cancers. *Journal of oral microbiology* 11, 1563410.

Park, H.-J., Jeong, S.-K., Kim, S.-R., Bae, S.-K., Kim, W.-S., Jin, S.-D., Koo, T.H., Jang, H.-O., Yun, I., Kim, K.-W., 2009. Resveratrol inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Archives of pharmacal research* 32, 583-591.

Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F.E., 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology* 183, 3770-3783.

Perricone, C., Ceccarelli, F., Matteo, S., Di Carlo, G., Bogdanos, D.P., Lucchetti, R., Pilloni, A., Valesini, G., Polimeni, A., Conti, F., 2019. *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology* 31, 517-524.

Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W., 2005. Periodontal diseases. *The lancet* 366, 1809-1820.

Pilatti, F., Isolani, R., Valone, L., de Paula, M.N., de Oliveira Caleare, A., de Souza Ferreira, S.B., Bruschi, M.L., de Medeiros Araújo, D.C., Guedes, T.A., Hensel, A., 2022. Microstructured Polymer System Containing Proanthocyanidin-Enriched Extract from *Limonium brasiliense* as a Prophylaxis Strategy to Prevent Recurrence of *Porphyromonas gingivalis*. *Planta Medica*.

Potempa, J., Sroka, A., Imamura, T., Travis, J., 2003. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Current Protein and Peptide Science* 4, 397-407.

Qi, Y.-J., Jiao, Y.-L., Chen, P., Kong, J.-Y., Gu, B.-L., Liu, K., Feng, D.-D., Zhu, Y.-F., Ruan, H.-J., Lan, Z.-J., 2020. *Porphyromonas gingivalis* promotes progression of esophageal squamous cell cancer via TGF $\beta$ -dependent Smad/YAP/TAZ signaling. *PLoS biology* 18, e3000825.

Ragonese, A.E., Milano, V.A., 1984. Vegetales y sustancias tóxicas de la flora argentina. Acme Buenos Aires.

Rasko, D.A., Sperandio, V., 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature reviews Drug discovery* 9, 117-128.

- Rodriguez, S., Vina, M., Murray, A., Leiro, J., 2011. Anti-inflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Planta Medica* 77, PF68.
- Rodriguez, S.A.A., Murray, A.P.P., Leiro, J.M., 2020. Xanthine Oxidase Inhibition by Aqueous Extract of *Limonium brasiliense* (Plumbaginaceae), *Chemistry Proceedings. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, p. 123.
- Rosito, J.F., 1975. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia.
- Ruiz-Riaguas, A., Zengin, G., Sinan, K., Salazar-Mendías, C., Llorent-Martínez, E., 2020. Phenolic profile, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Limonium delicatulum* (girard) kuntze and *Limonium quesadense* erben. *Journal of Chemistry* 2020.
- Ryder, M.I., 2020. *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer disease: recent findings and potential therapies. *Journal of Periodontology* 91, S45-S49.
- Sakanaka, A., Takeuchi, H., Kuboniwa, M., Amano, A., 2016. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. *Microbial pathogenesis* 94, 42-47.
- Sakanaka, S., Aizawa, M., Kim, M., Yamamoto, T., 1996. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 60, 745-749.
- Sanna, C., Rigano, D., Corona, A., Piano, D., Formisano, C., Farci, D., Franzini, G., Ballero, M., Chianese, G., Tramontano, E., 2019. Dual HIV-1 reverse transcriptase and integrase inhibitors from *Limonium morisianum* Arrigoni, an endemic species of Sardinia (Italy). *Natural product research* 33, 1798-1803.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
- Schmidt, C.A., Murillo, R., Bruhn, T., Bringmann, G., Goettert, M., Heinzmann, B., Brecht, V., Laufer, S.A., Merfort, I., 2010. Catechin derivatives from *Parapiptadenia rigida* with *in vitro* wound-healing properties. *Journal of natural Products* 73, 2035-2041.
- Schmuck, J., Beckert, S., Brandt, S., Löhr, G., Hermann, F., Schmidt, T.J., Beikler, T., Hensel, A., 2015. Extract from *Rumex acetosa* L. for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial *in vitro* adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by epicatechin-3-*O*-(4 $\beta$ → 8)-epicatechin-3-*O*-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). *Plos one* 10, e0120130.
- Schofield, P., Mbugua, D., Pell, A., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal feed science and technology* 91, 21-40.
- Senizza, B., Zhang, L., Rocchetti, G., Zengin, G., Ak, G., Yıldızıtugay, E., Elbasan, F., Jugreet, S., Mahomoodally, M.F., Lucini, L., 2021. Metabolomic profiling and biological properties of six *Limonium* species: novel perspectives for nutraceutical purposes. *Food & Function* 12, 3443-3454.
- Sereia, A.L., de Oliveira, M.T., Baranoski, A., Marques, L.L.M., Ribeiro, F.M., Isolani, R.G., de Medeiros, D.C., Chierrito, D., Lazarin-Bidóia, D., Zielinski, A.A.F., 2019. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *PloS one* 14, e0212089.
- Seyama, M., Yoshida, K., Yoshida, K., Fujiwara, N., Ono, K., Eguchi, T., Kawai, H., Guo, J., Weng, Y., Haoze, Y., 2020. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* attenuate

insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1866, 165731.

Sharma, S.K., Parasuraman, P., Kumar, G., Surolia, N., Surolia, A., 2007. Green tea catechins potentiate triclosan binding to enoyl-ACP reductase from *Plasmodium falciparum* (PfENR). *Journal of medicinal chemistry* 50, 765-775.

Sharon, N., 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1760, 527-537.

Shin, E.S., Park, J., Shin, J.-M., Cho, D., Cho, S.Y., Shin, D.W., Ham, M., Kim, J.B., Lee, T.R., 2008. Catechin gallates are NADP<sup>+</sup>-competitive inhibitors of glucose-6-phosphate dehydrogenase and other enzymes that employ NADP<sup>+</sup> as a coenzyme. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16, 3580-3586.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., de Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2016. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora.

Simon, R.P., Robaa, D., Alhalabi, Z., Sippl, W., Jung, M., 2016. KATching-up on small molecule modulators of lysine acetyltransferases. *Journal of medicinal chemistry* 59, 1249-1270.

Singh Rao, S.K., Olsen, I., 2019. Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. *Journal of oral microbiology* 11, 1563405.

Sinha, N., Sen, S., 2011. Predicting hERG activities of compounds from their 3D structures: Development and evaluation of a global descriptors based QSAR model. *European journal of medicinal chemistry* 46, 618-630.

Soares, S., Mateus, N., De Freitas, V., 2007. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6726-6735.

Sohn, J., Li, L., Zhang, L., Settem, P.R., Honma, K., Sharma, A., Falkner, K.L., Novak, J.M., Sun, Y., Kirkwood, K.L., 2021. *Porphyromonas gingivalis* indirectly elicits intestinal inflammation by altering the gut microbiota and disrupting epithelial barrier function through IL9-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Molecular Oral Microbiology*.

Sterling, T., Irwin, J.J., 2015. ZINC 15—ligand discovery for everyone. *Journal of chemical information and modeling* 55, 2324-2337.

Stewart, P.S., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International journal of medical microbiology* 292, 107-113.

Suzuki, N., Yoneda, M., Hirofuji, T., 2013. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *International journal of dentistry* 2013.

Tasdemir, D., Lack, G., Brun, R., Rüedi, P., Scapozza, L., Perozzo, R., 2006. Inhibition of *Plasmodium falciparum* Fatty Acid Biosynthesis: Evaluation of FabG, FabZ, and FabI as Drug Targets for Flavonoids. *Journal of medicinal chemistry* 49, 3345-3353.

Tuohongerbieke, A., Li, J., Sabir, G., Xin, X., Hu, M., Duan, X., Liu, L., Tang, D., Zhu, J., Aisa, H.A., 2021. Lignanamide from the roots of *Limonium gmelinii* (Willd.) Kuntze and their anti-diabetic, cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* 184, 112648.



- Utomo, H., Wijaksana, I.K.E., Prahasanti, C., 2021. *Porphyromonas gingivalis* in Periodontitis: A Forgotten Enemy Behind COVID-19 Pandemic. *Dental Hypotheses* 12, 28.
- Van Winkelhoff, A., Boutaga, K., 2005. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *Journal of clinical periodontology* 32, 16-27.
- W. John Kress, L.B.a.O., 2008. Caryophyllales. *Encyclopaedia Britannica*, inc.
- Wang, E.-j., Casciano, C.N., Clement, R.P., Johnson, W.W., 2003. Fluorescent substrates of sister-P-glycoprotein (BSEP) evaluated as markers of active transport and inhibition: evidence for contingent unequal binding sites. *Pharmaceutical research* 20, 537-544.
- Wong, I.L., Wang, B.-C., Yuan, J., Duan, L.-X., Liu, Z., Liu, T., Li, X.-M., Hu, X., Zhang, X.-Y., Jiang, T., 2015. Potent and nontoxic chemosensitizer of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer: synthesis and evaluation of methylated epigallocatechin, gallicocatechin, and dihydromyricetin derivatives. *Journal of medicinal chemistry* 58, 4529-4549.
- Wright, H.T., Reynolds, K.A., 2007. Antibacterial targets in fatty acid biosynthesis. *Current opinion in microbiology* 10, 447-453.
- Wu, L., Zhang, S.Q., Zhao, L., Ren, Z.H., Hu, C.Y., 2022. Global, regional, and national burden of periodontitis from 1990 to 2019: Results from the Global Burden of Disease study 2019. *Journal of periodontology* 93, 1445-1454.
- Xu, G.-H., Kim, Y.-H., Chi, S.-W., Choo, S.-J., Ryoo, I.-J., Ahn, J.-S., Yoo, I.-D., 2010. Evaluation of human neutrophil elastase inhibitory effect of iridoid glycosides from *Hedyotis diffusa*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20, 513-515.
- Yurchyshyn, O., Rusko, G., Kutsyk, R., 2017. Antimicrobial effect of south Ukrainian sea lavender *Limonium meyeri* (Boiss.) O. Kuntze and *Limonium hypanicum* Klok. with especial emphasizing against staphylococci and *Propionibacteria*. *Pharma Innov. J* 6, 380-384.
- Zappi, D., 2015. Plumbaginaceae. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*.
- Zhao, Q., Chen, G.-D., Feng, X.-L., Yu, Y., He, R.-R., Li, X.-X., Huang, Y., Zhou, W.-X., Guo, L.-D., Zheng, Y.-Z., 2015. Nodulisporiviridins A–H, Bioactive Viridins from *Nodulisporium* sp. *Journal of natural products* 78, 1221-1230.