



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



FERNANDA PILATTI DA SILVA

**SISTEMA POLIMÉRICO MICROESTRUTURADO CONTENDO *Limonium
brasiliense* COMO ESTRATÉGIA PARA PREVENIR RECORRÊNCIA
BACTERIANA DE *Porphyromonas gingivalis***

Maringá
Julho – 2022

FERNANDA PILATTI DA SILVA

SISTEMA POLIMÉRICO MICROESTRUTURADO CONTENDO *Limonium
brasiliense* COMO ESTRATÉGIA PARA PREVENIR RECORRÊNCIA
BACTERIANA DE *Porphyromonas gingivalis*

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Maringá
Julho – 2022

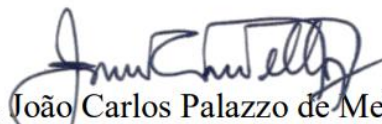
FERNANDA PILATTI DA SILVA

**SISTEMA POLIMÉRICO MICROESTRUTURADO CONTENDO *Limonium
brasiliense* COMO ESTRATÉGIA PARA PREVENIR RECORRÊNCIA
BACTERIANA DE *Porphyromonas gingivalis***

135ª 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 22 de julho 2022

BANCA EXAMINADORA



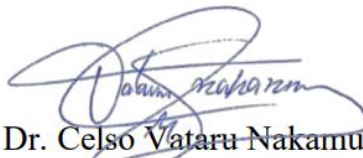
Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá



Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina



Dra. Audrey Alesandra Stingen Garcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina



Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Mychelle Vianna Pereira Companhoni
Universidade Federal de 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.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Ademir e Claudete, por sempre me incentivarem a buscar novos desafios e me ajudarem a superá-los.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais Ademir Maximino da Silva e Claudete Pilatti da Silva por todo apoio emocional e financeiro que sempre dispuseram aos meus estudos. Em meio aos obstáculos da vida, minha formação sempre foi prioridade na vida deles e nunca mediram esforços para me proporcionar sempre o melhor que poderiam me dar.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, por ter acreditado e investido em mim. Quando estive em meu pior período na academia, ele me estendeu a mão e me ajudou, sem medir esforços me apoiou e confiou em mim. Me proporcionou a maior experiência profissional e de vida, me confiando uma bolsa de doutorado na Alemanha. Tenho profunda gratidão e admiração pelo profissional que é.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Andreas Hensel, que me supervisionou no período do doutorado sanduíche em Münster, na Alemanha. Abriu as portas de seu laboratório e deu todo suporte para a realização da minha pesquisa. Nunca esquecerei esta oportunidade que me foi dada, de ser orientada por este profissional que é referência internacional em Fitoterapia.

Também gostaria de agradecer meu namorado, Alisson Ferrari, por sempre me prestar apoio incondicional, me colocar como prioridade em sua vida, me incentivando sempre a ser uma profissional melhor, e também por sempre me salvar com os problemas típicos que o doutorando enfrenta com planilhas, computadores e impressoras (risos).

Eterna gratidão às minhas amigas Raquel Isolani e Larissa Valone, que viveram intensamente comigo todo período da minha pesquisa, nos apoiamos, trabalhamos juntas, dividimos tarefas e experimentos, compartilhamos sorrisos e tristezas. Sem elas eu não teria conseguido concluir este trabalho.

Agradeço à minha família, em especial aos meus avós, que sempre me colocaram em suas orações e sentem profunda admiração pela minha dedicação aos estudos.

Ao grupo Palafito, que sempre teve a equipe como prioridade. Todos dispostos a ajudar uns aos outros, buscando sempre obter bons resultados para o grupo como um todo, em especial à Mariana Nascimento de Paula e Daniela Cristina de Medeiros por sempre compartilharem de seu tempo e conhecimento para esta pesquisa.

Ao Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica da Universidade de Münster, Alemanha, em especial ao Dr. Matthias Lechtenberg, Dr.^a Maren Kelm e Dr.^a Birte Scharf, por

toda paciência e dedicação para me auxiliar no desenvolvimento das metodologias do meu trabalho.

Gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e em especial à Helena, que nunca nos negou ajuda, sempre nos apoiou e nos atendeu mesmo quando não tinha mais nem um minuto livre no seu dia.

Aos demais docentes da pós-graduação, por compartilharem seus conhecimentos, laboratórios, equipamentos e experiências.

Aos programas financiadores deste estudo, Comcap, CNPq, CAPES, INCT-if, FINEP e Fundação Araucária, pelos auxílios e suporte financeiro.

Aos membros da banca que dispuseram parte do seu tempo para contribuir na melhoria deste trabalho.

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

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, I would like to thank my parents Ademir Maximino da Silva and Claudete Pilatti da Silva for all the emotional and financial support they always provided to my studies. In the midst of life's obstacles, my education has always been a priority in their lives and they never measured efforts to always provide me with the best they could give me.

Second, I would like to thank my adviser Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, for believing and investing in me. When I was at my worst period at the college, he was the one who reached out and helped me, without measuring efforts, supported me and trusted me. He provided me with the greatest professional and life experience, entrusting me with a PhD scholarship in Germany. I have deep gratitude and admiration for the professional that he is.

I am immensely grateful to Prof. Dr. Andreas Hensel, who supervised me during my sandwich doctorate period in Münster, Germany. He opened the doors of his laboratory and gave all the support to carry out my research. I will never forget this opportunity that was given to me, to be guided by this professional who is an international reference in Phytotherapy.

I would also like to thank my boyfriend, Alisson Ferrari, for always giving me unconditional support, putting me as a priority in his life, always encouraging me to be a better professional. And also, for always saving me with the typical problems that doctoral students face with computers, and printers (laughs).

Eternal gratitude to my friends Raquel Isolani and Larissa Valone, who lived intensely with me throughout my research, we supported each other, worked together, shared tasks and experiments, shared smiles and sadness. Without them I would not have been able to complete this work.

I thank my family, especially my grandparents, who have always put me in their prayers and feel deep admiration for my dedication to my studies.

To the Palafito group, which always had the team as a priority. All willing to help each other, always seeking to obtain good results for the group as a whole, especially Mariana Nascimento de Paula and Daniela Cristina de Medeiros for always sharing their time and knowledge for this research.

To the Institute of Pharmaceutical Biology and Phytochemistry at the University of Münster, Germany, in particular to Dr. Matthias Lechtenberg, Dr. Maren Kelm and Dr. Birte Scharf, for their patience and dedication to helping me develop the methodologies of my thesis.

Gratitude to the Graduate Program in Pharmaceutical Sciences and especially to Helena, who never denied us help, always supported and attended to us even when she didn't have even a free minute in her day.

To the other postgraduate professors, for sharing their knowledge, laboratories, equipment and experiences.

To the programs that financed this study, Comcap, CNPq, CAPES, INCT-if, FINEP and Fundação Araucária, for their financial support.

To all the doctors who evaluated this doctoral defense who took part of their time to contribute to the improvement of this work.

Thanks to everyone who contributed in some way to this work.

EPÍGRAFE

*“E não tão longe que eu não possa voltar, e nada tão
difícil que eu não possa superar”
Chorão – Charlie Brown Jr.*

BIOGRAFIA



Fernanda Pilatti da Silva

Fernanda Pilatti da Silva, nascida em Paranatinga, Mato Grosso, possui graduação em Farmácia, pela Universidade Estadual de Maringá (2015), Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (2018) sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Marli Miriam de Souza Lima, Especialização em Farmacologia Aplicada à Terapêutica em (2018) na mesma instituição. Realizou pesquisas na *Westfälische Wilhelms-Universität Münster*, sob supervisão do Prof. Dr. Andreas Hensel, durante o período de doutorado sanduíche (CNPq) na Alemanha (março/2018 a fevereiro/2019). Fez intercâmbio em Chicago – EUA buscando o aperfeiçoamento da língua inglesa (2013). Atualmente é pesquisadora na indústria farmacêutica Prati Donaduzzi no setor de Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação – Pré-Formulação. Também é Sócia-Proprietária da *start up* Saludem Farmacêutica, Maringá, PR. Doutora em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello (fevereiro/2018 a julho/2022).

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica - Palafito (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello) em parceria com o *Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie – Westfälische Wilhelms-Universität*, em Münster, Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Andreas Hensel, em período de doutorado sanduíche pelo Programa Ciências sem Fronteiras (*Grant #200175/2018-1*). Foram utilizados equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), da Universidade Estadual de Maringá. Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica (INCT_if), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Fundação Araucária e à *Westfälische-Wilhelms Universität*.

Partes deste trabalho foram apresentadas em Congressos:

Evaluation of cytotoxicity of microparticles containing *Limonium brasiliense* against KB cells – *I International Meeting of Pharmaceutical Science*, Maringá, PR, 2018;

Evaluation of the antiadhesive activity of microparticles containing semipurified extract of *Limonium brasiliense* against *Porphyromonas gingivalis* – *12th International Congress on Polyphenols Applications*, Bonn, NRW, Alemanha, 2018;

Evaluation of the antiadhesive activity and antibiofilm formation of microparticles containing *Limonium brasiliense* against *Porphyromonas gingivalis* – *II International Meeting of Pharmaceutical Science*, Maringá, PR, 2019;

Micropartículas contendo *Limonium brasiliense* inibem a formação de biofilme de *Porphyromonas gingivalis* – XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica, Petrópolis, RJ, 2019.

Microparticles inhibit adhesion by *Porphyromonas gingivalis* – II International Symposium on Drug Delivery Systems: Innovation, technology, and pharmacometrics, evento online, 2021;

In vitro drug release of mucoadhesive microparticles containing semi-purified fraction of *Limonium brasiliense* – II International Symposium on Drug Delivery Systems: Innovation, technology, and pharmacometrics, evento online, 2021.

Patente depositada:

Uso de polímero microestruturado com *Limonium brasiliense* e respectivas micropartículas – Processo de número: BR 10 2020 023491 9.

Premiações:

Este trabalho foi selecionado, dentre as 1851 ideias submetidas, pelo Sinapse da Inovação do Paraná, com a execução do Governo do Estado, por meio da Celepar e Fundação Araucária, com operação da Fundação CERTI e o apoio do Sebrae e Fiep a receber recursos financeiros via subvenção econômica, serviços técnicos de parceiros, capacitações, suporte para desenvolver seu projeto, contato com potenciais investidores, indicação para outras oportunidades e *networking* e acesso a parceiros.

RESUMO

FERNANDA PILATTI DA SILVA, 2022. Sistema polimérico microestruturado contendo *Limonium brasiliense* como estratégia para prevenir recorrência bacteriana de *Porphyromonas gingivalis*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 94p.

As doenças periodontais são um problema global de saúde bucal que afetam quase 10% da população mundial. *Porphyromonas gingivalis* é uma das principais bactérias envolvidas na iniciação e progressão de processos inflamatórios como resultado da ação das cisteína-proteases lisina- e arginina-gingipaína. Foram fabricadas micropartículas de Surelase/policarbofil (MLB) contendo uma fração liofilizada enriquecida com proantocianidinas dos rizomas de *Limonium brasiliense*, tradicionalmente conhecido como “baicuru” (EAF), com propriedades antimicrobianas já conhecidas. EAF foi caracterizada por UHPLC pela presença de samarangeninas A e B ($12,10\% \pm 0,07\%$ e $21,05\% \pm 0,44\%$, respectivamente) e epigallocatequina-3-*O*-galato ($13,44\% \pm 0,27\%$). Aspectos físico-químicos das MLB foram caracterizados quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, eficiência de aprisionamento, liberação de EAF e mucoadesão. Além disso, a influência das micropartículas carregadas com EAF foi realizada sobre a potencial influência na viabilidade da célula KB bucal humana, adesão de *P. gingivalis* a células KB, atividade das gingipaínas e formação de biofilme de *P. gingivalis*. Em geral, todas as MLB testadas apresentaram forte adesão à mucosa da bochecha suína ($93,1\% \pm 4,2\%$ em 30 min de teste), associada à uma liberação prolongada de EAF (até $16,5\% \pm 0,8\%$ em 24 h). A pré-incubação de células KB com MLB ($25 \mu\text{g/mL}$) resultou em até $93\% \pm 2\%$ de redução da taxa de infecção por *P. gingivalis*. A atividade diminuída dos fatores de virulência específicos de *P. gingivalis* lisina- e arginina-gingipaínas proteases por MLB foi confirmada. MLB diminuiu a formação de biofilme desta bactéria ($97\% \pm 2\%$ a $60 \mu\text{g/mL}$). Os resultados deste estudo comprovam a atividade promissora das micropartículas de baicuru contendo EAF para a prevenção da recorrência bacteriana na periodontite.

Palavras-chave: *Limonium brasiliense*, *Porphyromonas gingivalis*, micropartícula, gingipaína.

ABSTRACT

FERNANDA PILATTI DA SILVA, 2022. Microstructured polymeric system containing *Limonium brasiliense* as a strategy to prevent bacterial recurrence of *Porphyromonas gingivalis*. PhD's Project, Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 94p.

Periodontal diseases are a global oral health problem affecting almost 10% of the global population. *Porphyromonas gingivalis* is one of the main bacteria involved in initiation and progression of inflammatory processes as a result of the action of the cysteine proteases lysin- and arginine-gingipain. Surelase/polycarbophil microparticles (MLB) containing a lyophilized proanthocyanidin-enriched fraction from the rhizomes of *Limonium brasiliense*, traditionally named as “baicuru” (EAF), with known antimicrobial properties, were manufactured. EAF was characterized by UHPLC by the presence of samarangenins A and B ($12.10\% \pm 0.07\%$ and $21.05\% \pm 0.44\%$, respectively) and epigallocatechin-3-*O*-gallate ($13.44\% \pm 0.27\%$). Physicochemical aspects of MLB were characterized concerning particle size, zeta potential, entrapment efficiency, EAF release, and mucoadhesion. Additionally, influence of the EAF-loaded microparticles were performed concerning potential influence on viability of human buccal KB cell, *P. gingivalis* adhesion to KB cells, gingipain activity and *P. gingivalis* biofilm formation. In general, all MLB tested showed strong adhesion to porcine cheek mucosa ($93.1\% \pm 4.2\%$ in 30 min test), associated with a prolonged release of EAF (up to $16.5\% \pm 0.8\%$ in 24 h). Preincubation of KB cells with MLB ($25 \mu\text{g/mL}$) resulted in up to $93\% \pm 2\%$ reduced infection rate by *P. gingivalis*. Decreased activity of the Pg-specific virulence factors lysin- and arginine-gingipain proteases by MLB were confirmed. MLB decreased biofilm formation of this bacteria ($97\% \pm 2\%$ at $60 \mu\text{g/mL}$). Results from this study prove the promising activity of MLB containing baicuru for the prevention of bacterial recurrence in periodontitis.

Keywords: *Limonium brasiliense*, *Porphyromonas gingivalis*, microparticle, gingipain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da periodontite, de dentes e gengivas saudáveis à periodontite avançada. Fonte: South Coast Dental [24].	26
Figura 2. A) Micrografia eletrônica de varredura mostrando uma célula de <i>Porphyromonas gingivalis</i> W50 com um grande número de vesículas de membrana externa (OMVs) segundo Gui, Dashper, Slakeski, Chen and Reynolds [37]. B) Cultura de <i>Porphyromonas gingivalis</i> em ágar sangue, evidenciando a pigmentação negra segundo Bélanger, Rodrigues and Progulske-Fox [38].....	28
Figura 3. A) Parede celular de bactéria Gram-negativa, apresentando a presença dos lipopolissacarídeos e lipídeo A na membrana externa; B) Lipídeos A específicos de <i>Porphyromonas gingivalis</i> . Adaptado de Fujimoto, Shimoyama, Saeki, Kitayama, Kasamatsu, Tsutsui and Fukase [41].	29
Figura 4. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão das fímbrias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa 381) apontadas com setas (aumento 8.100 ×). Fonte: adaptado de Masayuki Tokuda [51].	31
Figura 5. Células KB observadas em aumento de 40x por microscopia óptica. Fonte: Fernanda Pilatti, 2018.....	33
Figura 6. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células KB infectadas por <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277. A infecção foi realizada por uma incubação de 4 horas de aproximadamente 100:1 BCR seguidas de fixação e coloração com rutênio vermelho. Abreviações: i: bactéria internalizadas à célula KB; e: bactéria extracelular com camada extra de revestimento de rutênio vermelho. Fonte: Duncan, Nakao, Skobe and Xie [61]. Barra de 1 µm.....	33
Figura 7. Subarbusto de <i>Limonium brasiliense</i> (A) partes aéreas e raízes (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata das raízes. Fonte: Blainski [94].	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares definidas pela Academia Americana de Periodontia e pela Federação Europeia de Periodontia [63].	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Percentual

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

µL – Microlitros

CIM – Concentração Mínima Inibitória

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP – Desvio Padrão

EE – Eficiência de Aprisionamento

FAE – Fração Acetato de Etila

g – Grama

h – Hora

LPS – Lipopolissacarídeos

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MLB – Micropartículas contendo fração acetato de etila de *Limonium brasiliense*

mV – Milivolt

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

OMS – Organização Mundial de Saúde

OMVs – Vesículas de Membrana Externa

PALAFITO – Laboratório de Biologia Farmacêutica

RPM – Rotações Por Minuto

TFA – Ácido Trifluoroacético

TLR – receptores *Toll-Like*

UEM – Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	Doença periodontal.....	25
2.2	Microbiologia da doença periodontal.....	26
2.2.1	Complexos microbianos na periodontite	27
2.2.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	28
2.3	Classificações da periodontite	34
2.4	Relatos de associações da periodontite com outras doenças	34
2.5	Tratamento periodontal	36
2.1	Droga vegetal	38
2.1.1	Família Plumbaginaceae Juss.	38
2.1.2	Gênero <i>Limonium</i>	38
2.1.3	<i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	39
2.2	Associação de drogas vegetais com matriz polimérica	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	Geral.....	45
3.2	Específicos	45
	REFERÊNCIAS	46
	CAPÍTULO 1: SISTEMA POLIMÉRICO MICROESTRUTURADO CONTENDO EXTRATO ENRIQUECIDO COM PROANTOCIANIDINAS DOS RIZOMAS DE <i>LIMONIUM BRASILIENSE</i> COMO ESTRATÉGIA PARA PREVENIR A RECORRÊNCIA DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	52
	INTRODUCTION	56
	RESULTS AND DISCUSSION	57
	MATERIALS AND METHODS	63
	Plant material	64
	Identification of the constituents by UHPLC	64
	Experimental design and preparation of microparticles.....	65
	Morphology and particles size analysis.....	66
	Zeta potential analysis.....	66
	SA, SB and EGCG content and entrapment efficiency (UHPLC)	66
	In vitro drug release profile investigation	66
	Ex vivo mucoadhesion evaluation.....	67
	Cell culture	67
	Determination of cell viability	68
	Bacterial growth conditions and fluorescent labelling	68
	Antibacterial susceptibility test	68
	Influence of microparticles on adhesion of <i>Pg</i> to KB cells according [33]	69

Influence of microparticles on gingipain activity.....	69
Biofilm assay: Cristal violet staining	70
Statistical analysis	70
SUPPORTING INFORMATION.....	70
ACKNOWLEDGMENTS	71
CONFLICT OF INTEREST	71
AUTHORS' CONTRIBUTIONS.....	71
REFERENCES.....	72
FIGURES AND TABLE.....	75
SUPPORTING INFORMATION.....	82
CAPÍTULO 2: USO DE POLÍMERO MICROESTRUTURADO COM <i>LIMONIUM BRASILIENSE</i> E RESPECTIVAS MICROPARTÍCULAS.....	87
AGRADECIMENTOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais incluem um amplo espectro de respostas inflamatórias associadas à presença de bactérias formadoras de biofilme, as quais ficam aderidas na superfície dentária acometendo o tecido de sustentação e suporte dos dentes. Dentre estas doenças, destacam-se a gengivite e a periodontite que afetam cerca de 743 milhões de pessoas, sendo a periodontite a patologia mais relevante [1]. No Brasil, segundo Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (2010), apenas 17,8% da população adulta apresenta saúde bucal [2].

Além do processo inflamatório causado pela periodontite, há muitas evidências que esta condição favorece o agravamento de outras doenças sistêmicas como a COVID-19 [3], doença de Alzheimer [4], doenças cardiovasculares [5], diabetes [6], artrite reumatoide [7], câncer de boca [8], aterosclerose [9], doença hepática gordurosa não alcoólica [10], dentre outras.

A doença periodontal está associada a um complexo bacteriano, chamado de complexo vermelho, que envolve *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia*, sendo a primeira uma das principais bactérias envolvidas neste processo inflamatório. Esta bactéria é um cocobacilo, Gram-negativo, anaeróbio estrito, imóvel e formador de biofilme [11]. É considerada uma bactéria fastidiosa, por ter uma exigência nutricional complexa, que tem como um de seus fatores de virulência as fímbrias adesivas e proteases capazes de degradar imunoglobulinas do organismo hospedeiro estando diretamente associada à periodontite [12,13].

Atualmente, a prevenção da periodontite é inteiramente fomentada em uma boa higiene bucal e visitas regulares ao dentista. Já o tratamento da doença periodontal geralmente consiste na redução da massa bacteriana pela raspagem do biofilme formado nos dentes. Uma série de medicamentos alopáticos estão disponíveis para o tratamento adjunto da periodontite, como o cloridrato de benzidamida, clindamicina, amoxicilina, metronidazol e outros. Contudo, a administração prolongada destes fármacos pode levar à resistência bacteriana [14,15] sugerindo, portanto, a necessidade da exploração de medicamentos fitoterápicos que atuam pelo sinergismo de inúmeras substâncias que possam apresentar propriedades antibacterianas efetivas.

A associação de ativos vegetais à tecnologia farmacêutica permite o desenvolvimento de estruturas matriciais capazes de potencializar a eficiência terapêutica das substâncias vegetais. Dentre as vantagens destas associações, destaca-se o desenvolvimento de micropartículas poliméricas que favorecem a possibilidade de aumentar a eficiência terapêutica dos compostos, mascarar efeitos indesejados dos extratos, como sua palatabilidade, além de apresentar um sistema de liberação prolongada que favorece a adesão dos pacientes ao tratamento [16,17].

Dentre a diversidade de espécies vegetais, *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, conhecido popularmente como “baicuru”, tem destaque na literatura científica devido à variabilidade de atividades biológicas encontradas para os extratos e substâncias isoladas dos rizomas desta planta. O “baicuru” é utilizado popularmente como antisséptico em infecções genito-urinárias e regulador de períodos menstruais. Alguns estudos comprovaram seu potencial bacteriostático, antioxidante, antiviral e anti-inflamatório, além disso, uma avaliação da toxicidade aguda e segurança a longo prazo do extrato bruto

desta planta em camundongos e ratos mostrou baixa toxicidade [18-21]. Acredita-se que parte dessas atividades esteja relacionada à presença de taninos que possuem a capacidade de captação de radicais livres e antioxidante, complexação com íons metálicos, além de possuírem a habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos [20].

Considerando a aplicabilidade dos constituintes derivados de plantas medicinais com enfoque antimicrobiano, este trabalho foi desenvolvido visando explorar o potencial tecnológico da associação de micropartículas poliméricas mucoadesiva com extrato semipurificado e liofilizado de *L. brasiliense* como alternativa para a prevenção e recorrência bacteriana na periodontite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença periodontal

As doenças periodontais são altamente prevalentes na população, atingindo principalmente adultos e idosos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que, em 2020, a doença periodontal severa afetava quase 10% da população global, o que poderia resultar na perda do dente, tornando-se a patologia oral crônica mais relevante do mundo [1]. Além disso, os resultados apresentados pelo Ministério da Saúde do Brasil (Projeto SB Brasil 2010, 2010) indicam que o percentual de indivíduos com doença periodontal foi de 37% para a idade de 12 anos, 49,1% para a faixa etária de 15 a 19 anos, 82,2% para adultos de 35 a 44 anos e 98,2% para idosos de 65 a 74 anos, o que pode ser considerado um grave problema para a saúde brasileira e mundial [2].

A título de curiosidade, nos anos 2000, a doença periodontal foi eleita como “*doença mais comum não contagiosa*”, pelo famoso e reconhecido internacionalmente, livro de recordes *Guinness World Records*. Já naquela época, foi descrito que a doença afetava aproximadamente 75% da população dos EUA, de 60-90 % das crianças em idade escolar, além da maioria dos adultos nos países industrializados [22].

Acredita-se que a etiologia da doença venha de um sinergismo de diversos fatores como higienização oral inadequada somado à fatores de risco específicos de cada paciente. Dentre esses fatores, destacam-se a diabetes mellitus, doenças genéticas, gravidez, idade avançada, hereditariedade e tabagismo [23]. Ainda, uma má higienização dental favorece o acúmulo de micro-organismos anaeróbios ligados à progressão da doença periodontal que acabam por colonizar cada vez mais profundamente o periodonto e iniciar o processo de agressão ao tecido local [23].

Em geral, o diagnóstico da doença periodontal deriva de uma associação de achados como inspeção visual por profissional qualificado, sondagem periodontal e avaliação radiográfica dos níveis ósseos do dente em questão [23]. A Figura 1 apresenta uma ilustração básica para compreensão do avanço da doença periodontal a partir de uma gengiva saudável até a apresentação estrutural dos dentes e periodonto na periodontite avançada.

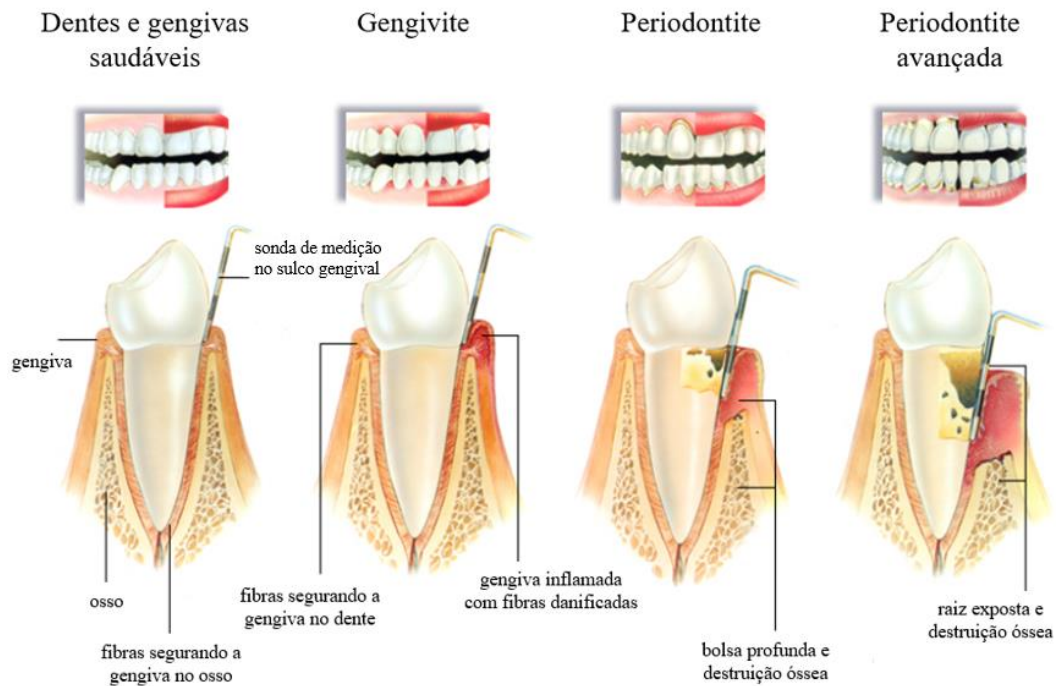


Figura 1. Estágios da periodontite, de dentes e gengivas saudáveis à periodontite avançada. Fonte: South Coast Dental [24].

2.2 Microbiologia da doença periodontal

Estima-se que na microbiota oral sejam encontrados micro-organismos em mais de 700 espécies diferentes com subespécies distintas [25,26]. Dentre aqueles envolvidos no agravamento da periodontite, destacam-se as bactérias do complexo vermelho, *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* [27] que estão frequentemente associadas à doença periodontal.

Segundo How, Song and Chan [11], *P. gingivalis* foi detectada na placa subgengival de 85,75% de pacientes com periodontite, sendo destacada, portanto, como uma das principais bactérias envolvidas na doença periodontal. Neste sentido, surge a teoria de que esta bactéria é o “*keystone pathogen*”, ou seja, trata-se *P. gingivalis* como o patógeno chave envolvido na periodontite, pois mesmo que presente em uma densidade celular reduzida, é capaz de induzir periodontite ao remodelar a comunidade bacteriana comensal para promover um estado de disbiose¹ [28], levando ao desenvolvimento da doença [29].

Em geral, a presença de bactérias resultaria numa resposta imune do hospedeiro que fomentaria na eliminação do patógeno. Entretanto, no caso da doença periodontal, a ação contrária é favorecida, uma vez que o exsudado inflamatório promove uma ambientação rica em nutrientes que o torna favorável ao crescimento de outras espécies bacterianas. Neste caso, a presença de *P. gingivalis*, já descrita como um patógeno-chave de disbiose, favorece uma sinergia polimicrobiana crítica para o agravamento da doença periodontal [28].

¹ É o desequilíbrio entre as espécies microbianas e seu ambiente impulsionado pela perturbação da imunidade do hospedeiro pela presença de *P. gingivalis*, mesmo quando presente em baixa concentração.

El-Awady, de Sousa Rabelo, Meghil, Rajendran, Elashiry, Stadler, Foz, Susin, Romito and Arce [26] comprovaram por testes *in vitro* e *ex vivo* que *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum* e *P. gingivalis* atuam sinergicamente favorecendo sua coabitação dentro do biofilme pelo impulsionamento do crescimento microbiano e invasão celular. Mais especificamente, foi descrito que *F. nucleatum* ativa o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) nas células do hospedeiro, auxiliando a fixação de *P. gingivalis*. Com isso, ocorre uma ativação positiva dos fatores de virulência desta bactéria, desencadeando a interrupção da resposta imune local.

Além dos micro-organismos citados, diversos outros estão envolvidos no agravamento da periodontite, cada um deles atuando em favor da coabitação bacteriana que proporciona melhor atividade e desenvolvimento destes patógenos.

2.2.1 Complexos microbianos na periodontite

A periodontite é uma doença que resulta da transição de colonização por bactérias subgingivais Gram-positivas para bactérias Gram-negativas [30]. Usualmente, a comunidade científica divide a presença das populações bacterianas de acordo com a progressão da doença periodontal.

Dentre os complexos microbianos comumente descritos, o complexo laranja apresenta-se ainda em um estágio pouco agressivo da periodontite, contando normalmente com a presença de espécies anaeróbias como *Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *F. polymorphum*, *Prevotella intermedia*, *P. micros*, *P. nigrescens* e *Streptococcus constellatus* [27,31].

Após uma progressão da doença e início do desenvolvimento do biofilme bacteriano, as populações microbianas são reclassificadas para o complexo vermelho que consiste na presença de *T. denticola*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* [27]. Vale destacar que raramente as bactérias do complexo vermelho são encontradas na ausência do complexo laranja. Ademais, a presença destas bactérias também foi demonstrada por estarem diretamente associadas ao aumento da profundidade da bolsa periodontal e ao aumento de sangramento local [27,32].

Citada como uma das principais bactérias do complexo vermelho, *T. denticola* apresenta-se como espiroqueta, anaeróbia, Gram-negativa longa, fina, semelhante a um saca-rolhas. Tem como principais fatores de virulência a produção de enzimas hidrolíticas (colagenases, hialuronidases, proteases, etc), presença de proteína da bainha externa principal, entre outros [32].

Outra das principais bactérias descritas, *T. forsythia*, é um bacilo fusiforme, anaeróbio, Gram-negativo e imóvel. Apresenta como principais fatores de virulência a capa S que favorece a adesão à bactéria do hospedeiro, presença de proteínas de superfície que atuam na resposta inflamatória e destruição tecidual, presença de lipoproteínas de superfície, liberação de proteases, dentre outros [33].

A literatura científica descreve a bactéria *P. gingivalis* como o “*keystone pathogen*” da periodontite grave graças ao potencial de virulência associado a este micro-organismo pela sua ampla

variação genética interespecie, relacionada a um importante papel no agravamento de lesões periodontais. Ademais, pesquisas envolvendo *P. gingivalis* têm atraído particular atenção pois alguns estudos indicaram melhores resultados no tratamento da doença quando este micro-organismo não pôde mais ser detectado no acompanhamento de caso [34].

2.2.2 *Porphyromonas gingivalis*

Pertencente à família Bacteroidaceae, *P. gingivalis* (Figura 2A) é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbico estrito, imóvel, capsulado, não formador de esporos e produtor de biofilme [13,35]. É caracterizado por ser um micro-organismo fastidioso, dotado de fímbrias adesivas e produtor de proteases capazes de degradar imunoglobulinas do organismo hospedeiro [35]. Quando colonizado em ágar-sangue, exibe colônias inicialmente de cor clara e com o passar das horas, as colônias escurecem até atingirem cor preta (Figura 1B), característico da produção protoheme, um pigmento de cor negra, que ocorre devido à utilização metabólica de determinados componentes do meio [36].

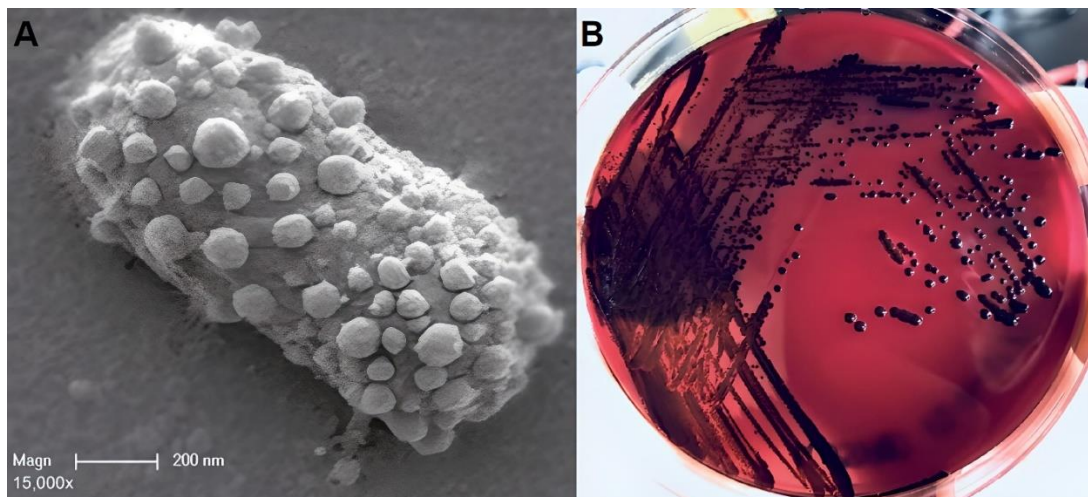


Figura 2. A) Micrografia eletrônica de varredura mostrando uma célula de *Porphyromonas gingivalis* W50 com um grande número de vesículas de membrana externa (OMVs) segundo Gui, Dashper, Slakeski, Chen and Reynolds [37]. B) Cultura de *Porphyromonas gingivalis* em ágar sangue, evidenciando a pigmentação negra segundo Bélanger, Rodrigues and Progulsk-Fox [38].

Considerada um patógeno oportunista, *P. gingivalis* pode colonizar grande parte das superfícies orais, sendo capaz de liberar toxinas prejudicando as células das mucosas. A colonização na mucosa subgingival é facilitada pelas adesinas presentes neste micro-organismo, em especial, as fímbrias e gingipaínas, que permitem a adesão tanto às células do hospedeiro, quanto às proteínas salivares, além da adesão à outras bactérias da mesma ou de outras espécies, participando do desenvolvimento da estrutura do biofilme bacteriano. Este processo acarreta na destruição dos tecidos seguidos de respostas imunológicas e inflamatórias [12,39].

Em geral, os fatores de virulência de *P. gingivalis* atuam especialmente na coagregação, formação de biofilme e disbiose microbiana oral. Além disso, podem atuar por oportunismo agindo diretamente sobre outras bactérias ou induzindo um ambiente ideal para sua propagação.

2.2.2.1 Fatores de virulência de *P. gingivalis*

Os fatores de virulência das bactérias são aquelas estruturas capazes de “enganar” a resposta imune do hospedeiro, podendo causar graves infecções. Em termos gerais, no caso de *P. gingivalis*, este feito pode agravar-se, por exemplo, por meio da indução de apoptose de linfócitos T e macrófagos que promovem uma resposta de citocinas pró-inflamatórias que exercem um papel importante na patogenia da doença periodontal. O estímulo da liberação das citocinas intensifica a resposta inflamatória que aumenta a produção de enzimas proteolíticas que estimulam a degradação do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar [34].

A Figura 3A mostra os lipopolissacarídeos (LPS), também conhecidos por endotoxinas, presentes na parede celular das bactérias Gram-negativas. Os LPS conferem integridade estrutural a estes micro-organismos e caracterizam uma das atividades patogênicas de *P. gingivalis*. Esta molécula, bem como já descreve seu nome, é composta por uma estrutura lipídica, um polissacarídeo e um antígeno². A porção lipídica, conhecida como “lipídeo A”³ [11], varia de acordo com as diferentes espécies bacterianas e determina o potencial imunestimulador da espécie em questão [11,40]. Na Figura 3B estão dispostas diferentes estruturas de lipídeo A que podem ser encontradas nos LPS de *P. gingivalis*.

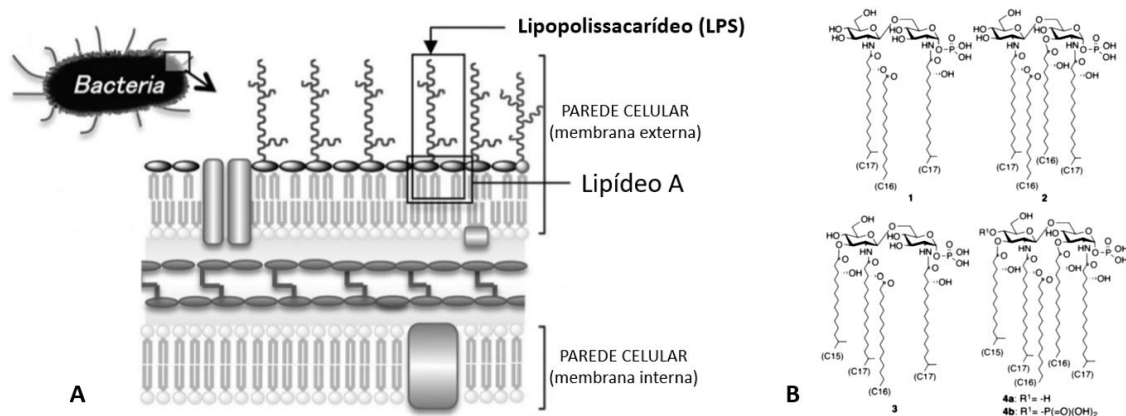


Figura 3. A) Parede celular de bactéria Gram-negativa, apresentando a presença dos lipopolissacarídeos e lipídeo A na membrana externa; B) Lipídeos A específicos de *Porphyromonas gingivalis*. Adaptado de Fujimoto, Shimoyama, Saeki, Kitayama, Kasamatsu, Tsutsui and Fukase [41].

² Estruturas ligadas à região central do LPS, chamadas de *O*-polissacarídeos ou *O*-antígenos, responsáveis por evadir do sistema imunológico, particularmente, o sistema complemento do hospedeiro.

³ É geralmente composto por um dímero de glucosamina ligado a cadeias acilo por ligações éster ou amida.

Porphyromonas gingivalis é descrita por liberar grandes quantidades de vesículas da membrana externa contendo LPS que podem penetrar no tecido periodontal e assim participar da resposta inata destrutiva do hospedeiro. Em síntese, os LPS são estruturas passíveis de serem reconhecidas pelas células fagocíticas do corpo humano, como por exemplo os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Estas células, ao reconhecerem a presença da bactéria patogênica através das LPS, induzem a cascata de sinalização imunológica que por consequência induz a inflamação e a produção de citocinas pró-inflamatórias, que em teoria, agiriam a favor do corpo humano pela eliminação do patógeno invasor. Entretanto, um estímulo excessivo de produção destas citocinas pode levar à casos graves como a sepse, que pode resultar em falência de múltiplos órgãos caso não haja intervenção clínica [40,42].

Além destas estruturas, *P. gingivalis* apresenta filamentos em sua superfície que se projetam a partir da membrana externa, as chamadas fímbrias (ou pili). Estas estruturas são conhecidas por favorecerem a motilidade bacteriana, formação de biofilme, adesão da bactéria às células hospedeiras e consequentemente a invasão celular. As fímbrias de *P. gingivalis* possuem a capacidade de se ligar aos tecidos e células do hospedeiro por meio de substratos orais, como proteínas e glicoproteínas ricas em células epiteliais orais, estaterinas, fibrinogênio, fibronectina, lactoferrina e prolina, além de outras bactérias encontradas na cavidade oral [43,44].

Porphyromonas gingivalis expressa dois tipos de fímbrias: as curtas que consistem em uma subunidade da proteína Mfa codificadas pelo gene *mfa1* e as longas que são compostas por uma subunidade proteica denominada FimA codificada pelo gene *fimA* [44,45]. No que diz respeito ao seu tamanho estrutural, as fímbrias curtas podem variar de 0,06 a 0,5 µm de comprimento [44], enquanto as fímbrias longas variam de 0,3 a 3 µm, com 5 nm de largura que facilita sua adesão aos tecidos do hospedeiro. Além disso, estas estruturas ligam-se às integrinas⁴, inibindo a resposta pró-inflamatória mediada pelo receptor *Toll-like*⁵ (TLR), facilitando a invasão das células do hospedeiro pela *P. gingivalis* [46].

Conforme já descrito anteriormente, as fímbrias tem um importante papel na ligação de *P. gingivalis* com outras bactérias presentes na cavidade oral, como *Actinomyces viscosus* [47], *Streptococcus oralis* [48], *Streptococcus gordonii* [49], *T. denticola* [50], tornando-as estruturas de extrema importância para a formação do biofilme bacteriano. Apesar de serem estruturalmente semelhantes, as fímbrias longas e curtas têm diferentes funções na formação do biofilme. Em geral, as fímbrias longas promovem a formação inicial do biofilme e as fímbrias curtas atuam como supressores e reguladores durante o desenvolvimento do complexo, mais especificamente, a atuação de ambas parece manter uma infecção persistente e o além de contribuir no agravamento da inflamação pela expressão de citocinas, como as citocinas IL-1, IL-6 e TNF-α [44].

⁴ Proteínas de superfície celular mediadoras de interações intercelulares e com a matriz extracelular.

⁵ Proteínas transmembrânicas, presentes nas células de defesa do hospedeiro, capazes de reconhecer estruturas microbianas e gerar sinais, para produção de citocinas pró-inflamatórias para a ativação da resposta imune.

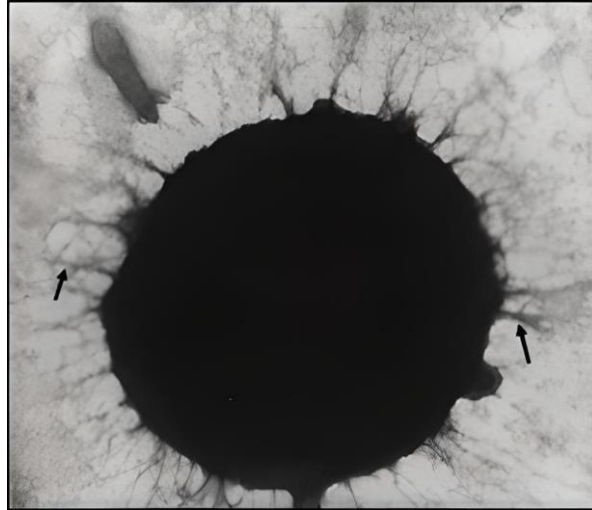


Figura 4. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão das fímbrias de *Porphyromonas gingivalis* (cepa 381) apontadas com setas (aumento 8.100 x). Fonte: adaptado de Masayuki Tokuda [51].

Além dos fatores de virulência descritos, sabe-se que um dos principais agravantes da progressão da doença periodontal é a capacidade que a maioria das cepas de *P. gingivalis* tem de secretar enzimas hidrolíticas, proteolíticas e lipolíticas juntamente com metabólitos tóxicos. Geralmente essas enzimas são liberadas próximas das células hospedeiras, transportadas da membrana externa da bactéria para as vesículas da membrana externa durante o crescimento bacteriano. Um dos principais tipos de enzimas, as proteases, estão fortemente implicadas na progressão da doença periodontal [52].

As gingipaínas são proteases de cisteína⁶ [53] extracelulares secretadas por *P. gingivalis*, considerada um dos principais fatores de virulência dessa bactéria. A literatura descreve que as gingipaínas são capazes de clivar três tipos de proteínas da superfície de diferentes células: proteínas imunorreguladoras, proteínas de adesão e proteínas de sinalização. Essas ações resultam em processos como evasão imune por *P. gingivalis* pelo desprendimento das células hospedeiras e consequente degradação tecidual, assim como pela desregulação de vias regulatórias e de sinalização na gengiva [54].

Existem dois tipos de gingipaínas, comumente referidas como gingipaína R dependente de arginina (Rgp) e gingipaína K dependente de lisina (Kgp). Quando em atividade conjunta, essas enzimas são responsáveis por pelo menos 85% da atividade proteolítica extracelular de *P. gingivalis*. A Rgp foi subdividida em RgpA e RgpB baseado na sua estrutura [53,55,56].

Um estudo *in vivo* em camundongos realizado por Pathirana, O'Brien-Simpson, Visvanathan, Hamilton and Reynolds [57] mostrou a ordem em que as proteinases contribuem para a virulência de *P. gingivalis* no modelo de periodontite sendo: $Kgp \geq RgpB \gg RgpA$.

Dentre as virulências causadas pelas gingipaínas, destacam-se principalmente seu poder de proteolisar um amplo repertório de substratos. De maneira geral, elas participam da erosão dos tecidos

⁶ Família da cisteína proteinase ou “tripsina-like” são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, mais especificamente, ocorre uma clivagem de polipeptídeos no C-terminal após o resíduo de arginina ou lisina.

periodontais, da degradação das proteínas de ligação ao ferro e favorecem a destruição da barreira epitelial permitindo a penetração da bactéria nos tecidos subepiteliais. Além disso, ao clivar proteínas de defesa de superfície, estas interferem na resposta do sistema imunológico do hospedeiro, facilitando a evasão dos mecanismos de defesa [46].

Ademais, as gingipaínas mostraram influência direta na formação de biofilme bacteriano, uma vez que a presença dessas estruturas em *P. gingivalis* tem papel importante na comunicação da bactéria com outras espécies do biofilme, além de contribuírem na modulação da resposta inflamatória do tecido colonizado do hospedeiro [56].

Bao e colaboradores [58] avaliaram um modelo de biofilme composto por dez bactérias subgingivais. Os resultados mostraram que a Rgp potencializou o crescimento de *T. denticola* e a Kgp promoveu o acúmulo dessa bactéria no biofilme. Esse efeito sinérgico comprovou-se benéfico tanto para sobrevivência quanto para a virulência das colônias de biofilme, favorecendo a formação do complexo bacteriano vermelho. Além disso, tanto RgpA quanto Kgp participam da adesão de *P. gingivalis* às células epiteliais orais, agregando-se com outras espécies bacterianas.

Somado à virulência das gingipaínas propriamente ditas, *P. gingivalis* produz vesículas de membrana externa (OMVs) que contêm outros fatores de virulência como LPS e gingipaínas. As OMVs mediam a coagregação bacteriana, favorecem a formação de biofilme, além de contribuírem para a interação com o hospedeiro e colonização de *P. gingivalis*. Por essa razão, *P. gingivalis* libera parte dos seus fatores de virulência nos tecidos periodontais na forma de OMVs [46,59].

É curioso destacar, além dos fatores de virulência já apresentados, *P. gingivalis* é conhecida na literatura científica por ser capaz de ligar-se às hemoglobinas para aquisição de heme⁷ [61]. Inicialmente, esta bactéria se adere às hemácias, liberando proteases que quebram os glóbulos vermelhos, resultando na liberação de hemoglobina. Esta é capturada na superfície celular e digerida pelas gingipaínas para produzir heme, que é transportado para dentro da célula por meio de receptores de heme/hemoglobina. A presença de heme excedente na superfície da célula resulta em pigmentação preta possível de ser visualizada em colônias ágar sangue desta bactéria. Este processo de lise das hemoglobinas para captura de ferro, também é caracterizada como fator de virulência dessa bactéria [46,60].

Também é válido destacar que algumas cepas desta bactéria são produtoras de cápsula. Ainda, foi descrito que aquelas cepas se mostraram muito mais virulentas que as não produtoras dessa estrutura protetora. Essa estrutura é associada à fuga deste micro-organismo da defesa imunológica do hospedeiro, promovendo assim sua sobrevivência nas células hospedeiras [59].

2.2.2.2 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 x células KB

Duncan, Nakao, Skobe and Xie [61] avaliaram a invasão de células KB (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), uma linha celular epitelial humana, por certas bactérias periodontais

⁷ O termo heme refere-se à um átomo de ferro (Fe (II)) centralmente contido em uma protoporfirina IX (anel orgânico heterocíclico).

patogênicas para que pudessem ser utilizadas em ensaios *in vitro*. Foram testadas diferentes cepas de *P. gingivalis* e ficou comprovada a invasão dessas células epiteliais por *P. gingivalis* ATCC 33277, medida por ensaio e confirmada por microscopia eletrônica de transmissão.

Dados do estudo também mostraram que o poder de adesão de outra cepa de *P. gingivalis*, W50, isolado clínico, em teoria mais virulenta que a ATCC 33277, mostrou adesão inferior às células KB.

A Figura 6 registrada por Duncan, Nakao, Skobe and Xie [61] mostra micrografias comprovando que a bactéria foi capaz de invadir as células epiteliais testadas. Dessa forma, entende-se que a associação de *P. gingivalis* ATCC 33277 e células epiteliais KB suprimem as necessidades de avaliações *in vitro*.

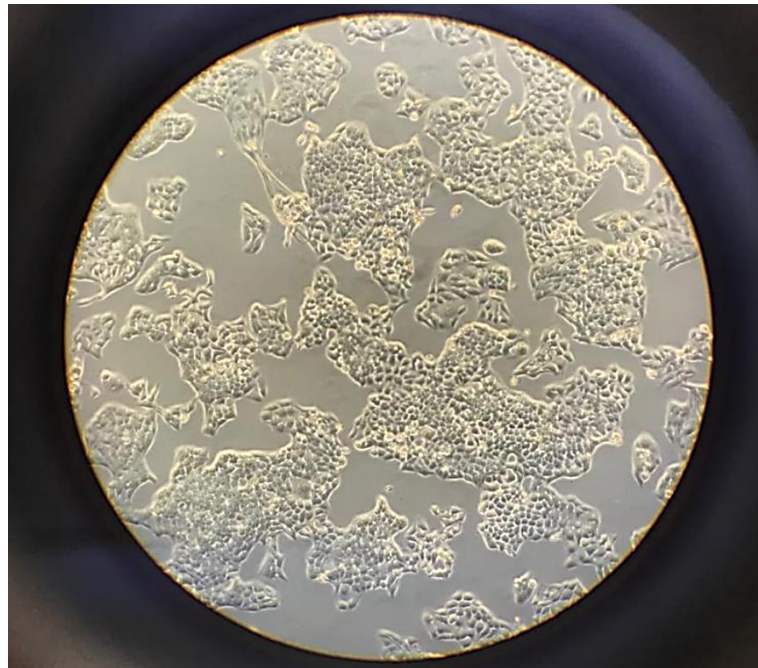


Figura 5. Células KB observadas em aumento de 40x por microscopia óptica. Fonte: Fernanda Pilatti, 2018.

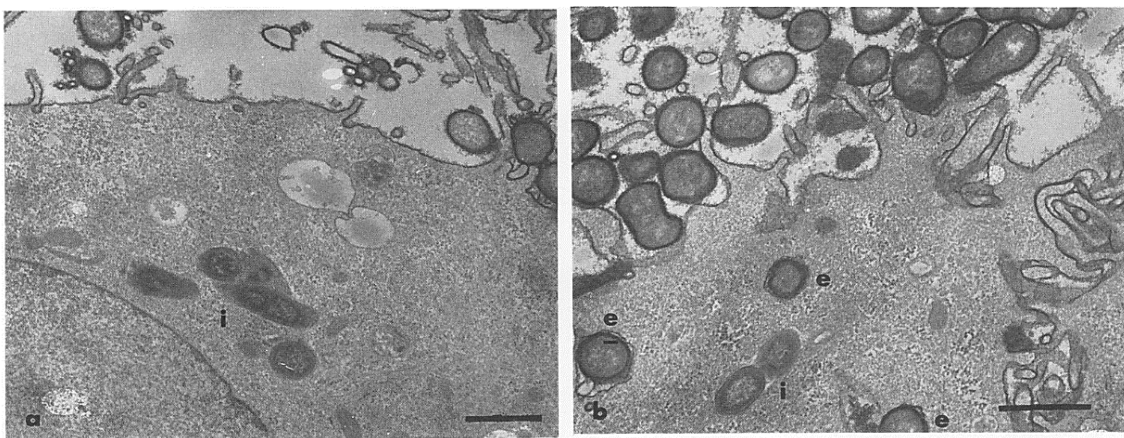


Figura 6. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células KB infectadas por *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. A infecção foi realizada por uma incubação de 4 horas de aproximadamente 100:1 BCR seguidas de fixação e coloração com rutênio vermelho. Abreviações: i: bactéria internalizadas à célula KB; e: bactéria extracelular com camada extra de revestimento de rutênio vermelho. Fonte: Duncan, Nakao, Skobe and Xie [61]. Barra de 1 μ m.

2.3 Classificações da periodontite

Em novembro de 2017, em Chicago (EUA), aconteceu um *Workshop* mundial realizado pela Academia Americana de Periodontia e pela Federação Europeia de Periodontia, em que ficou estabelecida uma nova Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares, que revogava a classificação vigente até então (Classificação Periodontal de 1999) [62,63].

A busca pela atualização da classificação deu-se visando uma padronização do diagnóstico e tratamento de doenças periodontais. Resumidamente, foram divididas três grandes categorias de doenças e condições periodontais apresentadas na Tabela 1. Ainda, os termos periodontite crônica ou agressiva caíram em desuso e outras três formas de periodontite foram definidas: “periodontite”, “periodontite necrosante” e “periodontite como manifestação de doenças sistêmicas” [62].

Tabela 1. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares definidas pela Academia Americana de Periodontia e pela Federação Europeia de Periodontia [63].

Grupos	Subgrupos
Saúde Periodontal, Condições e Doenças Gengivais	Saúde periodontal
	Gengivite induzida pelo biofilme
	Doenças gengivais não induzidas pelo biofilme
Periodontite	Doenças Periodontais Necrosantes
	Periodontite
	Periodontite como Manifestação de Doenças Sistêmicas
Outras Condições que Afetam o Periodonto	Manifestações Periodontais de Doenças ou Condições Sistêmicas (Doenças ou Condições Sistêmicas que Afetam os Tecidos Periodontais de Suporte)
	Abscessos Periodontais e Lesões Endoperiodontais
	Condições e Deformidades Mucogengivais
	Forças Oclusais Traumáticas
	Fatores Relacionados ao Dente e às Próteses

2.4 Relatos de associações da periodontite com outras doenças

Além da periodontite, outras doenças tem sido frequentemente relatadas por apresentarem sinais de agravamento quando associadas à essa comorbidade.

Perricone, Ceccarelli, Matteo, Di Carlo, Bogdanos, Lucchetti, Pilloni, Valesini, Polimeni and Conti [64] testaram *in vivo* possível relação patogênica de *P. gingivalis* com artrite reumatoide. Os dados obtidos demonstraram que a artrite foi desencadeada ou piorada em animais infectados pela bactéria. Acredita-se que *P. gingivalis* induziu a citrulinação de proteínas e a produção de autoanticorpos em indivíduos geneticamente suscetíveis, levando a danos ósseos e inflamação sistêmica.

Liccardo, Cannavo, Spagnuolo, Ferrara, Cittadini, Rengo and Rengo [6] apresentaram uma revisão mostrando que indivíduos com periodontite apresentam maior risco de eventos cardiovasculares,

incluindo acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca. O mecanismo detalhado que conecta essas duas patologias ainda não foi esclarecido. Entretanto, os autores não deixaram claro qual o principal mecanismo que explica essa relação. Farrugia, Stafford, Potempa, Wilkinson, Chen, Murdoch and Widziolak [5] também apresentaram dados *in vitro* que fornece um mecanismo molecular pelo qual a *P. gingivalis* pode contribuir para a doença cardiovascular.

Herrera, Molina, Buhlin and Klinge [65] publicaram uma revisão narrativa muito completa relacionando doenças periodontais e associação com doença aterosclerótica. Apesar dos mecanismos não estarem claramente demonstrados, acredita-se que as doenças periodontais e ateroscleróticas compartilham vários mecanismos de inflamação sistêmica em comum. Neste sentido, entende-se que a formação de ateromas pode ocorrer por uma via direta mediada por bacteremia e uma via indireta pelo aumento dos níveis de mediadores inflamatórios sistêmicos.

Kamer, Craig, Niederman, Fortea and de Leon [66] realizaram uma revisão bibliográfica a fim de avaliar a associação entre a periodontite e a doença de Alzheimer. As principais evidências sugerem que a inflamação crônica e a disbiose microbiana são fatores de risco para essa doença. Entende-se que a disbiose bacteriana favorece um aumento do infiltrado inflamatório local e produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Devido à estágios mais avançados da periodontite, há facilidade do acesso de bactérias anaeróbias e citocinas na corrente sanguínea e conseqüentemente à circulação sistêmica e ao tecido nervoso, facilitando assim os efeitos periodontais no cérebro. Após atingirem esse local, esses fatores acabam por estimular mais ainda uma resposta de fase aguda no fígado, aumentando mais ainda a inflamação local. Os dados encontrados por estes autores corroboram com os estudos de Costa, de Araújo, da Rocha Alves, da Silva, dos Santos Calderon, Borges, de Aquino Martins, de Vasconcelos Gurgel and Lins [4].

Nwizu, Wactawski-Wende and Genco [67] revisaram estudos epidemiológicos buscando correlacionar a doença periodontal e o risco de desenvolver certos tipos de câncer. Parece que os riscos ocorrem principalmente próximos à cavidade oral (esôfago, trato gastrointestinal superior), por já terem sido relatados estudos que indicam que a doença periodontal está ligada a um risco aumentado de incidência e mortalidade por câncer do trato gastrointestinal superior, por exemplo. Apesar de ainda não ter sido relatado qual mecanismo pelo qual o câncer pode se desenvolver entre indivíduos com doença periodontal, acredita-se que há uma associação da inflamação crônica, envolvendo citocinas inflamatórias, como contribuintes para a suscetibilidade individual à gravidade da doença.

Gomes-Filho, Cruz, Trindade, Passos-Soares, Carvalho-Filho, Figueiredo, Lyrio, Hintz, Pereira and Scannapieco [68] validaram em estudo de metanálise associações entre periodontite e asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e pneumonia. Ocorre que as bactérias anaeróbias presentes na bolsa periodontal podem ser aspiradas para a via aérea inferior, gerando uma sensibilização epitelial e uma disseminação de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas. Estas acabam por aumentar a carga inflamatória, agravando o estágio da doença e reduzindo o fluxo de ar.

Thomas, Abraham, Joseph, Dommy and Shahna [69] também descreveram que a Covid-19 favorece o aumento da liberação de citocinas das células hospedeiras, semelhante ao perfil de expressão de citocinas da periodontite. Com isso, comprovaram que a periodontite é significativamente associada ao aumento do risco de complicações da Covid-19, incluindo admissão na UTI, necessidade de ventilação assistida e morte.

2.5 Tratamento periodontal

Em termos gerais, a periodontite tem como principal tratamento a raspagem e eventualmente o uso adjunto de antibióticos [14,15]. Sabe-se que os efeitos de antibioticoterapias sistêmicas fomentam a incidência da resistência bacteriana, dado que, nos últimos 20 anos, a incidência de bactérias orais multirresistentes tem aumentado significativamente.

O contato direto entre pessoa-pessoa é a maneira mais comum de transmissão de *P. gingivalis* [70] e para o tratamento da doença, além da utilização de antibióticos sistêmicos, em casos mais graves, é necessária intervenção cirúrgica. Isto ocorre pois, por vezes, a antibioticoterapia por si só não é totalmente eficaz por conta da formação de biofilme bacteriano que demanda uma maior concentração de fármaco para inibir o crescimento microbiano, sendo assim, além do tratamento sistêmico é necessária raspagem local para eliminar a bactéria [71]. No entanto, em casos de não tratamento de periodontite, ou tratamento inadequado, pode ocorrer perda dos tecidos de suporte dos dentes e dos próprios dentes [72].

Todavia, em geral, o tratamento periodontal utiliza uma gama de intervenções terapêuticas e até mesmo técnicas de mudança de comportamento, como: cessação do tabagismo, intervenção dietética, instruções de higiene oral personalizadas, raspagem subgingival para remover placa e cálculo, farmacoterapia local e sistêmica e em últimos casos, cirurgias. Por se tratar de uma doença crônica, a doença periodontal exige uma série de intervenções terapêuticas visando obtenção de melhores resultados para o paciente [73].

Ainda, para que seja possível a realização adequada de higiene oral, é necessário que se faça uma remoção de placa e o cálculo pré-existentes com profissional qualificado.

Por vezes, a intervenção química também é interessante, de acordo com o grau de agressão da doença periodontal. Em casos mais leves, o uso de cremes dentais e enxaguantes bucais parece mostrar resultados positivos no controle e redução de placa bacteriana. Dentre a variedade de agentes antimicrobianos, os dentifrícios contendo clorexidina ou triclosan com copolímero e enxaguantes bucais contendo clorexidina ou óleos essenciais tenderam a apresentar maior redução de placa [73].

Para a maioria dos casos, a terapia mecânica por si só pode resultar em sucesso terapêutico a longo prazo, no entanto, para casos mais avançados, há pacientes que podem não responder tão

adequadamente. Isso pode acontecer quando há dificuldade na realização do desbridamento⁸ mecânico, falha da terapia mecânica em alguns patógenos-chave, falha na eliminação de biofilmes não dentários, dentre outras situações. Nestes casos, opta-se pela associação às terapias farmacológicas baseadas em antimicrobianos (locais ou sistêmicos) e probióticos⁹ [73].

Dentre os antibióticos locais mais utilizados estão as fibras de tetraciclina, doxiciclina de liberação sustentada e cloridrato de minociclina. Clorexidina (antimicrobiano) e metronidazol foram citados por terem menor eficácia. Ademais, a antibioticoterapia local pareceu ter mais aceitação dos pacientes especialmente por apresentarem menores reações adversas [73].

A antibioticoterapia sistêmica, quando necessária, é realizada associada à raspagem. Os antibióticos mais utilizados são amoxicilina mais metronidazol, ciprofloxacino mais metronidazol, metronidazol ou azitromicina, sendo esse último menos eficaz, mas com menores efeitos adversos [73].

Entretanto, o uso de antibióticos sistêmicos deve ser desencorajado para evitar surgimento de resistência antimicrobiana. Deve-se prezar especialmente por uma avaliação microbiológica antes de prescrever este tipo de tratamento [72].

Conrads, Klomp, Deng, Wenzler, Braun and Abdelbary [74] testaram suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* de 29 cepas de *P. gingivalis* contra nove antibióticos (amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, clindamicina, metronidazol, moxifloxacina, doxiciclina, azitromicina, imipenem e cefoxitina) pelo teste de concentração mínima inibitória (CIM). Os resultados obtidos apontaram que os únicos antibióticos que podem falhar no tratamento de periodontite associadas às cepas de *P. gingivalis* testadas são clindamicina, macrolídeos e tetraciclina por conta de genes de resistência específicos, bem como fluoroquinolonas.

Logo, surge a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos de origem vegetal, associados a estratégias de liberação modificada que permitam a utilização de menores concentrações do ativo farmacêutico durante o tratamento, e que sejam capazes de atingir a faixa terapêutica ideal para a prevenção e/ou tratamento frente às bactérias orais causadoras de doenças [75].

Assim, a terapia utilizando agentes antibacterianos derivados de plantas medicinais em sistemas de liberação modificada, surge em meio a esse cenário por consistir no aprisionamento de pequenas concentrações de extrato de *L. brasiliense*, espécie com atividade antiporphyromonas já comprovada, em sistemas poliméricos capazes de fornecer uma liberação prolongada do extrato e específica no sítio alvo.

⁸ Remoção de placa e cálculo subgingival e/ou supragingival que impede a realização de uma avaliação (Associação Americana de Odontologia).

⁹ Foi realizado um estudo randomizado duplo-cego e concluiu-se que o uso de suplementos dietéticos antioxidantes, como frutas, em conjunto com a terapia periodontal não cirúrgica, mostrou reduções da profundidade inicial da bolsa periodontal, além de melhorias adicionais no sangramento à sondagem e nos escores de placa.

2.1 Droga vegetal

2.1.1 Família Plumbaginaceae Juss.

A família Plumbaginaceae está no grupo principal das Angiospermas, apresentando 24 gêneros de plantas e 635 nomes de espécies aceitos segundo *The Plant List* [76].

É dividida em duas subfamílias, Plumbaginoideae e Limonioideae, informação confirmada por resultados filogenéticos baseados em amostragem taxonômica e moleculares [78]. Os gêneros mais ricos em espécies desta família são *Limonium*, *Acantolimon* e *Armeria*, todos pertencentes à subfamília Limonioideae, compreendendo aproximadamente 85-90% de todas as espécies desse grupo [77].

Quase todos os membros de Plumbaginaceae são perenes, com longos ciclos de vida, podendo ser encontrados como arbustos com folhas bem desenvolvidas, subarbustos ou ervas. Esta família consiste principalmente de arbustos perenes, subarbustos e ervas que crescem principalmente em habitats áridos e salinos [78,79].

Sua fitoquímica é caracterizada pela ocorrência de vários flavonoides *O*-metilados e antocianidinas. Ocorre também a presença de plumbagina da naftoquinona nas raízes de todos os membros de Plumbaginoideae, enquanto os taninos hidrolisáveis (com base no ácido elágico) e taninos condensados (com base na leucodelphinidina) ocorrem apenas nas raízes da subfamília Staticoideae [78]. A ampla presença de taninos condensados em angiospermas e gimnospermas foi também reportada por Kumbar, Peram, Kugaji, Shah, Patil, Muddapur and Bhat [80].

Obviamente, cada espécie apresentará diferentes composições químicas, no entanto, quercetina 3-ramnosídeo, miricetina 3-ramnosídeo, malvidina 3,5-diglucosídeo, são flavonoides de ocorrência comum nas Plumbaginaceae. Além do mais, após os estudos de Harborne [81] foi possível demonstrar pela análise de amostras representativas a maior ocorrência de plumbagina nas raízes, de quercetina, miricetina, miricetina 5-metil éter, miricetina 7-metil éter, leucodelphinidina e plumbagina nas folhas e de delphinidina, pulchelinidina e azaleatina nas pétalas, respectivamente.

Várias espécies de Plumbaginaceae são usadas como ornamentos de jardinagem e algumas tem usos medicinais populares e tem atraído interesses de pesquisadores visando associar suas composições químicas com suas atividades biológicas, como é o caso do *Limonium spp.*

2.1.2 Gênero Limonium

O gênero *Limonium* é aquele de maior biodiversidade da família Plumbaginaceae, podendo apresentar até 600 espécies. É considerado o gênero mais rico em espécies endêmicas nas floras vasculares da Espanha, Grécia e Itália [82].

As espécies deste gênero são principalmente arbustos e ervas perenes que crescem em áreas costeiras, de praias arenosas a falésias marítimas [77]. Por crescerem predominantemente em solos salinos e ricos em metais, foram classificadas como halófitas facultativas [83].

Devido ao seu ambiente típico e às condições extremas as quais são submetidas, as halófitas apresentam diferentes adaptações para manter a homeostase normal. Esta é uma das razões pelas quais podem biossintetizar diferentes compostos, como antioxidantes, antimicrobianos e agentes anticancerígenos [84].

Várias espécies de *Limonium* foram relatadas por seu uso popular, como por exemplo, *Limonium sinense* (Girard) Kuntze utilizado como remédio para bronquite, diarreia, febre, hemorragias, hemorroidas, hepatite [85,86], *Limonium wrightii* (Hance) Kuntze para tratamento de febre e artrite [87], além de *L. brasiliense* utilizado na medicina popular como antisséptico em infecções geniturinárias, adstringente e depurativo, e especialmente para tratar cólicas menstruais e regular os períodos menstruais [19,88].

Dentre a vasta gama de espécies de *Limonium*, as propriedades de *L. brasiliense* foram material de interesse para este estudo.

2.1.3 *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze

Anteriormente nomeado como *Statice brasiliensis* Boiss., *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, ficou popularmente conhecido como baicuru ou guaicuru [81]. É uma espécie comumente encontrada em zonas litorâneas, especialmente em terrenos baixos, sujeitos à maré, na costa do Brasil (Região Sul e Rio de Janeiro), Uruguai e Argentina [89,90]. Taxonomicamente, pertence à divisão Angiospermae (Anthophyta), classe Dicotyledoneae, ordem Plumbaginales, sendo uma das 163 espécies que compõe a família Plumbaginaceae [21,91].

Limonium brasiliense (Figura 7) é classificado como um subarbusto herbáceo, perene, rizomatoso, apresentando flores e glândulas capazes de eliminar sal. É uma erva que varia de 30 a 50 cm de altura, sua folhagem é basilar, peciolada e disposta em rosetas, com flores pequenas de cálice avermelhado com corola azulada [19]. Esta planta é capaz de viver em ambientes de reduzida qualidade agrícola, revelando grande potencial adaptativo [92]. É extensamente utilizada e adequada para a obtenção de mudas, uma vez que a propagação de suas sementes ocorre em grande parte das plantas cultivadas, sendo, portanto, a sementeira uma forma natural de reprodução desta espécie [93].



Figura 7. Subarabusto de *Limonium brasiliense* (A) partes aéreas e raízes (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata das raízes. Fonte: Blainski [94].

2.1.3.1 Composição química

Quanto à composição química, nos rizomas do baicuru destacam-se a presença de taninos condensados e hidrolisáveis (ácido gálico, epigalocatequina, catequina, epigalocatequina-3-*O*-galato, samarangeninas A e B), ácidos egálico e hidroxicinâmico, sitosterol (β -sitosterol), cumarinas, sacarose, saponinas triterpênicas, benzoato de benzila e flavonoides (flavona, isoflavona, flavonona, leucoantocianinas, miricetina-3-*O*- α -ramnopiranosídeo) [19,95,96].

Apesar de anteriormente acreditar-se que o farmacógeno desta espécie encontrava-se nas raízes de *L. brasiliense*, Antonelli-Ushirobira, Blainski, Fernandes, Moura-Costa, Costa, Campos-Shimada, Salgueiro-Pagadigorría, Kaneshima, Becker, Leite-Mello and Mello [21] mostraram que esses encontram-se nos rizomas desta planta, podendo ser confundido com uma raiz tuberosa principalmente por ficar em contato com solo salino [97].

2.1.3.2 Atividades biológicas

São comprovados numerosos potenciais terapêuticos desta espécie, os quais eram, anteriormente, tratados no uso popular como antisséptico em infecções genito-urinárias e regulador de períodos menstruais. Posto isso, pesquisadores comprovaram experimentalmente que *L. brasiliense* apresenta diversas atividades biológicas, sendo comprovadas as atividades bacteriostática, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, antiadesiva, antagonista de bradicinina e ocitocina e antioxidante, atividades essas que podem ser justificadas pela presença de taninos hidrolisáveis, saponinas, cumarinas entre outros compostos [18-20,95,98-101].

Algumas pesquisas, ainda, avaliaram a atividade biológica de diferentes extratos de *L. brasiliense* contra uma variedade de cepas bacterianas, apresentando resultados importantes que podem incentivar a continuidade de estudos associados à atividade antimicrobiana, ou mesmo à outras aplicações importantes como avaliação da atividade anti-inflamatória.

Moura, Schenkel, Simoes, Santos and Schapoval [19] testaram o extrato etanólico das raízes de *L. brasiliense in vivo* e detectaram ação anti-inflamatória pelo método de avaliação em edema na pata de rato, induzido por carragenina. Os resultados apresentaram ação anti-inflamatória, inibindo o edema com administração de 250 mg/mL do extrato testado via intraperitoneal. O potencial anti-inflamatório foi atribuído pela presença de taninos, dentre os quais, o ácido gálico, especificamente, não apresentou efeitos significativos.

Blainski, Gionco, Oliveira, Andrade, Scarminio, Silva, Lopes and Mello [20] avaliaram a potencial atividade antibacteriana de extratos de rizoma de *L. brasiliense* contra estirpes bacterianas. O extrato bruto e suas frações de acetato de etila foram testados contra *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VREfm), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). As bactérias Gram-positivas foram susceptíveis à inibição do crescimento bacteriano, em especial a fração de acetato de etila de extratos ternários de água:acetona:etanol e metanol:acetona:etanol contra, respectivamente, VREfm (MIC = 19 µg/mL) e MRSA (MIC = 39 µg/mL). Por outro lado, observou-se atividade moderada das frações de acetato de etila dos extratos primário (exceto água), secundário e ternário (MIC = 625 µg/mL) contra o KPC, podendo concluir que os resultados mostraram o potencial antibacteriano de extratos de *L. brasiliense* contra bactérias Gram-positivas multirresistentes, como VREfm e MRSA.

de Oliveira Caleare, Hensel, Mello, Pinha, Panizzon, Lechtenberg, Petereit and Nakamura [18] testaram o extrato de acetona:água dos rizomas de *L. brasiliense* contra a adesão da bactéria *P. gingivalis* em células KB humanas, além de avaliarem a possível inibição da atividade proteolítica de gingipaínas (fator de virulência da bactéria). Os autores mostraram que os extratos em concentração menor ou igual à 100 µg/mL não modificaram a fisiologia celular das células KB e na concentração de 100 µg/mL foi capaz de reduzir significativamente a adesão de *P. gingivalis* às células KB em cerca de 80%. Além disso, foi comprovado que o extrato na concentração de 20 µg/mL reduziu a atividade proteolítica da Rgp gingipaína (específica de arginina) em cerca de 75%, concluindo, portanto, que os extratos testados de *L. brasiliense* são capazes de inibir especificamente os fatores de permeabilidade de *P. gingivalis*.

Apesar do uso de produtos naturais ser amplamente conhecido e utilizado há milhares de anos, estudos envolvendo a associação de plantas medicinais com tecnologia farmacêutica precisam ser mais amplamente explorados. Desta forma, pode-se unir a comprovada atividade antiadesiva de *L. brasiliense* com o desenvolvimento de micropartículas mucoadesivas que permitam a liberação prolongada deste ativo no sítio de ação, garantindo maior eficácia do tratamento da periodontite causada por *P. gingivalis*.

2.1.3.3 Toxicidade

Apesar dos extratos dessa planta apresentarem uma diversidade de ações biológicas, pouco se sabe sobre a citotoxicidade destes compostos. Assim, Moura, Schenkel, Simoes, Santos and Schapoval [19] avaliaram pelo teste de toxicidade excessiva, um grupo de camundongos Swiss machos que receberam uma dose de 2,0 g/kg do extrato etanólico das raízes de *L. brasiliense*, administrada via endovenosa. Dentre as doses administradas no grupo, esta mostrou-se excessivamente tóxica.

No entanto, anos mais tarde, Antonelli-Ushirobira, Blainski, Fernandes, Moura-Costa, Costa, Campos-Shimada, Salgueiro-Pagadigorria, Kaneshima, Becker, Leite-Mello and Mello [21] avaliaram a segurança da administração *in vivo* do extrato bruto dos rizomas de *L. brasiliense* por meio de testes de toxicidade aguda, prolongada e hepática, além da mutagenicidade. Ratos Wistar machos e fêmeas foram tratados oralmente com doses diárias do extrato (50, 100 ou 200 mg/kg) por 90 dias. A avaliação da toxicidade aguda não indicou alteração clínica aparente nos animais, sendo que a DL₅₀ foi de 4,8 g/kg. A avaliação após 90 dias de administração mostrou que o extrato bruto, mesmo em doses mais elevadas do que a dose terapêutica, mostrou ser seguro e o teste de micronúcleos demonstrou baixo potencial mutagênico para o mesmo extrato. Portanto, os autores concluíram que o tratamento com extrato bruto de *L. brasiliense* causou baixa ou nenhuma toxicidade nas concentrações e métodos avaliados.

de Oliveira Caleare, Hensel, Mello, Pinha, Panizzon, Lechtenberg, Petereit and Nakamura [18] avaliaram o efeito citotóxico do extrato bruto dos rizomas de *L. brasiliense* em células KB após 2 e 24 h de incubação. O extrato não mostrou influência na viabilidade celular das células KB em uma faixa de concentração de 50 a 500 µg/mL ao longo de um intervalo de incubação de 2 h. No entanto, a incubação prolongada por 24 h resultou na redução significativa da atividade da desidrogenase mitocondrial em concentrações mais elevadas. Uma toxicidade elevada também foi observada para clorexidina, medicamento padrão-ouro no tratamento clínico da periodontite.

2.2 Associação de drogas vegetais com matriz polimérica

Visando aumentar o tempo de permanência da droga vegetal no local de ação e, conseqüentemente, melhorar o desempenho terapêutico do ativo fornecendo uma liberação prolongada, surge a possibilidade do desenvolvimento de estruturas poliméricas associadas a fitoterápicos.

O desenvolvimento de micropartículas poliméricas pode favorecer uma liberação sustentada e gradual do ativo por um período prolongado, entretanto, a utilização de outras importantes tecnologias farmacêuticas não podem ser descartadas. A simples encapsulação do ativo não garante que ele seja capaz de sustentar um efeito terapêutico, pois as matrizes podem ser eliminadas do local de absorção antes mesmo de iniciar a liberação do fármaco [102].

Assim, nos casos onde há a intenção de se obter uma ação do fármaco nos tecidos bucais, há possibilidade de desenvolvimento de matrizes poliméricas mucoadesivas, que manterão a liberação do

ativo no sítio de ação desejado. Desse modo, a forma farmacêutica mucoadesiva garantirá tanto o propósito de sustentar a liberação quanto a incidência da forma farmacêutica no local de absorção [102].

Além disso, a administração bucal do fármaco apresenta vantagens em relação à administração oral, pois garante maior biodisponibilidade, uma vez que não há passagem pelo metabolismo hepático, bem como o ambiente variável do trato gastrointestinal [103].

Portanto, dentre os diversos polímeros que podem ser utilizados para aplicação farmacêutica, destacam-se o poliacarbofil e a etilcelulose¹⁰, que são polímeros aniônicos, insolúveis em água, capazes de mascarar características organolépticas indesejáveis de drogas vegetais [102] e que garantem a formação de matriz polimérica ideal para desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo fitoterápicos de liberação prolongada.¹¹

¹⁰ A etilcelulose pode ser encontrada no mercado associada à uma combinação de substâncias. O Surelease® é uma suspensão que tem a etilcelulose como o polímero controlador de velocidade para liberação do fármaco. Além disso, fornece características formadoras de filme, plastificante e estabilizantes, além de ser bastante utilizado para aplicações de revestimento de liberação sustentada e mascaramento de sabor (104. Colorcon. Surelease® Ethylcellulose Dispersion. In; 2022).

¹¹ Referências bibliográficas da revisão de literatura encontram-se em REFERÊNCIAS, página 4646.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um sistema polimérico mucoadesivo contendo extrato liofilizado de *L. brasiliense* a partir de um *design* fatorial visando obter micropartículas adesivas. Caracterizar e avaliar seus efeitos *in vitro* e *ex vivo*, a fim de utilizá-las como adjuvantes no tratamento da periodontite.

3.2 Específicos

- Realizar planejamento estatístico $2^3 + 1$ ponto central visando obter a formulação ideal para compor as micropartículas;
- Avaliar e caracterizar as principais substâncias presentes na fração acetato de etila liofilizada de *L. brasiliense* por cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC);
- Obter micropartículas a partir dos polímeros Surelease® e policarbofil, pela técnica de *spray dryer*;
- Avaliar o tamanho médio das micropartículas por micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a eficiência de aprisionamento do extrato nas micropartículas por UHPLC;
- Realizar análise morfológica por MEV;
- Avaliar o potencial zeta das micropartículas;
- Realizar o teste de citotoxicidade das micropartículas em células KB (ATCC CCL-17);
- Avaliar a atividade antiadesiva e protetiva das micropartículas frente à *P. gingivalis* (ATCC 33277);
- Demonstrar a ausência de toxicidade das micropartículas contra a bactéria por teste de disco difusão;
- Evidenciar a inibição das gingipaínas pelas micropartículas;
- Demonstrar o poder de inibição das micropartículas contra a da formação de biofilme por *P. gingivalis*.

Dessa forma a tese foi organizada em dois capítulos em forma de artigo e patente, a saber:

Capítulo 1: Microstructured polymer system containing proanthocyanidin-enriched extract from the rhizomes of *Limonium brasiliense* as a strategy to prevent bacterial recurrence of *Porphyromonas gingivalis*

Capítulo 2: Patente BR 10 2020 023491 9 – Uso de polímero microestruturado com *Limonium brasiliense* e respectivas micropartículas

REFERÊNCIAS¹²

1. Organization WH. Oral Health. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>;
2. Ministério da Saúde (BR) PSB. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Available: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf; cited: 28 de Janeiro de 2021.2021;
3. Utomo H, Wijaksana IKE, Prahasanti C. *Porphyromonas gingivalis* in Periodontitis: A Forgotten Enemy Behind COVID-19 Pandemic. *Dental Hypotheses* 2021; 12: 28
4. Costa MJF, de Araújo IDT, da Rocha Alves L, da Silva RL, dos Santos Calderon P, Borges BCD, de Aquino Martins ARL, de Vasconcelos Gurgel BC, Lins RDAU. Relationship of *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer's Disease: A Systematic Review Of Pre-Clinical Studies. *Clinical Oral Investigations* 2021, DOI: 10.1007/s00784-020-03764-w: 1-10
5. Farrugia C, Stafford GP, Potempa J, Wilkinson RN, Chen Y, Murdoch C, Widziolek M. Mechanisms Of Vascular Damage by Systemic Dissemination of the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *The FEBS Journal* 2021; 288: 1479-1495
6. Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, Rengo G. Periodontal Disease: A Risk Factor For Diabetes and Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20: 1414
7. Rodríguez-Lozano B, González-Febles J, Garnier-Rodríguez JL, Dadlani S, Bustabad-Reyes S, Sanz M, Sánchez-Alonso F, Sánchez-Piedra C, González-Dávila E, Díaz-González F. Association Between Severity of Periodontitis and Clinical Activity in Rheumatoid Arthritis Patients: A Case–Control Study. *Arthritis Research & Therapy* 2019; 21: 1-12
8. Shin Y, Choung H, Lee J, Rhyu I, Kim H. Association of Periodontitis with Oral Cancer: A Case-Control Study. *Journal of Dental Research* 2019; 98: 526-533
9. Suh JS, Kim S, Boström KI, Wang C-Y, Kim RH, Park N-H. Periodontitis-Induced Systemic Inflammation Exacerbates Atherosclerosis Partly Via Endothelial–Mesenchymal Transition in Mice. *International Journal of Oral Science* 2019; 11: 1-12
10. Akinkugbe AA, Slade GD, Barritt AS, Cole SR, Offenbacher S, Petersmann A, Kocher T, Lerch MM, Mayerle J, Völzke H. Periodontitis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease, A Population-Based Cohort Investigation in the Study of Health in Pomerania. *Journal of Clinical Periodontology* 2017; 44: 1077-1087
11. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen Below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 53
12. Davies JR, Kad T, Neilands J, Kinnby B, Prgomet Z, Bengtsson T, Khalaf H, Svensäter G. Polymicrobial Synergy Stimulates *Porphyromonas gingivalis* Survival and Gingipain Expression in a Multi-Species Subgingival Community. *BMC Oral Health* 2021; 21: 1-12
13. Alhogail S, Suaifan GA, Bizzarro S, Kaman WE, Bikker FJ, Weber K, Cialla-May D, Popp J, Zourob M. On Site Visual Detection of *Porphyromonas gingivalis* Related Periodontitis by Using a Magnetic-Nanobead Based Assay for Gingipains Protease Biomarkers. *Microchimica Acta* 2018; 185: 149
14. Slots J, Ting M. Systemic Antibiotics in the Treatment of Periodontal Disease. *Periodontology* 2000 2002; 28: 106-176
15. Guentsch A. Antibiotics Against Periodontal Biofilms. *Oral Biofilms* 2021; 29: 119-132
16. Hassan N, Latif S, Afzal H, Abbas N, Naheed S, Khokar R, Shah A. Taste Masking of Levofloxacin by Microparticulate System Using Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2019; 81: 843-850
17. Schwestka J, Stoger E. Microparticles and Nanoparticles from Plants — The Benefits of Bioencapsulation. *Vaccines* 2021; 9: 369
18. de Oliveira Caleare A, Hensel A, Mello JC, Pinha AB, Panizzon GP, Lechtenberg M, Petereit F, Nakamura CV. Flavan-3-ols and Proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* Inhibit the

¹² As referências foram estabelecidas de acordo com as normas da revista “*Planta Medica - Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research*”, ISSN: 0032-0943.

- Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to Epithelial Host Cells by Interaction with Gingipains. *Fitoterapia* 2017; 118: 87-93
19. Moura TFA, Schenkel EP, Simoes CMO, Santos RId, Schapoval EES. Estudos Farmacológicos Preliminares das Raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze-Plumbaginaceae (Baicuru). *Caderno de Farmácia Porto Alegre, RS* 1985; 1: 45-54
 20. Blainski A, Gionco B, Oliveira AG, Andrade G, Scarminio IS, Silva DB, Lopes NP, Mello JCP. Antibacterial Activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) Against Multidrug-Resistant Bacteria Using a Statistical Mixture Design. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 198: 313-323
 21. Antonelli-Ushirobira TM, Blainski A, Fernandes HG, Moura-Costa GF, Costa MA, Campos-Shimada LB, Salgueiro-Pagadigorria CL, Kaneshima EN, Becker TC, Leite-Mello EV, Mello JC. Acute Toxicity and Long-Term Safety Evaluation of the Crude Extract from Rhizomes of *Limonium brasiliense* in Mice and Rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 174: 293-298
 22. Records GW. Commonest Disease Non-Contagious. In. www.guinnessworldrecords.com; 2000
 23. Gasner NS, Schure RS. Periodontal disease. 2020, DOI:
 24. Dental SC. Periodontics. In. *South Coast Dental Specialists: South Coast Dental* 2022
 25. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu W-H, Lakshmanan A, Wade WG. The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology* 2010; 192: 5002-5017
 26. El-Awady A, de Sousa Rabelo M, Meghil MM, Rajendran M, Elashiry M, Stadler AF, Foz AM, Susin C, Romito GA, Arce RM. Polymicrobial Synergy Within Oral Biofilm Promotes Invasion of Dendritic Cells and Survival of Consortia Members. *npj Biofilms and Microbiomes* 2019; 5: 1-12
 27. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 1998; 25: 134-144
 28. Mulhall H, Huck O, Amar S. *Porphyromonas gingivalis*, a Long-Range Pathogen: Systemic Impact and Therapeutic Implications. *Microorganisms* 2020; 8: 869
 29. Zhao X, Liu J, Zhang C, Yu N, Lu Z, Zhang S, Li Y, Li Q, Liu J, Liu D. *Porphyromonas gingivalis* Exacerbates Ulcerative Colitis via *Porphyromonas gingivalis* Peptidylarginine Deiminase. *International Journal of Oral Science* 2021; 13: 1-12
 30. Shaikh HFM, Patil SH, Pangam TS, Rathod KV. Polymicrobial Synergy and Dysbiosis: An Overview. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2018; 22: 101
 31. Socransky SS. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28: 12-55
 32. Mohanty R, Asopa SJ, Joseph MD, Singh B, Rajguru JP, Saidath K, Sharma U. Red Complex: Polymicrobial Conglomerate in Oral Flora: A Review. *Journal of Family Medicine and Primary Care* 2019; 8: 3480
 33. Ramos-Perfecto D. *Tannerella forsythia*: Patógeno Importante en la Periodontitis, Integrante del Complejo Rojo. *Odontología Sanmarquina* 2020; 23: 253-259
 34. Lang JLNP. *Tratado De Periodontia Clínica E Implantologia Oral*. 6ª Edição ed; 2020
 35. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 1999; 20: 168-238
 36. Cunha CSNMd. Identificação de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* Isoladas de Pacientes com Doença Periodontal e Análise das Resistências Antimicrobianas. 2017:
 37. Gui M, Dashper S, Slakeski N, Chen YY, Reynolds E. Spheres of influence: *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles. *Molecular Oral Microbiology* 2016; 31: 365-378
 38. Bélanger M, Rodrigues P, Progulsk-Fox A. Genetic Manipulation of *Porphyromonas gingivalis*. *Current Protocols in Microbiology* 2007; 5: 13C. 12.11-13C. 12.24
 39. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: An Invasive and Evasive Opportunistic Oral Pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 2012; 333: 1-9
 40. Mazgaeen L, Gurung P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21: 379
 41. Fujimoto Y, Shimoyama A, Saeki A, Kitayama N, Kasamatsu C, Tsutsui H, Fukase K. Innate immunomodulation by lipophilic termini of lipopolysaccharide; synthesis of lipid As from *Porphyromonas gingivalis* and other bacteria and their immunomodulative responses. *Molecular BioSystems* 2013; 9: 987-996

42. Nakayama M, Ohara N. Molecular Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-Host Cell Interaction on Periodontal Diseases. Japanese Dental Science Review 2017; 53: 134-140
43. Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its Virulence Factors in Periodontitis. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology 2020; 120: 45-84
44. Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae. Journal of Oral Microbiology 2013; 5: 20265
45. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae in Relation to Microbial Pathogenesis. Journal of Periodontal Research 2004; 39: 136-142
46. Silva IL, Cascales E. Molecular Strategies Underlying *Porphyromonas gingivalis* Virulence. Journal of Molecular Biology 2021; 433: 166836
47. Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* Fimbriae Function in Adhesion to *Actinomyces viscosus*. Journal of Bacteriology 1991; 173: 5266-5274
48. Maeda K, Nagata H, Yamamoto Y, Tanaka M, Tanaka J, Minamino N, Shizukuishi S. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus oralis* Functions as a Coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* Major Fimbriae. Infection and Immunity 2004; 72: 1341-1348
49. Park Y, Simionato MR, Sekiya K, Murakami Y, James D, Chen W, Hackett M, Yoshimura F, Demuth DR, Lamont RJ. Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and Their Role in Coadhesion with *Streptococcus gordonii*. Infection and Immunity 2005; 73: 3983-3989
50. Zhu Y, Dashper SG, Chen Y-Y, Crawford S, Slakeski N, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* Synergistic Polymicrobial Biofilm Development. PLoS One 2013; 8: e71727
51. Tokuda M, Duncan M, Cho M, Kuramitsu H. Role of *Porphyromonas gingivalis* Protease Activity in Colonization of Oral Surfaces. Infection and Immunity 1996; 64: 4067-4073
52. Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* Proteinases as Virulence Factors in the Development of Periodontitis. Journal of Periodontal Research 1997; 32: 120-125
53. de Diego I, Veillard F, Sztukowska MN, Guevara T, Potempa B, Pomowski A, Huntington JA, Potempa J, Gomis-Rüth FX. Structure and mechanism of cysteine peptidase gingipain K (Kgp), a major virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. Journal of Biological Chemistry 2014; 289: 32291-32302
54. Guo Y, Nguyen K-A, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. Periodontology 2000 2010; 54: 15
55. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the Major Cysteine Proteinases and Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis*: Structure, Function and Assembly of Multidomain Protein Complexes. Current Protein and Peptide Science 2003; 4: 397-407
56. Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y. Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. Frontiers in cellular and infection microbiology 2019; 9: 262
57. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Visvanathan K, Hamilton JA, Reynolds EC. Flow Cytometric Analysis of Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to Oral Epithelial Cells. Infection and Immunity 2007; 75: 2484-2492
58. Bao K, Belibasakis GN, Thurnheer T, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Bostanci N. Role of *Porphyromonas gingivalis* Gingipains in Multi-Species Biofilm Formation. BMC Microbiology 2014; 14: 1-8
59. Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, Aduse-Opoku J, Brunner J, Laine ML, Curtis MA, Lewis JP. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. Infection and immunity 2011; 79: 4533-4542
60. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA. Iron and Heme Utilization in *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiology Reviews 2005; 29: 119-144

61. Duncan M, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infection and immunity* 1993; 61: 2260-2265
62. Romito MHBNDFLMGESRLSCCVCPGA. Sistema de Classificação das Doenças e Condições Periodontais; 2019
63. Steffens JP, Marcantonio RAC. Classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares 2018: guia prático e pontos-chave. In: SciELO Brasil; 2018: 189-197
64. Perricone C, Ceccarelli F, Matteo S, Di Carlo G, Bogdanos DP, Lucchetti R, Pilloni A, Valesini G, Polimeni A, Conti F. *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 2019; 31: 517-524
65. Herrera D, Molina A, Buhlin K, Klinge B. Periodontal diseases and association with atherosclerotic disease. *Periodontology* 2000 2020; 83: 66-89
66. Kamer AR, Craig RG, Niederman R, Fortea J, de Leon MJ. Periodontal disease as a possible cause for Alzheimer's disease. *Periodontology* 2000 2020; 83: 242-271
67. Nwizu N, Wactawski-Wende J, Genco RJ. Periodontal disease and cancer: Epidemiologic studies and possible mechanisms. *Periodontology* 2000 2020; 83: 213-233
68. Gomes-Filho IS, Cruz SSd, Trindade SC, Passos-Soares JdS, Carvalho-Filho PC, Figueiredo ACMG, Lyrio AO, Hintz AM, Pereira MG, Scannapieco F. Periodontitis and respiratory diseases: A systematic review with meta-analysis. *Oral diseases* 2020; 26: 439-446
69. Thomas D, Abraham A, Joseph A, Dommy A, Shahna N. Periodontal Disease as a factor in morbidity of Covid-19: A Review. *Oral & Maxillofacial Pathology Journal* 2022, DOI: 44-48
70. Van Winkelhoff A, Boutaga K. Transmission of Periodontal Bacteria and Models of Infection. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32: 16-27
71. Löhr G, Beikler T, Podbielski A, Standar K, Redanz S, Hensel A. 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* 2011; 38: 457-469
72. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, Sculean A, Tonetti MS, Participants EW, Consultants M, Merete Aass A. Treatment of Stage I–III Periodontitis—The EFP S3 Level Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Periodontology* 2020; 47: 4-60
73. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontology* 2000 2017; 75: 152-188
74. Conrads G, Klomp T, Deng D, Wenzler J-S, Braun A, Abdelbary MM. The Antimicrobial Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis*: Genetic Repertoire, Global Phenotype, and Review of the Literature. *Antibiotics* 2021; 10: 1438
75. Bidault P, Chandad F, Grenier D. Risk of Bacterial Resistance Associated with Systemic Antibiotic Therapy in Periodontology. *Journal of the Canadian Dental Association* 2007; 73:
76. Huard-Delcourt A, Menard C, Du L, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, Bonnaure-Mallet M. Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to Epithelial Cells: Analysis by Flow Cytometry. *European Journal of Oral Sciences* 1998; 106: 938-944
77. Koutroumpa K, Theodoridis S, Warren BH, Jiménez A, Celep F, Doğan M, Romeiras MM, Santos-Guerra A, Fernández-Palacios JM, Caujapé-Castells J. An expanded molecular phylogeny of Plumbaginaceae, with emphasis on *Limonium* (sea lavenders): Taxonomic implications and biogeographic considerations. *Ecology and evolution* 2018; 8: 12397-12424
78. Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, El Ghazouani F, Sapin A, Hoffman M, Maincent P, Ubrich N. Effect of the Microencapsulation of Nanoparticles on the Reduction of Burst Release. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 344: 53-61
79. Kubitzki K. Plumbaginaceae. In: *Flowering Plants· Dicotyledons*: Springer; 1993: 523-530
80. Kumbar VM, Peram MR, Kugaji MS, Shah T, Patil SP, Muddapur UM, Bhat KG. Effect of Curcumin on Growth, Biofilm Formation and Virulence Factor Gene Expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology* 2021; 109: 18-28
81. Harborne JB. Comparative Biochemistry of the Flavonoids-IV: Correlations Between Chemistry, Pollen Morphology and Systematics in the Family Plumbaginaceae. *Phytochemistry* 1967; 6: 1415-1428

82. González-Orenga S, Llinares JV, Al Hassan M, Fita A, Collado F, Lisón P, Vicente O, Boscaiu M. Physiological and morphological characterisation of *Limonium* species in their natural habitats: Insights into their abiotic stress responses. *Plant and Soil* 2020; 449: 267-284
83. Erben M. Gattung *Limonium* im sudwestmediterranean Raum. *Mitteilungen* 1978, DOI:
84. Senizza B, Zhang L, Rocchetti G, Zengin G, Ak G, Yıldıztuğay E, Elbasan F, Jugreet S, Mahomoodally MF, Lucini L. Metabolomic profiling and biological properties of six *Limonium* species: novel perspectives for nutraceutical purposes. *Food & Function* 2021; 12: 3443-3454
85. Ding G, Zhang D, Yu Y, Zhao L, Zhang B. Analysis of genetic variability and population structure of the endemic medicinal *Limonium sinense* using molecular markers. *Gene* 2013; 520: 189-193
86. Li H. Plumbaginaceae. *Flora of Taiwan* 1998; 4: 79-82
87. Aniya Y, Miyagi C, Nakandakari A, Kamiya S, Imaizumi N, Ichiba T. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine* 2002; 9: 239-244
88. Antonelli-Ushirobira TM, Blainski A, Fernandes HG, Moura-Costa GF, Costa MA, Campos-Shimada LB, Salgueiro-Pagadigorria CL, Kaneshima EN, Becker TC, Leite-Mello EV. Acute Toxicity and Long-Term Safety Evaluation of the Crude Extract from Rhizomes of *Limonium brasiliense* in Mice and Rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 174: 293-298
89. Lopes M, Stumpf E, Carvalho F. Efeito do Substrato na Reprodução Assexuada de *Limonium brasiliense* (Boiss.) O. Kuntze. *Current Agricultural Science and Technology* 2003; 9:
90. Oliveira Simoes CM, Auler Mentz L, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. *Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul: Brasil*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1986
91. Joly AB. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. 1979, DOI:
92. Cordazzo CV, Seeliger U. *Guia Ilustrado da Vegetação Costeira no Extremo Sul do Brasil*. Rio Grande: Fundacao Universidade do Rio Grande, ISBN 8585042222 Por Icones Plant records Geog 1988; 4: 275
93. KÄMPF AN. *Produção Comercial de Plantas Ornamentais*. Guaíba: Agrolivros 2005; 2:
94. Blainski A. Estudos Farmacognóstico, Desenvolvimento de Metodologia Analítica, Atividade Hormonal, Toxicidade Aguda e Mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) - Baiucuru. *Journal of Ethnopharmacology Universidade Estadual de Maringá*; 2010: 134
95. Murray AP, Rodriguez S, Frontera MA, Tomas MA, Mulet MC. Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift für Naturforschung C* 2004; 59: 477-480
96. Cardoso MLC. *Limonium brasiliensis* (boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento Galênico e Extratos. 1990, DOI:
97. Reitz R. *Plano de Coleção: Herbário "Barbosa Rodrigues"*; 1965
98. Rosito JM, TFAL, Schenkel, EP, Schapoval, EES, Simões, CMO, Santos, RI dos (Eds.). *Contribuição à Análise das Raízes de Limonium brasiliense* (Boiss.). *Simposio de Plantas Medicinais do Brasil (8 : 1984 : Manaus)* 1985, DOI:
99. Jahns R, Crescente A. Ensaio 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* 1976; 44: 105-111
100. Faral-Tello P, Mirazo S, Dutra C, Perez A, Geis-Asteggiant L, Frabasile S, Koncke E, Davyt D, Cavallaro L, Heinzen H, Arbiza J. Cytotoxic, Virucidal, and Antiviral Activity of South American Plant and Algae Extracts. *Scientific World Journal* 2012; 2012: 174837
101. Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK. *Plantas Utilizadas na Medicina Popular Brasileira com Potencial Atividade Antifúngica*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2006; 42: 369-394
102. Alawdi S, Solanki AB. Mucoadhesive Drug Delivery Systems: A Review of Recent Developments. *Journal of Scientific Research in Medical and Biological Sciences* 2021; 2: 50-64

103. Ansari M, Sadarani B, Majumdar A. Optimization and Evaluation of Mucoadhesive Buccal Films Loaded with Resveratrol. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2018; 44: 278-288
104. Colorcon. Surelease® Ethylcellulose Dispersion. In; 2022

CAPÍTULO 1: Sistema polimérico microestruturado contendo extrato enriquecido com proantocianidinas dos rizomas de *Limonium brasiliense* como estratégia para prevenir a recorrência de *Porphyromonas gingivalis*

Este capítulo apresenta o artigo aceito para publicação na *Planta Medica* (FI 3,352) - *Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research* (ISSN: 0032-0943). DOI: 10.1055/a-1858-6898.

RESUMO: Este artigo consiste no desenvolvimento de micropartículas mucoadesivas poliméricas contendo extrato liofilizado de *Limonium brasiliense*, caracterização do extrato por UHPLC, caracterização das micropartículas quanto às suas propriedades físico-químicas e perfil de liberação *in vitro*, avaliação *ex vivo* das micropartículas em bochecha de porco para teste de mucoadesão, avaliação *in vitro* da toxicidade de *Porphyromonas gingivalis*, avaliação do poder de adesão da bactéria às células KB e avaliação do poder de formação de biofilme bacteriano na presença das micropartículas.

CHAPTER 1: Microstructured polymer system containing proanthocyanidin-enriched extract from *Limonium brasiliense* as a prophylaxis strategy to prevent recurrence of *Porphyromonas gingivalis*

This chapter presents the article accepted for publication in *Planta Medica* (IF 3.352) - *Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research* (ISSN: 0032-0943). DOI: 10.1055/a-1858-6898.

ABSTRACT: It presents the development of polymeric mucoadhesive microparticles containing lyophilized extract of *Limonium brasiliense*, extract characterization by UHPLC, characterization of the microparticles regarding their physicochemical properties and *in vitro* release profile, *ex vivo* evaluation of the microparticles in pig cheek for testing of mucoadhesion, *in vitro* evaluation of *Porphyromonas gingivalis* toxicity, evaluation of the bacteria's adhesion power to KB cells and evaluation of the bacterial biofilm formation power in the presence of microparticles.

Microstructured polymer system containing proanthocyanidin-enriched extract from *Limonium brasiliense* as a prophylaxis strategy to prevent recurrence of *Porphyromonas gingivalis*

Fernanda Pilatti^{1,3}, Raquel Isolani¹, Larissa Valone¹, Mariana Nascimento de Paula¹, Daniela Cristina de Medeiros Araújo¹, Sabrina Barbosa de Souza Ferreira¹, Angelo de Oliveira Caleare¹, Marcos Luciano Bruschi¹, Terezinha Aparecida Guedes², Andreas Hensel³, João Carlos Palazzo de Mello¹

Affiliations

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Palafito, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil

²Department of Statistics, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil

³Institute of Pharmaceutical Biology and Phytochemistry, University of Münster, Münster, Germany

Correspondence

João Carlos Palazzo de Mello
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Estadual de Maringá
Colombo Avenue 5790, Block T22
BR-87020-900 Maringá
Brazil
Phone: +55 44 30114627
Fax: +55 44 30115050
mello@uem.br

ABBREVIATIONS

AQF – aqueous fraction

Arg – arginine

BCR – bacteria cell ratio

CE – crude extract

EAF – ethyl-acetate fraction

EE – entrapment efficiency

EGCG – epigallocatechin-3-*O*-gallate

FITC – fluorescein isothiocyanate

Lb – *Limonium brasiliense*

Lys – lysine

MLB – polymeric microparticles, containing lyophilized ethyl acetate fraction from *Limonium brasiliense* rhizomes

Pg – *Porphyromonas gingivalis*

PS – particle size

rt – retention time

SEM – scanning electron microscopy

TLCK – N α -tosyl-L-lysine-chloromethyl-ketone hydrochloride

ZP – zeta potential

ABSTRACT

Periodontal diseases are a global oral health problem affecting almost 10% of the global population. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) is one of the main bacteria involved in initiation and progression of inflammatory processes as a result of the action of the cysteine proteases lysin- and arginine-gingipain. Surelease/polycarbophil microparticles (MLB), containing a lyophilized proanthocyanidin-enriched fraction from the rhizomes of *Limonium brasiliense*, traditionally named as “*baicuru*” (EAF), were manufactured. EAF was characterized by UHPLC by the presence of samarangenins A and B ($12.10\% \pm 0.07\%$ and $21.05\% \pm 0.44\%$, respectively) and epigallocatechin-3-*O*-gallate ($13.44\% \pm 0.27\%$). Physicochemical aspects of MLB were characterized concerning particle size, zeta potential, entrapment efficiency, EAF release, and mucoadhesion. Additionally, influence of the EAF-loaded microparticles were performed concerning potential influence on viability of human buccal KB cell, *Pg* adhesion to KB cells, gingipain activity and *Pg* biofilm formation. In general, all MLB tested showed strong adhesion to porcine cheek mucosa ($93.1\% \pm 4.2\%$ in 30 min test), associated with a prolonged release of EAF (up to $16.5\% \pm 0.8\%$ in 24 h). Preincubation of KB cells with MLB ($25 \mu\text{g/mL}$) resulted in up to $93\% \pm 2\%$ reduced infection rate by *Pg*. Decreased activity of the *Pg*-specific virulence factors lysin- and arginine-gingipain proteases by MLB were confirmed. MLB decreased biofilm formation of *Pg* ($97\% \pm 2\%$ at $60 \mu\text{g/mL}$). Results from this study prove the promising activity of MLB containing EAF microparticles as a prophylaxis strategy to prevent recurrence of *Pg*.

Keywords: *Limonium brasiliense*, Plumbaginaceae, adhesion, gingipain, microparticles, *Porphyromonas gingivalis*.

Introduction

Periodontal diseases include a wide spectrum of inflammatory responses associated with bacterial biofilm formation, affecting the supporting tissue of the teeth. The World Health Organization (WHO – Oral Health) reported that, in 2020, severe periodontal (gum) disease affected almost 10% of the global population, which in many cases results in inflammation and subsequent teeth loss, becoming one of the most relevant chronic oral pathologies in the world [1]. Moreover, the results presented by the Brazilian Ministry of Health (*Ministério da Saúde*, SB Brazil Project 2010) indicate that the percentage of individuals with periodontal disease was 37.0% for the age of 12, 49.1% for the 15 to 19-year-old group, 82.2% for adults aged 35 to 44 years and 98.2% for elderly people aged 65 to 74 years, which can be considered a serious problem for Brazilian and global health [2]. Furthermore, periodontitis is related as a possible cause or worsening of cardiovascular diseases [3], Alzheimer's disease [4], rheumatic diseases [5], and COVID-19 [6, 7].

It is known that periodontal diseases are caused by a pathological complex of bacterial species, better known as the red complex, which comprise *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. These bacteria are known to exert destructive properties to the soft tissue and trigger exaggerated inflammatory responses in immune cells, which in later stages of the disease cause loss of soft and hard tissue structures that support teeth [8]. *Pg* (*Porphyromonadaceae* family) is a coccobacilli, Gram-negative, strict anaerobic, immobile, and biofilm-forming organism with strong proteolytic activity [9]. It is considered a fastidious bacterium with several virulence factors, as e.g., the adhesive fimbriae and the fimbriae-associated proteases, capable of degrading immunoglobulins of the host organism [10]. Among the proteases expressed by *Pg*, the cysteine proteases Arg-gingipain (Rgp) and Lys-gingipain (Kgp) are strongly involved in the colonization of the host, acquisition of nutrients, inactivation of the host's defense mechanisms, and, consequently, in the destruction of tissue [11]. *Pg* is considered the “keystone pathogen” of periodontitis, since even when present in low concentration, it is capable of inducing the disease by remodeling the commensal bacterial community to promote a dysbiotic microbiome [12].

A number of antimicrobial therapies are available for the adjunctive non-surgical treatment of periodontitis, such as chlorhexidine, clindamycin, amoxicillin, and other antimicrobial substances [13]. However, the prolonged administration of these drugs can lead to increased bacterial resistance, destruction of the beneficial oral microflora, and local negative side effects, e.g., discoloration or dysgeusia [14].

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), popularly known as “*baicuru*” or “*guaicuru*” is a plant rich in polyphenols in its rhizomes, especially compounds such as flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins, with the samarangenins being typical tannin-like polyphenols [15]. These compounds have been described to be strong gingipain inhibitors [15-17]. In addition, extracts from *L. brasiliense* have shown antiseptic activity in genitourinary infections [18] and a variety of

studies indicated bacteriostatic, antioxidant, antiviral, and anti-inflammatory potential [15, 19]. Evaluation of the acute toxicity and long-term safety of the crude extract of this plant in mice and rats showed no or low toxicity [20]. It is believed that part of the described antibacterial, antioxidative and anti-inflammatory effects might be related to the presence of tannins that have the ability to capture free radicals, to form complex with metal ions and macromolecules and interact unspecifically in a tannin-like manner with proteins [19]. The association of phytotherapy and pharmaceutical technology can enable the development of products that could increase the therapeutic efficiency of plant-derived extracts or natural products without unwanted side effects [21].

Nowadays, the periodontitis prevention is entirely linked to good oral hygiene and regular visits to the dentist. Periodontal therapy generally depends on the reduction of bacterial biofilm in the infected sites sometimes associated with the use of systemic antibiotic therapy. In this context, the possibility of associating medicinal plant extracts or isolated constituents together with optimized galenical technology, as described on the patent pending BR 10 2020 023491 9 [22] should be considered. The goal of this study is to explore the technological potential of a purified fraction from an acetone-water (7:3, v/v) extract from the rhizomes of *L. brasiliense*, which was entrapped in mucoadhesive microparticles as an alternative in the prevention of periodontitis prophylaxis, since an anti-adhesive power against this bacterium associated with gingipain inhibition suggests a high effectiveness in favor of oral health.

Results and Discussion

From an acetone – water (7:3 v/v) crude extract (CE) from the rhizomes of *L. brasiliense* ethyl acetate soluble compounds were obtained by liquid-liquid extraction, resulting in the fraction EAF. Chromatographic investigations of EAF by UHPLC revealed the presence of samarangenin A and B (SA, SB), as well as epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) and gallic acid as the main compounds (Figure 1). The concentration of the major compounds in EAF were also evaluated by UHPLC, with 12.10% \pm 0.07% of SA, 21.05% \pm 0.44% of SB, and 13.44% \pm 0.27% of EGCG. Identification of the main compounds was performed by comparison with the authentic reference compounds [15].

As previous studies have indicated antivirulent properties of EAF against *Pg* [15], a potential development of an optimized galenical technology for oral use of EAF by incorporation of the extract into mucoadhesive microparticles was to be investigated aiming the development of an innovative and cost-effective alternative for use in the prevention of periodontitis.

Polymeric microparticles (MLB) were developed by using the two different polymers, Surelease, an aqueous ethyl cellulose dispersion in combination with polycarbophil. Both polymers in combination resulted in the formation of a modified release matrix. This matrix system allows the entrapment of EAF by spray drying technology [23].

A total of more than 8,000 particles obtained by spray drying were evaluated by scanning electron microscope (SEM). The systematic combination of independent variables of the factorial design (Table 1) resulted in optimized formulations with a particle size ranging from 3.86 to 5.86 μm . Smallest particles (f1) were obtained with the low factor levels. Whereas, the largest particle obtained (f7) were prepared with the high levels of the microparticle constituents, making the particle size directly proportional to the concentration of the system's constituents.

The high amount of EAF in the microparticles, especially in combination with the higher level of Surelease may have led to the larger droplet size (f3, f7, and f8) during the spray drying process, since they contain higher amounts of solid particles. The opposite also happened with the smallest particles, especially when combined with the lowest levels of Surelease (f1, f2 and f5). The concentration of polycarboxyl does not appear to affect the particle size.

The EAF entrapment efficiency (EE) is specially linked to the concentration of polymers in the system. For EE analysis, the concentrations of SA, SB, and EGCG were quantitatively determined in the microparticles obtained. With the exception of f8, all MLBs entrapped EGCG more efficiently. SB was the second marker that had the highest affinity to the polymeric matrix, finally followed by SA. In general, f4 turned out to be the optimized system that best entrapped the EAF (SA, EGCG and SB EE %: $89.1\% \pm 1.4\%$, $98.4\% \pm 1.5\%$ and $90.3\% \pm 1.5\%$, respectively) and in contrast f8 showed the worse entrapment (SA, EGCG and SB EE%: $66.2\% \pm 2.5\%$, $26.9\% \pm 0.9\%$ and $68.6\% \pm 2.8\%$, respectively). The other samples varied in terms of their trapping efficiency related to the three different markers. However, it was clear that EGCG showed stronger affinity for polymers than SA and SB.

None of the developed systems was able to fully trap the marker compounds, leaving a small fraction of unbound and not incorporated extract. On the other side, the presence of a small amount of free / unbound extract on the particles surface can act for initiation of an initial bursting effect. This means, that the unbound / not incorporated extract can cause an initial peak concentration to act immediately after its contact with the mucosa, followed later on by the release of the incorporated extract [24].

Besides the size and EE%, also the zeta potential of the MLB was evaluated, which varied between - 55.8 mV to -23.9 mV. f2 sample showed the highest negative charge (ZP = -55.8 ± 6.4 mV), probably associated with its low drug content (1.0 g). It is also interesting to note that the most negatively charged particles (f2: $-55.8 \text{ mV} \pm 6.4$, f6: $-51.9 \text{ mV} \pm 7.9$, f1: $-45.9 \text{ mV} \pm 7.3$, f9: $-43.5 \text{ mV} \pm 4.3$, and f5: $-40.8 \text{ mV} \pm 6.2$) are those formulated with the lowest concentrations of "*baicuru*" extract (1.0 and 1.5 g). Those with a less negative charge are particles developed with 2.0 g of the extract (f4: $-38.3 \text{ mV} \pm 6.5$, f8: $-36.2 \text{ mV} \pm 11.2$, f3: $-32.6 \text{ mV} \pm 4.1$, and f7: $-23.9 \text{ mV} \pm 4.7$).

In addition, MLB morphology was evaluated by SEM. As displayed in Figure 2 most of the particles displayed irregular shape with a rough surface structure (Figure 2a-i), commonly observed in the development of particles obtained by spray drying. A closer analysis of the micrographs demonstrates that particles displayed in Figure 2b, 2c, 2f, 2g resemble in many cases spheres with a

shriveling surface. This is observed in particles that were prepared with a higher amount of Surelease (high level (+)). Therefore, a higher roughness of the other samples can be explained due to a lower content of polymers, leading to the formation of more deformed and irregular microparticles [25].

Despite appearing in minority, microparticles prepared with EAF presented some doughnut-like shape (arrow Figure 2b), although the typical spherical boundary is still observed. It is believed that the presence of insoluble precipitates in the solution was a determining factor for the formation of some doughnuts-like particles, since, with the exception of EAF, all the polymers used had low or no solubility in water [26, 27].

Figure 2j clearly allows to conclude that the presence of *L. brasiliense* extract in the composition was fundamental for the formation of particles by spray drying method, since the absence of EAF did not allow the formation of isolated particles, but resulted in polymer clusters.

The drug release profile of f3, f4, and f7 was evaluated by analyzing EGCG, as it was the most stable marker in the 24-h test time. Figure 3 shows the release profiles of free EGCG compound (HPLC purity $\geq 90\%$), f3, f4, and f7. The amounts of EGCG released from the MLB were similar and on a low cumulative concentration level. Only approximately 10% of EGCG was released during the first 8 h and approximately 15% within 24 h was observed. The isolated compound EGCG solubilized in the medium showed a release of about 88% within 8 h through the membrane, ending with a release of 116% after 24 h. It shows the effectiveness of this test in allowing EGCG to completely cross the membrane of the system. So, after 24 h, the EGCG amounts released from the formulations f3, f4, and f7 were $15.4\% \pm 2.9\%$, $16.5\% \pm 0.8\%$ and $10.7\% \pm 0.6\%$, respectively. The EGCG release from formulation f7 was slower than those determined for formulations f3 and f4.

Figure 3 also presents the results for cumulative release rate highlighted in at least two stages for the permeation process. It is well known that the diffusion of formulations through skin is a complex process depending on several aspects like the formulation composition, viscosity, molecular size, hydrophobicity or amphiphilic behavior, and penetration routes throughout the skin. It is considered a non-Newtonian process [28] making analytical evaluation a troublesome task. The two regimes in Figure 3 may be attributed to a first stage when the formulations were applied onto the skin topical side, taking some time to dynamically homogenize and coupling with the skin-solution interface, followed by a second stage process after the distribution of the formulation reach a steady state diffusion process. Here, it is proposed the use of an exponential function with two terms to describe the two stages of the diffusion processes as:

$$\begin{aligned} \text{(a) } Y(t) &= A_1 \cdot (1 - \exp(-t/\tau_1)); & \text{if } t \leq t_0; \\ \text{(b) } Y(t) &= A_1 \cdot (1 - \exp(-t_0/\tau_1)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-(t - t_0)/\tau_2)); & \text{if } t > t_0 \quad \text{Eq (1)} \end{aligned}$$

In which, A_n are the initial stages amplitudes; τ_1 and τ_2 the cumulative release time constants and t and t_0 the time instant values for each stage, respectively. The fitting of the experimental data

provided the values of τ_1 and τ_2 for the free EGCG compound, f3, f4 and f7 formulations. The obtained values are also shown in Figure 3. It was made the option to calculate the average values, $\tau_{1\text{average}}$ and $\tau_{2\text{average}}$ for f3, f4 and f7 data, respectively, resulting in $\tau_{1\text{average}} = 2.6 \pm 0.7$ and $\tau_{2\text{average}} = 2.6 \pm 0.9$.

Using f4 formulation, the respective microparticles were investigated for its potential mucoadhesive properties on porcine buccal epithelial tissue, using a flow through system [23, 29]. After 30 min of PBS flow over the microparticles-loaded mucosal tissue, it was evaluated that $93.1\% \pm 4.2\%$ of the microparticle still adhered to the tissue, indicating strong mucoadhesive properties of the f4 particles. This method allows evaluating the ability of microparticles to remain attached to the oral mucosa by the flow of PBS over the sample. Despite being an *ex vivo* test, the choice of flow falling technique was based on the need to establish a fixed value that would allow good reproducibility of the test, in spite of the great variability in the salivary flow rate under physiological conditions.

The MLBs were investigated for their potential influence on the viability of KB cells [21], a cell line representing human buccal epithelium and being widely used for studies related to periodontitis. The results of the *in vitro* evaluation of the formulations MLB f1 to f9, as well as the influence of EAF on cell viability are presented at Figure 2S, Supporting Information. FBS was used as a positive control with a relative viability of $155\% \pm 10\%$.

According to the guideline for determination of *in vitro* cytotoxicity of medical devices (ISO 10993-5), materials can be described as non-cytotoxic when the viability of cells is $\geq 70\%$ after exposure [30]. All MLB at $50 \mu\text{g/mL}$, or lower, effected the cellular viability to values not lower than 70% (exc. f4: $65\% \pm 7\%$), while from 100 to $200 \mu\text{g/mL}$ cell viability decreased to about $\geq 60\%$ (Figure 2S, Supporting Information). It is important to note that the influence of the particles on KB cell viability was tested over a 24 h time interval of direct exposure to the cells, a fact that will not occur during oral use. However, the 24 h condition was tested to prove that even under extreme exposure conditions there was no abrupt reduction in cell viability, even at the highest concentrations tested. Therefore, the formulated samples are regarded to be safe, having no relevant toxic effects against eukaryotic cells at a loading concentration of $50 \mu\text{g/mL}$ EAF. At this point, the quite high cell toxicity of other standard medications for periodontitis has to be kept in mind: chlorhexidine [15], generally accepted as the gold standard for treatment for periodontitis, has quite high *in vitro* ($> 80\%$ reduction in MTT activity over a 24 h interval on KB cells) [15] and *in vivo* toxicity [31].

From these experiments it is obvious that EAF can effectively get incorporated into the microparticles, which again have strong mucoadhesive properties to stick to buccal tissue and will release the polyphenols of EAF in a time-dependent manner.

Within the next steps it was to investigated if the EAF- loaded MLB are capable to interact also with *Pg*. For this, antiadhesion assay was performed to investigate if MLB can interact with the recognition of host cells by *Pg* and if the gingipain-mediated adherence to the host cells can be influenced.

Prior to this experiments the absence of antiproliferative effects of EAF and EAF-loaded MLB (1, 10, 100, and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; positive control amoxicillin 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against *Pg* was verified by an agar diffusion test (data not shown). No effects on the growth of the bacteria were detected. In addition, also no significant cytotoxic effects against KB cells were recorded. This supports the study of [15] which reported that *Lb* extract had no antibacterial activity on *Pg* (up to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and no toxic effect against KB cells in a concentration range from 50 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ over a 2 h incubation interval. In similar experiments Labrecque, Bodet, Chandad and Grenier [32] also did not verify any inhibition of *Pg* growth by cranberry extracts by plate diffusion test up to 250 mg/mL, however, antiadhesion and antibiofilm formation effects by this bacterium were proven.

Three different tests were carried out in order to understand the influence of MLB on *Pg* adhesion to the eucaryotic host cells. The first one (i) evaluated the adhesion of bacteria in contact with the host cells concomitantly with MLB (co-incubation). The second test (ii) aimed to assess a potential protective antiadhesive effect of MLB to KB cells, since MLB stayed in exclusive contact for 8 h with KB cells, protecting host-cells from infection by *Pg*. The third experiment (iii) evaluates especially if the previous 8 h released EAF from the microparticles in Earl's minimum essential medium (EMEM) was as effective as its association with the polymers in the adhesion of the bacteria to the cells.

By the data obtained within the coincubation assay (Figure 3S, Supporting Information), up to $30\% \pm 15\%$ inhibition of the bacterial adhesion was observed for the MLB f1, f2, f3, f4, f5 more specifically, $15\% \pm 6\%$, $30\% \pm 15\%$, $14\% \pm 4\%$, $20\% \pm 8\%$, and $20\% \pm 15\%$ of inhibitions at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Interestingly, free EAF showed a much more pronounced and also concentration-dependent antiadhesive activity with up to $49\% \pm 5\%$ inhibition at the 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration level. The other formulations tested (f6, f7, f8, and f9) did not show any anti-adhesive activity against *Pg* under the conditions of this experimental setup. On the contrary, an increase in the adhesion of the bacteria to the system was verified, reaching an adhesion of up to $125\% \pm 23\%$, making the use of these samples unfeasible. The MLB without EAF sample showed a significant increase in the adhesion of bacteria to cells with up to $277\% \pm 53\%$. This confirms that the antiadhesive activity observed in samples from f1 to f5 refers to the presence of the extract in the formulation. The positive control (EGCG, 25 μM) significantly inhibited bacterial adhesion to KB cells ($55\% \pm 4\%$ of adhesion).

Preincubation with the eukaryotic host cells (Figure 4) indicated significant protective effects by EAF-loaded MLB to KB cells after 8 h in contact time. However, the protective effect of free EAF was clearly inferior to all samples containing microparticles, not providing any significant protection. This fact leads to the conclusion that, there was also a very strong interaction by all samples, specially at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with the host cells, causing a strong protective barrier that even after two washes with PBS, has not been removed. If this is a physical effect or related to other mechanisms has to be investigated in further studies. The evaluation of the MLB without incorporated EAF suggest a possible physical barrier of protection of the polymeric structure, since it showed an inhibition of at least $18\% \pm 9\%$ of *Pg* adhesion to KB cells. However, more experiments must be performed for this claim.

f6 showed a significant inhibition of the bacterial adhesion ($93\% \pm 2\%$) at $25 \mu\text{g/mL}$. A lower anti-adhesive activity of f2 ($36\% \pm 26\%$ at $50 \mu\text{g/mL}$) was verified. In general, f1, f2, f3, f4, f5, and f7, at $25 \mu\text{g/mL}$, showed very similar results, around $88\% \pm 6\%$ protection against *Pg*. So, the protective effect has a limiting concentration to be effective. At concentrations of $25 \mu\text{g/mL}$, all tested samples showed a greater effect than those of $50 \mu\text{g/mL}$. This fact may be a consequence of the formation of microparticle-bacteria agglomerates due to the high amount of sample tested. The positive control, EGCG $25 \mu\text{M}$, protected KB cells by up to $70\% \pm 9\%$ against bacterial adhesion.

Therefore, test ii MLB has a high potential to be used as periodontitis prevention or even as adjuvants to its treatment, since a significantly anti-adhesive activity against *Pg* to human epithelial buccal cells was showed.

Surface plots (Figure 4) show *Pg* adhesion to eukaryotic cells (y-axes). The response surfaces present the behavior of the variable "*Pg* adhesion to eukaryotic cells" (y-axes) when in the presence of the other variables ("tested concentrations ($\mu\text{g/mL}$)", "EAF (mg)" and "Surelease (mL)") under three different experimental conditions.

Figure 4 presents a lower adhesion response of *Pg* at about $30 - 40 \mu\text{g/mL}$ when it is associated with any level of EAF 1.0 to 2.0 mg, at fixed 37.5 mL Surelease concentration. In addition, at fixed $29.17 \mu\text{g/mL}$ MLB concentration, it is possible to use any level of EAF and Surelease to obtain good inhibitory activity against *Pg*. However, its best activity is shown when a higher concentration of EAF is associated with a lower concentration of Surelease. At fixed 1.5 mg EAF concentration, lower *Pg* adhesion to eukaryotic cells are obtained with high concentrations of Surelease and of about $40 \mu\text{g/mL}$ MLB concentrations. The levels of polycarbophil, did not show direct interference in the responses.

Finally, it can be observed that the use of around 30 to $40 \mu\text{g/mL}$ concentrations with any level of the other factors generate lower responses of *Pg* adhesion to KB cells, that is, better results of cells protection.

The test with previous 8 h released EAF brought interesting data, as some MLBs had no more activity (Figure 4S, Supporting Information). f1 and f2 no longer had any significant activity at $25 \mu\text{g/mL}$, probably due to their lower EAF concentration in the formulation (1.0%), associated with their greater extract trapping effectiveness. Although f4 and f5 showed higher inhibiting power than f7. f7 curve resulted in a dependent concentration graph, bringing greater meaning to the results obtained with inhibition of $41\% \pm 14\%$ and for concentrations of 50 and $25 \mu\text{g/mL}$, respectively. The microparticle without EAF was not evaluated, since the intent of this test was to assess the influence of the previous EAF release for 8 h. However, the positive control (EGCG $25 \mu\text{M}$) inhibited bacterial adhesion by up to $59\% \pm 2\%$ in KB cells.

MLBs were also investigated regarding their activity against the action of gingipains, one of the main mechanisms of action of *Pg*. As shown in Figure 5, f3, f4, and f7 inhibited significantly Arg- gingipain (Rgp) in a concentration-dependent manner. The same was observed also for f4 and f7 for

Lys-gingipain (Kgp), however, for f3, no significant inhibition results were obtained. Similar results were also obtained for no-entrapped *Lb* fractions by other authors [15, 33].

Figure 6 shows the percentage of biofilm formed by *Pg* after 24 h in contact with the MLB tested at six different concentrations. All MLB tested inhibited the *Pg* biofilm formation significantly and in a concentration-dependent manner. The highest percentage of biofilm formation was by the negative control (data not shown). Microparticles f4 and f5, as well as free EAF, were most effective against biofilm formation at 250 µg/mL, inhibiting $97\% \pm 2\%$ of the *Pg* biofilm within 24 h, followed by the microparticles f1, f8, and f9 ($96\% \pm 1\%$), and f3 and f7 ($94\% \pm 1\%$). Sample f6 exerts lowest inhibition of biofilm with $80\% \pm 2\%$.

Microparticles formed by polymers exclusively, Surelease and polycarbophil, without any incorporated extract, were also evaluated in regard to its potential influence against biofilm formation of *Pg*. Concentrations of 30, 60, 125, and 250 µg/mL were tested and a significant increase in a concentration-dependent way ($175\% \pm 12\%$, $196\% \pm 6\%$, $195\% \pm 11\%$, and $239\% \pm 21\%$, respectively) was observed. It shows a favoring increase in bacterial biofilm or even the formation of clusters with bacteria, proving that the presence of the extract EAF is responsible for effective biofilm inhibition of *Pg*.

Moreover, the investigation of potential effects of compounds from EAF, more specifically of EGCG, was evaluated by a different method of analysis of biofilm formation by Asahi et al. (2014), showing that at concentrations of 100 µg/mL it inhibits biofilm formation of *Pg* up to 90% compared to the control.

Despite good oral hygiene preventing the progression of periodontal disease, the high incidence of periodontitis in Brazil and worldwide shows these actions are not enough to control the disease [2]. The search for prophylaxis including inhibition of *Pg* adhesion is an attractive target for the development of new therapies to prevent bacterial infections, especially infections of mucosal surfaces.

The results presented in this work provided clear evidence that "baicuru" extract entrapped in mucoadhesive microparticles can inhibit biofilm formation and adherence of *Pg* by acting efficiently against the main virulence mechanisms of this bacterium. Furthermore, the fact that MLB do not inhibit bacterial growth, but act against bacterial adhesion, may represent an advantage, as it hinders the development of bacterial resistance.

Considering that no polymeric mucoadhesive system with "baicuru" has been presented, MLBs may offer new perspectives for the prevention and / or as adjunct treatment of periodontitis.

Materials and Methods

If not stated otherwise, solvents, reagents, and consumables were obtained from Merck. Surelease was kindly provided by Colorcon and Noveon Polycarbophil (AA-1 USP) by Lubrizol. SA (HPLC purity $\geq 84\%$), EGCG (HPLC purity $\geq 90\%$), and SB (HPLC purity $\geq 91\%$) standards were kindly

provided by Palafito Laboratory and determined by UHPLC method developed according [29]. Fluorescein isothiocyanate (FITC) and $N\alpha$ -benzoyl-D,L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) were purchased from Sigma-Aldrich. Leupeptin and $N\alpha$ -Tosyl-L-lysine-chloromethyl-ketone hydrochloride (TLCK) were obtained from AppliChem. Ac-Lys-pNA was obtained from Bachem. All reagents and solvents were in analytical grade.

Plant material

Rhizomes of *L. brasiliense* were collected in Rio Grande, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (S 31° 59' 33"/W 52° 10' 43") in February 2013. A voucher specimen is deposited at the Herbarium of the State University of Maringá (HUEM#27725). The plant material was collected under a permit from IBAMA-SISBIO, No. 11995-3, granted 02.11.2010, authentication code 46367613, under the responsibility of J. C. P. Mello. Access to the botanical material was authorized and licensed by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) under #010252/2015-0. The plant material was authenticated by Prof. Dr. Lilian A. Mentz. The harvested herbal material was cleaned with water to remove soil, dried in a circulating air oven (37.0 ± 2 °C), and was powdered and sieved by use of a hammer mill (Tigre ASN-6; mean particle diameter 0.42 mm) [34].

The pulverized rhizomes (50.0 g) were extracted by turbo-extraction (Ultra-Turrax T25, 6×5 min, 15,000 rpm, $T < 40$ °C) using 500 mL of acetone: water (7:3; v/v), 10% (w/v). The extract was filtered, concentrated in a rotavapor (Büchi R-114) under reduced pressure, and lyophilized (Christ Alpha 1–4), to obtain the CE (27.6%). CE (1.0 g) was solubilized in water (10 mL) and partitioned with ethyl acetate (5×10 mL). The ethyl acetate and water were concentrated, lyophilized, and yielded 10.4% and 72.4% of EAF and AQF, respectively [19, 34].

Identification of the constituents by UHPLC

The UHPLC analysis was conducted by use of a Thermo Scientific UltiMate 3000 chromatograph instrument with an Agilent Zorbax C-18 (250 mm \times 4.6 mm) 5 mm column. The mobile phase was composed of water: phosphoric acid (100:0.2, v/v, Solvent A) and acetonitrile: phosphoric acid (100:0.2, v/v, Solvent B) and used within the following elution gradient: 0 min 10% B; 15 min 15% B; 35 min 19% B; 36 min 80% B; 40 min 80% B. The oven temperature was controlled at 24.0 °C. The flow rate was 0.4 mL/min, and the injection volume was 10 μ L. UV detection was made at $\lambda = 210$ nm as well as by diode array detectors DAD-3000 (RS) and MWD-3000 (RS) for the determination of peak purity. Test solutions were prepared in methanol:water (1:1, v/v) at 0.2 g/mL and centrifugated at $12,114 \times g$ for 20 min prior to injection. Reference substances (SA, EGCG and SB) were prepared in methanol:water (1:1, v/v) for unambiguous peak identification in the test samples by the comparison of

retention times (rt). The chromatograms and peak areas were generated by the Chromeleon Console 7.2.7 Software [35].

Experimental design and preparation of microparticles

The $2^3 + 1$ full factorial design (Table 1) was used to determine the influence of Surelease amount (X_1), polycarbophil solution amount (X_2) and EAF amount (X_3) on the biological tests against *Pg*, and EAF concentrations on the MLB tested (X_4), 12,5, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$. These independent variables were evaluated at two levels (high (+) and low (-)), including a central point (0), and the surface response plot was used to show the interaction effects in the system with respect to the biological responses and their concentrations.

A function was adjusted to correlate the independent variables and the dependent variable to predict the ideal conditions according to the function described in Eq (2).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \beta_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 + \varepsilon \quad \text{Eq (2)}$$

Where Y is the response as a function of X_1 , X_2 , X_3 and X_4 ; β_0 is a constant term; β_1 , β_2 , β_3 and β_4 are the coefficients of linear terms; β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{23} , β_{24} , β_{123} and β_{1234} , are the coefficients of interaction effects and the ε is the random error.

The replicates and the central point enable to estimate the pure error variance and the reproducibility of the method. In addition, the experiments were randomized to minimize the influence of unexplained variability in the response. Additionally, residue analysis was performed to validate the assumptions utilized in the analysis of variance (ANOVA) and to identify outliers. The model adequacy was verified using ANOVA by multiple and adjusted coefficients (R^2 and R^2_{adj}) as well as the lack of-fit test. Moreover, the desirability approach (a numerical optimization technique) was performed for the independent variables.

For the preparation of microparticles, Surelease was slowly added to EAF, followed by addition of the polycarbophil solution under magnetic stirring until complete homogenization. The amount of EAF and polymers in the dispersion varied according to the factorial design (Table 1). A mini spray dryer M-MSD 1.0 (Labmaq) was utilized to dry the dispersions. Spray-drying conditions: feed flow rate 6 mL/min, air pressure 4 bars and inlet temperature 160.0 ± 5 °C. The dried powders were collected and kept away from rehydration until further analyses.

Morphology and particles size analysis

The morphology of the samples was studied employing a SEM Quanta FEG 250 (FEI-ThermoFisher Scientific). Samples were placed on a carbon tape at a stub and sputtered with gold and then analyzed.

SEM micrographs were analysed by Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics). The particle size analysis was measure by the Feret's diameter (mean value of the distance between parallel lines tangent to the profile of the particle and perpendicular to the ocular scale) [36]. At least seven hundred particles were measured.

Zeta potential analysis

The effect of the coating on the surface charge was determined by measuring the zeta potential by mixed laser Doppler electrophoresis and phase analysis light scattering (M3- PALS). The measurements were acquired using a Malvern Zetasizer Nano ZEN 3600 (Malvern Instruments) at 22.0 °C, fitted with a laser output of 4 mW He/Ne operating at $\lambda = 633$ nm. 10 μ L of the test suspension (1000 μ g/mL) were diluted with 990 μ L Aqua Millipore. Zetasizer Software 7.13 was used for analysis of the data. The results were obtained from three independent triplicates.

SA, SB and EGCG content and entrapment efficiency (UHPLC)

The content of analytical marker compounds in extract fraction EAF and the respective entrapment efficiency (EE) were determined by UHPLC analysis of the three main flavan-3-ols of EAF (EGCG, SA, and SB). Quantification was performed using a validated UHPLC method [35]. The content of the analytical marker compounds was calculated according to the Eq (3).

$$T = (D/m) \times 100 \quad \text{Eq (3)}$$

Where T is the content of SA, EGCG or SB inside the particles (% , w/w), D is the content of SA, EGCG or SB and m is the mass of microparticles analysed. The entrapment efficiency (EE; % , w/w) was obtained by comparing the calculated SA, EGCG or SB contents in EAF with those obtained for the microparticles. All measurements were performed, at least, in three independent experiments [23].

In vitro drug release profile investigation

The MLB release studies were carried out using modified Franz's cells. Ultra-purified water was used as dissolution medium. The dialysis tubing membrane was constituted of cellulose (molecular weight cut-off 14 kD, 76 mm). The selected formulations were suspended in the respective medium (90 mg of f3, 50 mg of f4, and 100 mg of f7 in 3.0 mL of medium) and kept in contact with the donor chamber, that had been placed into the mini vessel containing 20 mL of the dissolution medium

(acceptor chamber). The stirring rate was adjusted to a constant rate and the temperature was kept at 37.0 ± 0.5 °C. Aliquots of 0.5 mL were collected from the acceptor compartment at predetermined time points (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h) and replaced with fresh medium [23, 37]. The samples were then centrifuged at $1211 \times g$ for 20 min and the supernatant was collected for subsequent analysis. The amount of microparticles tested were evaluated by the concentration of EAF present in each sample. All experiments were performed in triplicate according to the validated UHPLC method.

Ex vivo mucoadhesion evaluation

The mucoadhesive properties of MLB were investigated by the retention testing using pig cheek mucosa on a flow-through system [23, 29]. Cheek mucosa samples were taken from freshly slaughtered pigs (from a slaughterhouse authorized by the Ministry of Agriculture for human consumption). The mucosa tissue was exposed and a rectangle sample (2 cm \times 4 cm) was excised using scissors and a surgical scalpel. The mucosa samples were stored at -18.0 °C for less than 4 weeks and thawed to room temperature on an experimental day. The tissue sections were placed on the channel testing over which a syringe pump washes phosphate-buffered saline (PBS). The system was maintained at 37.0 ± 0.5 °C within a temperature-controlled cube. The amount of 50 mg of f4 was placed into the testing tissue and allowed to warm for two minutes. This conditioning time was sufficient to allow adhesion of the particles to the epithelia, as had been shown in pre-experiments by inversion of the substrate. PBS flow over the tissue section was adjusted to 5 mL/min for 30 min. The respective eluate was analyzed by the validated UHPLC method [35]. Subsequently, the amount of MLB removed from the surface of the tissue was collected and the EAF content calculated. The obtained results were subtracted from the total EAF in the MLB tested, resulting in the retention value. Tests were routinely performed in quintuplicate.

Cell culture

Human epithelial cells line KB cells (ATCC CCL-17 - HeLa), derived from an epidermoid carcinoma, were kindly provided by Dr. S. Eick (University of Jena, Germany). Recent testing performed by ATCC indicated that KB cell line might be contaminated by HeLa cells, and, also, these cells have been reported to contain human papillomavirus 18 (HPV18) sequences [38]. However, it has been widely used in studies related to periodontitis, especially with *Pg*. KB cells were cultured in EMEM (Biochrom), supplemented with 8.0% (v/v) fetal bovine serum (FBS Superior, Biochrom), 1.0% minimum essential medium (MEM) non-essential amino acids (100 x solution) (GE Health Care Products) and 50 μ g/mL gentamicin (Sigma-Aldrich) at 5.0% CO₂ / 37.0 °C [39]. Passaging was performed twice a week to a maximum of 15 passages.

Determination of cell viability

Potential influence of microparticles on the vitality of KB cells was determined by a colorimetric assay for assessing cell metabolic activity by use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) [40]. The microparticles were diluted in EMEM and incubated for 24 h together with KB cells (5×10^4 cells/well). EMEM medium, supplemented with fetal bovine serum 10% (FBS) was used as positive control. The relative viability was related to the untreated control, normalized to 100%.

Bacterial growth conditions and fluorescent labelling

Pg (ATCC 33277) were cultivated according to [27], under anaerobic conditions (Anaerogen, Oxoid-Thermo Scientific chamber) at 37.0 °C on solid sheep blood agar (per 1 L: 16 g agar, 15 g trypticase peptone, 5 g neutralized soja peptone, 5 g sodium chloride, 5 g yeast extract, 0.5 g L-cysteine, 50 ml sheep blood) enriched with 10 mg vitamin K and 5 mg hemin. For assays an overnight liquid culture in the exponential growth phase was used, prepared from agar-grown *Pg* and suspended in liquid culture medium at OD₆₆₀ 0.1. To obtain bacteria in the exponential phase, the liquid culture was incubated under anaerobic conditions for 24 h.

Labelling of *Pg* with FITC was performed as described by Schmuch, Beckert, Brandt, Löhr, Hermann, Schmidt, Beikler and Hensel [33]. Liquid-culture grown *Pg* (24 h, 37.0 °C) were harvested and suspended in 0.5 M NaHCO₃, pH 8.0. After adjusting the OD₆₆₀ to 0.4, FITC (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich) was added for labelling of the bacteria followed by incubation for 30 min/37.0 °C. Bacteria were sedimented ($3,600 \times g$ for 5 min) and washed twice in PBS to remove unbound FITC. FITC-labelled bacteria were suspended in EMEM to perform the adhesion tests.

To exclude quenching effects in fluorescence assays, the microparticles were tested for potential quenching behavior. Labeled bacteria were incubated with the respective test compounds/particles for 90 min. Subsequently, the fluorescence intensity of the bacterial suspension was determined by a fluorescence reader at an excitation wavelength of $\lambda = 485$ nm and an emission wavelength of $\lambda = 538$ nm (data not shown).

Antibacterial susceptibility test

For investigation of the influence of EAF and MLB on the proliferation of *Pg*, an agar diffusion test was performed (Figure 1S, Supporting Information). Three days agar-grown cultures of *Pg* were harvested and suspended in sterile PBS. The optical density was adjusted to OD₆₆₀ = 0.2. 100 µL of this bacterial suspension were plated out on a blood agar plate with the help of a Drigalski spatula and a Petri turn-M^{PLUS}. Paper BD disks (Sensi-Disk, BD Biosciences) with 20 µL of the test compounds were placed

circularly in equal distances on the inoculated plate. Sterile PBS served as negative control and amoxicillin (12,5 µg/mL) as positive control. After an anaerobic incubation of five days, the zones of inhibition were analyzed.

Influence of microparticles on adhesion of Pg to KB cells according [33]

KB cells were seeded in 96 well plates and incubated for 24 h. Bacterial liquid culture of *Pg* was centrifuged ($5,000 \times g$ for 10 min). The bacterial pellet was washed with PBS once, transferred to a 1.5 mL centrifuge tube and centrifuged ($5292 \times g$ for 5 min) (Centrifuge Hettich Mikro 120, Hettich). Subsequently, the pellet was resuspended in NaHCO₃ buffer 0.5 mol/L, pH 8.0, the OD₆₆₀ was adjusted to 0.4/100 µL and a solution of FITC (5 mg/mL) was added (10 µL) to obtain a final concentration of 50 µg/mL. The mixture was incubated at 37.0 °C for 30 min. FITC-labelled bacteria were washed 3 × and resuspended in EMEM without any supplementation at OD₆₆₀ = 0.3.

Two hours before adding the FITC-labelled bacteria, the KB cells were washed two times with PBS, to remove any antibiotic. EMEM without supplementation was added and the plate was incubated. EGCG 25 µM was used as positive control.

The test solutions were evaluated under three different conditions:

i: Test solutions were added to the KB cells at a bacteria cell ratio (BCR) of 100:1. The plate was incubated for 90 min at 37.0 °C under shaking ($10 \times g$), washed twice and analyzed.

ii: The test solutions were incubated with KB cells for a period of 8 h incubation at 37.0 °C and 5.0% CO₂. After 8 h of KB cells protection, the bacteria were added to the KB cells at a BCR of 100:1 for 90 min at 37.0 °C under shaking ($10 \times g$), washed twice and analyzed.

iii: The test solutions were previously diluted in EMEM and incubated for 8 h at 37 °C and 5.0% CO₂. After the incubation time for the extract release, the samples were added to the KB cells at a BCR of 100:1 for 90 min at 37.0 °C under shaking ($10 \times g$), washed twice and analyzed.

At the end of the incubation period, the cell monolayer was washed twice with PBS and 100 µL of PBS were added. Readout was performed at $\lambda_{exc.} = 485$ nm and $\lambda_{em} = 538$ nm in a Fluoroskan Ascent plate fluorometer (Thermo Fisher Scientific). The amount of microparticles tested were evaluated by the concentration of EAF present in each sample.

Influence of microparticles on gingipain activity

In order to investigate the influence of the MLB on the major adhesins / proteases of *Pg*, the arginine and lysine gingipain activities were monitored during incubation with f3, f4, and f7. A 3-day agar culture of *Pg* was harvested and resuspended in buffer (100 mM Tris·Cl, pH 7.6; 75 mM NaCl; 2.5 mM CaCl₂; 10 mM L-cysteine). The OD₆₆₀ was adjusted to 0.03 and 0.006 for Kgp and Rgp activity,

respectively and the suspensions were transferred to a 96-well plate. Solutions, containing the respective test compounds (microparticles, leupeptin, a specific inhibitor for Rgp, TLCK, a specific inhibitor for Kgp) were added and the plate was incubated at room temperature for 10 min. The substrates BAPNA for determination of arg-gingipain (Rgp) activity and Ac-Lys-pNA for Lys-gingipain (Kgp) activity were added both at 0.5 M and the absorbance was read at $\lambda = 405$ nm over 30 min each minute in a microplate reader SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices). Protease activities were related to the untreated control (=100%) [26, 27].

Biofilm assay: Cristal violet staining

A 24 h liquid culture of *Pg* was used to investigate the influence of the MLB on the biofilm formation according to a protocol described by [32]. In the exponential phase, the bacteria were washed with PBS and resuspended in pre-warmed liquid culture medium. 100 μ L of a bacterial suspension with an $OD_{660} = 0.2$ were transferred in a 96 well plate. 100 μ L of extract, diluted in PBS, was added with twice concentration, in order to obtain the desired concentration in 200 μ L volume per well. After anaerobic incubation for 24 h at 37.0 °C and 5.0% CO₂, the biofilm was rinsed three times with 100 μ L of sterile ultrapure aqua (Millipore). Afterwards the established biofilm was stained with 100 μ L of 0.4% crystal violet for 15 min. Unbound colorant was washed by four times rinsing with ultrapure aqua (Millipore). After 2 h drying, the stained biofilm was dissolved in 95% ethanol and the plate was gently shaken for 10 min. For quantification the absorbance at $\lambda = 550$ nm was determined in the plate reader.

Statistical analysis

Numerical data were presented as means \pm standard deviation of the mean (SD) from 3 independent experiments. The numbers of repetitions of individual assays were different and are displayed in the respective protocols. Student's t test or two-way ANOVA with Bonferroni post-test was performed considering values of $p \leq 0.05$ as statistically significant. R Core Team v. 4.0.2 (2020) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) were used for statistical computing and graphics [41].

Supporting information

The results of cell viability, coincubation assay and 8 h release test is presented at Figure 1S, 2S, 3S and 4S, respectively, on Supporting Information.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. M. Lechtenberg for helpful assistance with many computational problems and Dr. M. Kelm and Dr. B. Scharf for the teachings and help in the analysis. The authors thank Professors Mauro L. Baesso and Antonio C. Bento (Dept. Physics, UEM) for their help in Figure 3 and discussion. The authors also would like to thank Colorcon and Lubrizol for kindly provided Surelease and Noveon Polycarbophil (AA-1 USP), respectively, for the development of the new polymeric system.

Conflict of interest

This study was financially supported by CNPq, for providing a student grant to FP for the program *Ciências Sem Fronteiras* (Grant #200175/2018-1). Residual expenses were borne by intramural annual budgets from the University of Münster to AH, the Universidade Estadual de Maringá to and project's funding agencies, Comcap, CAPES, FINEP to JM. The study design, data collection and analysis, as well as the intention to publish and its completion have not been influenced by the funders.

The authors F. Pilatti, R. Isolani, L. Valone, D.C.M. Araújo, and J.C.P. Mello filed a patent application “*Uso de polímero microestruturado com Limonium brasiliense e respectivas micropartículas*”, deposit BR 102020 0234919, on the 11.17.2020. However, the authors state that this application had no impact on the study protocol, its execution and evaluation.

Authors' contributions

F. Pilatti was responsible for EAF characterization, the randomization, data analysis and drafted the manuscript. M.L. Bruschi was responsible for idealizing the structural composition of the microparticle matrix. L. Valone and D.C.M. Araújo manufactured the MLB and placebo. F. Pilatti, R. Isolani and M.N. Paula conducted the in vitro experiments with the cells and bacteria. F. Pilatti and S.B.S. Ferreira performed MLB characterization. S.B.S. Ferreira, D.C.M. Araújo, L. Valone, and R. Isolani performed *ex vivo* analysis and the MLB release test. A.O. Caleare and T.A. Guedes were responsible for processing the data, partially, and statistical analysis. The conception, study design and protocol, data analysis and interpretation were performed by F. Pilatti, A. Hensel and J.C.P. Mello. All authors have critically revised and approved the final manuscript.

References

1. World Health Organization. Oral Health Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>. Date Cited 28 de Janeiro de 2022, 2022.
2. Ministério da Saúde (BR) PSB. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal Available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf; Date Cited 28 de Janeiro de 2022 2022
3. Holmlund A, Lampa E, Lind L. Oral Health And Cardiovascular Disease Risk In A Cohort Of Periodontitis Patients. *Atherosclerosis* 2017; 262: 101-106. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.009
4. Dioguardi M, Crincoli V, Laino L, Alovise M, Sovereto D, Mastrangelo F, Lo Russo L, Lo Muzio L. The Role Of Periodontitis And Periodontal Bacteria In The Onset And Progression Of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine* 2020; 9: 495. doi:10.3390/jcm9020495
5. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The Case For Periodontitis In The Pathogenesis Of Rheumatoid Arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2017; 13: 606. doi:10.1038/nrrheum.2017.132
6. Marouf N, Cai W, Said KN, Daas H, Diab H, Chinta VR, Hssain AA, Nicolau B, Sanz M, Tamimi F. Association Between Periodontitis And Severity Of COVID-19 Infection: A Case–Control Study. *Journal of Clinical Periodontology* 2021. doi:10.1111/jcpe.13435
7. Sahni V, Gupta S. COVID-19 & Periodontitis: The Cytokine Connection. *Medical Hypotheses* 2020; 144: 109908. doi:10.1016/j.mehy.2020.109908
8. Mohanty R, Asopa SJ, Joseph MD, Singh B, Rajguru JP, Saidath K, Sharma U. Red Complex: Polymicrobial Conglomerate In Oral Flora: A Review. *Journal of Family Medicine and Primary Care* 2019; 8: 3480. doi:10.4103/jfmpe.jfmpe_759_19
9. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview Of Periodontopathic Pathogen Below The Gum Line. *Front Microbiol* 2016; 7: 53. doi:10.3389/fmicb.2016.00053
10. Alhogail S, Suaifan GARY, Bizzarro S, Kaman WE, Bikker FJ, Weber K, Cialla-May D, Popp J, Zourob M. On Site Visual Detection Of *Porphyromonas gingivalis* Related Periodontitis By Using A Magnetic-Nanobead Based Assay For Gingipains Protease Biomarkers. *Microchimica Acta* 2018; 185: 149. doi:10.1007/s00604-018-2677-x
11. Nakayama M, Ohara N. Molecular Mechanisms Of *Porphyromonas gingivalis*-Host Cell Interaction On Periodontal Diseases. *Japanese Dental Science Review* 2017; 53: 134-140. doi:10.1016/j.jdsr.2017.06.001
12. Mulhall H, Huck O, Amar S. *Porphyromonas gingivalis*, A Long-Range Pathogen: Systemic Impact And Therapeutic Implications. *Microorganisms* 2020; 8: 869. doi:10.3390/microorganisms8060869
13. Slots J, Ting M. Systemic Antibiotics In The Treatment Of Periodontal Disease. *Periodontology* 2000 2002; 28: 106-176. doi:10.1034/j.1600-0757.2002.280106.x
14. Ahmadi H, Ebrahimi A, Ahmadi F. Antibiotic Therapy In Dentistry. *International Journal of Dentistry* 2021; 2021. doi:10.1155/2021/6667624
15. de Oliveira Caleare A, Hensel A, Mello JC, Pinha AB, Panizzon GP, Lechtenberg M, Petereit F, Nakamura CV. Flavan-3-Ols And Proanthocyanidins From *Limonium brasiliense* inhibit The Adhesion Of *Porphyromonas gingivalis* To Epithelial Host Cells By Interaction With Gingipains. *Fitoterapia* 2017; 118: 87-93. doi:10.1016/j.fitote.2017.03.002
16. Selbach S, Klocke A, Peters U, Beckert S, Watt RM, Tong R, Flemming TF, Hensel A, Beikler T. Microbiological And Clinical Effects Of A Proanthocyanidin-Enriched Extract From *Rumex acetosa* In Periodontally Healthy Carriers Of *Porphyromonas gingivalis*. *Planta Medica* 2021. doi:10.1055/a-1728-2249
17. de Diego I, Veillard F, Sztukowska MN, Guevara T, Potempa B, Pomowski A, Huntington JÁ, Potempa J, Gomis-Rüth FX. Structure And Mechanism Of Cysteine Peptidase Gingipain K (Kgp), A Major Virulence Factor Of *Porphyromonas gingivalis* In Periodontitis. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289: 32291-32302. doi:10.1074/jbc.M114.602052
18. Moura TFA, Schenkel EP, Schapoval EES, Simões CMO, Dos Santos RI. Estudos Farmacológicos Preliminares Das Raízes Do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze-Plumbaginaceae (Baicuru). *Cad Farm* 1985; 1: 45-54

19. Blainski A, Gionco B, Oliveira AG, Andrade G, Scarminio IS, Silva DB, Lopes NP, Mello JCP. Antibacterial Activity Of *Limonium brasiliense* (Baicuru) Against Multidrug-Resistant Bacteria Using A Statistical Mixture Design. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 198: 313-323. doi:10.1016/j.jep.2017.01.013
20. Antonelli-Ushirobira TM, Blainski A, Fernandes HG, Moura-Costa GF, Costa MA, Shimada LBC, Salgueiro-Pagadigorria CL, Kaneshima EN, Becker TCA, Leite-Mello EVS, Mello JCP. Acute Toxicity And Long-Term Safety Evaluation Of The Crude Extract From Rhizomes Of *Limonium brasiliense* In Mice And Rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 174: 293-298. doi:10.1016/j.jep.2015.08.022
21. Eagle H. Propagation In A Fluid Medium Of A Human Epidermoid Carcinoma, Strain KB. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955; 89: 362-364. doi:10.3181/00379727-89-21811
22. Saltem Farmacêutica; Pilatti F, Isolani R, Valone L, Araújo DCM, Mello JCP. Uso De Polímero Microestruturado Com *Limonium brasiliense* E Respectivas Micropartículas - BR 10 2020 023491 9. In: INPI, ed. Brazil: 2020: 1-27
23. Oliveira MB, da Silva JB, Montanha MC, Kimura E, Diniz A, Bruschi ML. Design And Characterization Of Mucoadhesive Gelatin-Ethylcellulose Microparticles For The Delivery Of Curcumin To The Bladder. *Current Drug Delivery* 2018; 15: 1112-1122. doi:10.2174/1567201815666180503121043
24. Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, El Ghazouani F, Sapin A, Hoffman M, Maicent P, Ubrich N. Effect Of The Microencapsulation Of Nanoparticles On The Reduction Of Burst Release. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 344: 53-61. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.05.066
25. Wang F-J, Wang C-H. Sustained Release Of Etanidazole From Spray Dried Microspheres Prepared By Non-Halogenated Solvents. *Journal of Controlled Release* 2002; 81: 263-280. doi:10.1016/S0168-3659(02)00066-4
26. Luo P, Nieh T. Preparing Hydroxyapatite Powders With Controlled Morphology. *Biomaterials* 1996; 17: 1959-1964. doi:10.1016/0142-9612(96)00019-1
27. Jr Walker WJ, Reed JS, Verma SK. Influence Of Slurry Parameters On The Characteristics Of Spray-Dried Granules. *Journal of the American Ceramic Society*, 1999; 82: 1711-1719. doi:10.1111/j.1151-2916.1999.tb01990.x
28. Antonio MECO. Permeação Cutânea *In Vitro* Como Ferramenta Auxiliar Para O Estudo De Formulações Semi-Sólidas De Cetoconazol Para Aplicações Tópicas [Dissertation]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná – UFPR; 2007
29. Cave RA, Cook JP, Connon CJ, Khutoryanskiy VV. A Flow System For The On-Line Quantitative Measurement Of The Retention Of Dosage Forms On Biological Surfaces Using Spectroscopy And Image Analysis. *Int J Pharm* 2012; 428: 96-102. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.02.047
30. ISO IS. Biological Evaluation Of Medical Devices. In: Part 5: Tests For *In Vitro* Cytotoxicity. Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization; 2009: 1-34
31. Flötra L, Gjermeo P, Rölla G, Waerhaug J. Side Effects Of Chlorhexidine Mouth Washes. *European Journal of Oral Sciences* 1971; 79: 119-125. doi:10.1111/j.1600-0722.1971.tb02001.x
32. Labrecque J, Bodet C, Chandad F, Grenier D. Effects Of A High-Molecular-Weight Cranberry Fraction On Growth, Biofilm Formation And Adherence Of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58: 439-443. doi:10.1093/jac/dkl220
33. Schmuck J, Beckert S, Brandt S, Löhr G, Hermann F, Schmidt TJ, Beikler T, Hensel A. 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 β →8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). *PLoS One* 2015; 10: 1-23. doi:10.1371/journal.pone.0120130
34. Löhr G, Beikler T, Hensel A. Inhibition Of *In Vitro* Adhesion And Virulence of *Porphyromonas gingivalis* By Aqueous Extract And Polysaccharides From *Rhododendron ferrugineum* L. A New Way For Prophylaxis Of Periodontitis? *Fitoterapia* 2015; 107: 105-113. doi:10.1016/j.fitote.2015.10.010
35. Blainski A, Antonelli-Ushirobira TM, Godoy G, Leite-Mello EVS, Mello JCP. Pharmacognostic Evaluation, And Development And Validation Of A HPLC-DAD Technique

- For Gallocatechin And Epigallocatechin In Rhizomes From *Limonium brasiliense*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2017; 27: 162-169. doi:10.1016/j.bjp.2016.08.009
36. Barber TA, Healthcare B. *Analysis and Control*. In: *Pharmaceutical Particulate Matter*. Buffalo Grove, IL: 1993: 1-531
 37. Ferreira SBS, Slowik KM, Hoshino LVC, Baesso ML, Murdoch C, Colley HE, Bruschi ML. Mucoadhesive Emulgel Systems Containing Curcumin For Oral Squamous Cell Carcinoma Treatment: From Pre-Formulation To Cytotoxicity In Tissue-Engineering Oral Mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020; 151: 105372. doi:10.1016/j.ejps.2020.105372
 38. ATCC. KB (ATCC® CCL17™). In: Manassas, VA, USA: American Type Culture Collection (ATCC); 2021
 39. Chierrito D, Villas-Boas CB, Tonin FS, Fernandez-Llimos F, Sanches ACC, Mello JCP. Using Cell Cultures For The Investigation Of Treatments For Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Systematic Review. *Current Neuropharmacology* 2019; 17: 916-925. doi:10.2174/1570159X17666190409143155
 40. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
 41. Team RC. *A Language And Environment For Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. In: 4.0.5 edn. R-Project; 2020: R Foundation for Statistical

Figures and Table

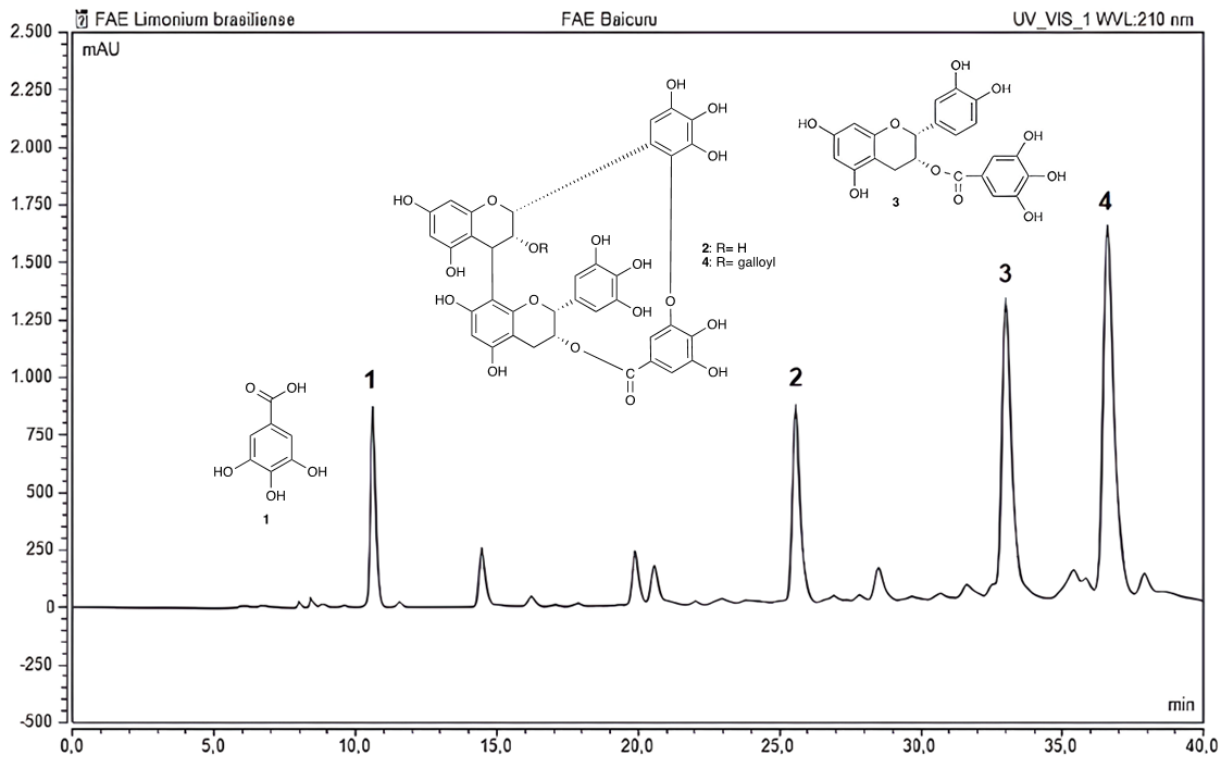


Figure 1. UHPLC profile ($\lambda = 210$ nm) of the ethyl acetate soluble compounds from an acetone-water (7:3 v/v) extract (EAF) from the rhizomes of *L. brasiliense*. **1:** gallic acid (rt = 10.5 min); **2:** samarangenin A SA (rt = 25.6 min); **3:** epigallocatechin-3-O-gallate EGCG (rt = 33.0 min); **4:** samarangenin B SB (rt = 36.6 min) and their respective structures [15].

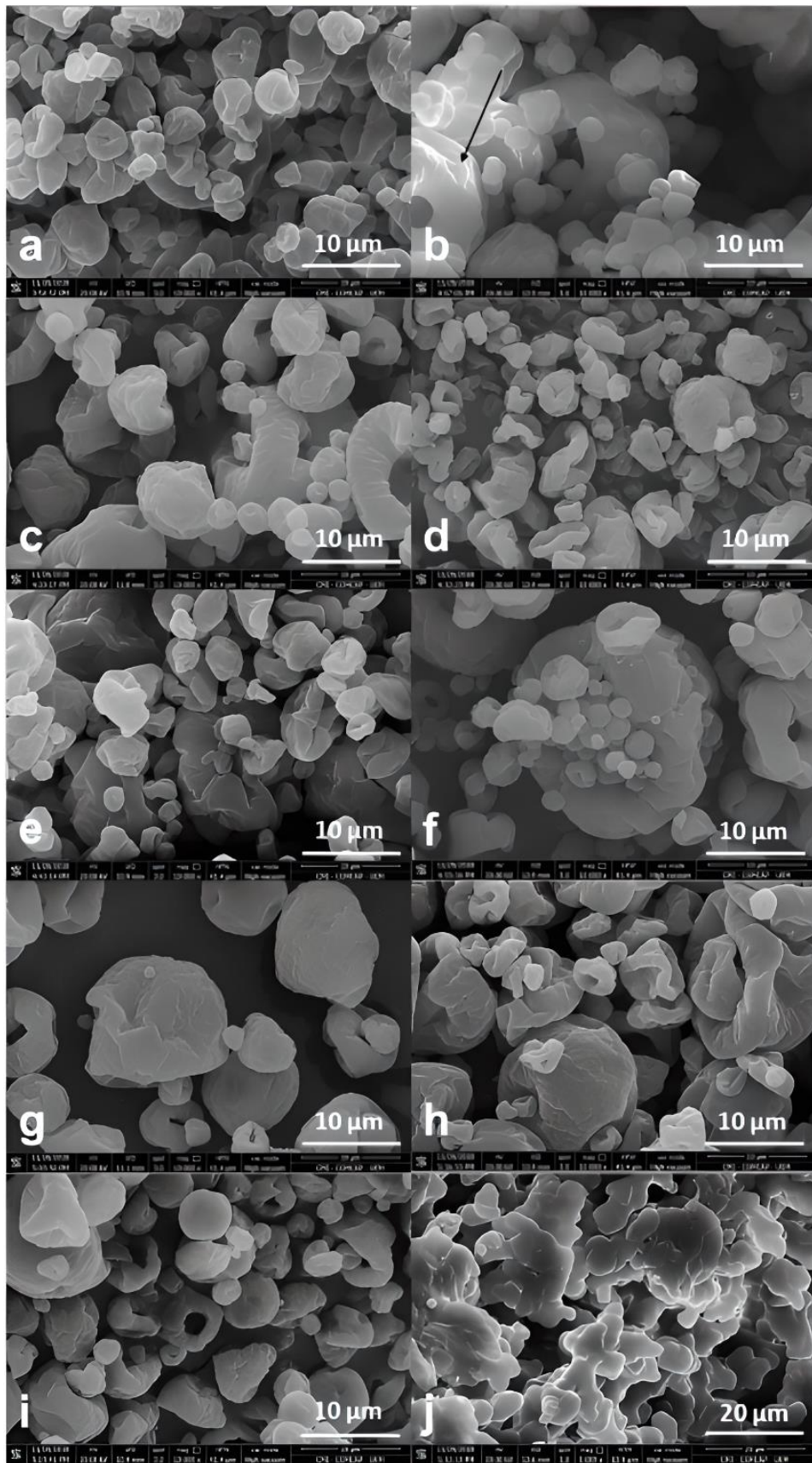
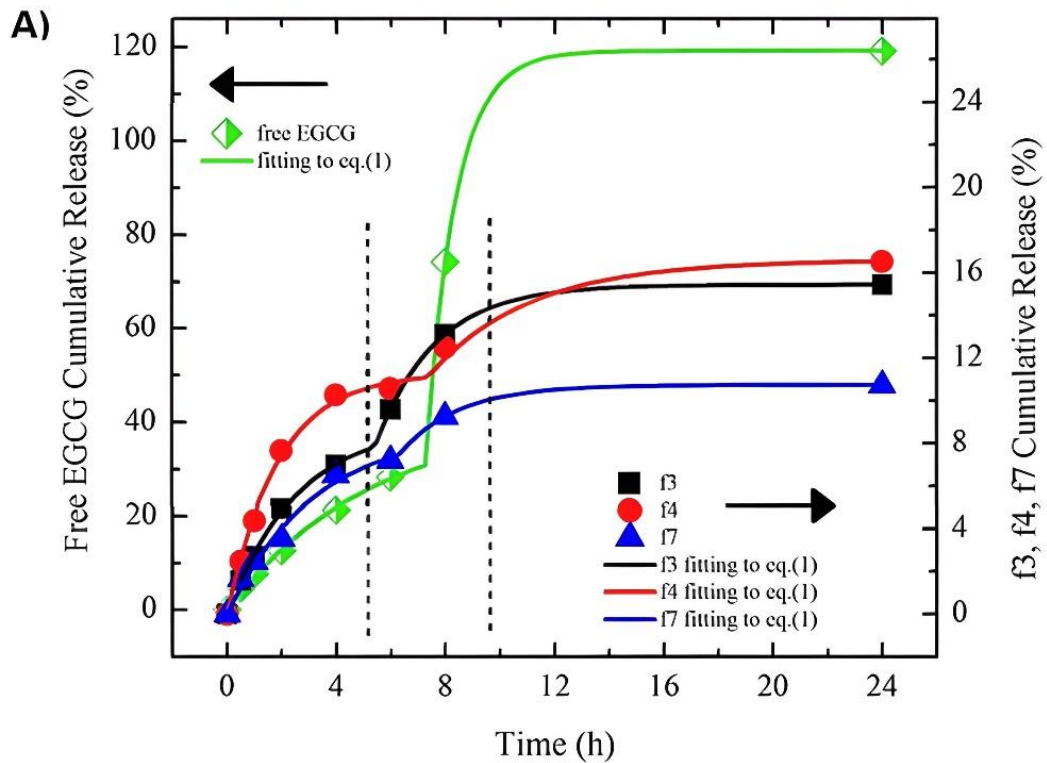


Figure 2. Different concentrations of *L. brasiliense* extract prepared by spray-drying technique induce the formation of polymeric adhesive microparticles. Scanning electron microscopy images (A) f1

prepared with 25 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, (B) f2 prepared with 50 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, (C) f3 prepared with 50 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, (D) f4 prepared with 25 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, (E) f5 prepared with 25 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, (F) f6 prepared with 50 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, (G) f7 prepared with 50 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, (H) f8 prepared with 25 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, (I) f9 prepared with 37.5 mL Surelease, 0.375 g polycarbophil and 1.5 g of *L. brasiliense* extract and (J) microparticle prepared with 37.5 mL Surelease, 0.375 g polycarbophil. Original magnification 10000 \times . Scale bars A-I) 10 μm , J) 20 μm .



B)

Fiting results to model eq.(1)

Formulation	$\tau_1(\text{h})$	$\tau_2(\text{h})$	R-sq.
Free EGCG	5 ± 1	1 ± 2	0.9996
f3	2.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.9994
f4	1.9 ± 0.2	3.7 ± 3	0.9961
f7	3.2 ± 0.7	2 ± 9	0.9872
Average (f3, f4, f7)	$\tau_1 \cong 2.6 \pm 0.7$	$\tau_2 \cong 2.6 \pm 0.9$	

Figure 3. Different concentrations of *L. brasiliense* extract containing epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG), Surelease and polycarbophil prepared by the spray-drying technique result in different

microparticles with particular release profiles of the EGCG marker *in vitro*. A) The curve graph presents the EGCG release profile by time of f3 (prepared with 50 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract), f4 (prepared with 25 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract) and f7 (prepared with 50 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract) and the free EGCG marker. B) The results for cumulative release rate are highlighted in the table in at least two stages for the permeation process. The fitting of the experimental data provided the values of τ_1 and τ_2 for the free EGCG marker, f3, f4, and f7. Results are expressed as the means of triplicate assays from three independent experiments.

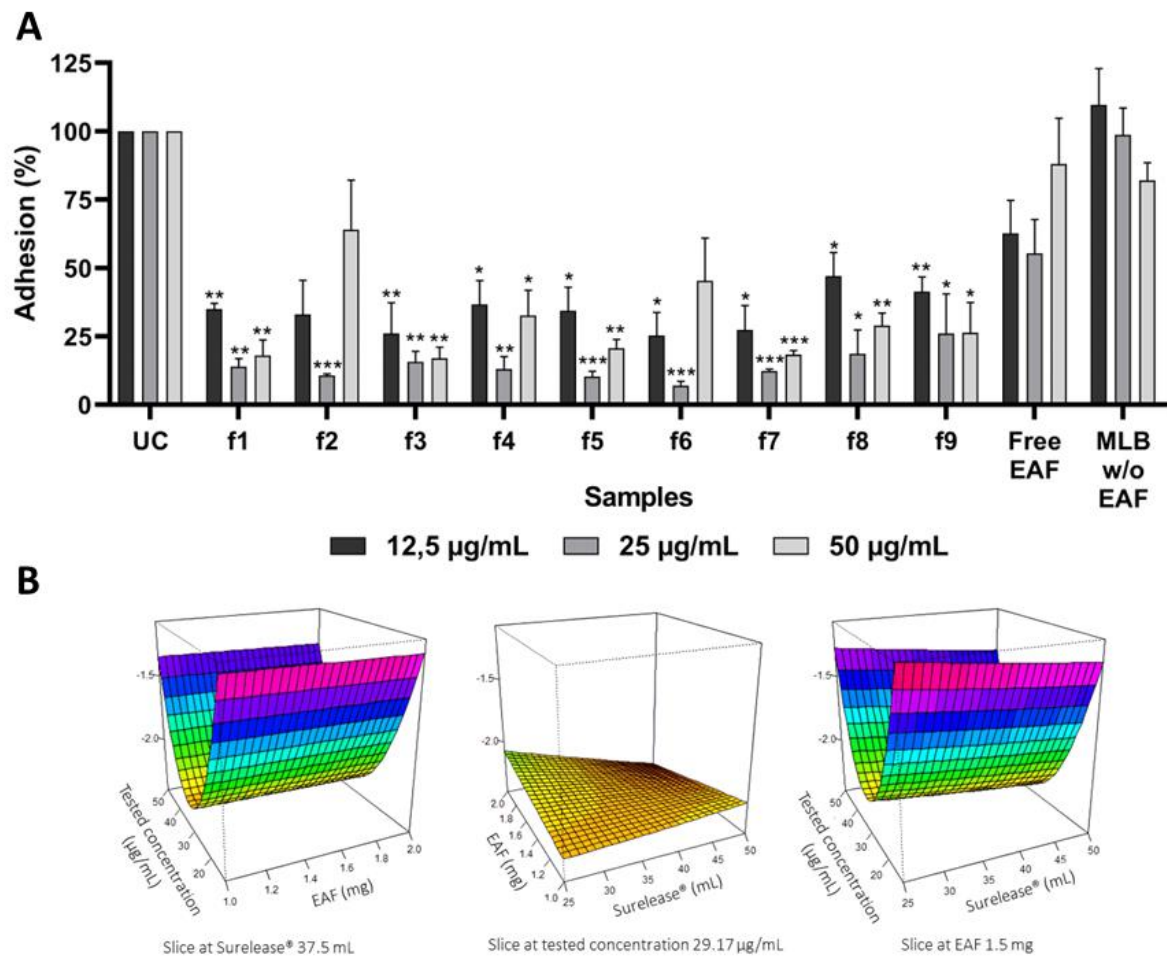


Figure 4. Mucoadhesive microparticles prepared with distinct concentrations of *L. brasiliense* extract, Surelease and polycarbophil protect eukaryotic KB cells from adhesion of *Porphyromonas gingivalis*. A) f1 to f9 mucoadhesive microparticles, *L. brasiliense* extract (EAF) and microparticles prepared with Surelease and polycarbophil (MLB without EAF) have different protective effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis* after 8-hour preincubation to eukaryotic KB cells. Untreated control = 100%; Positive control (EGCG: 25 µM) = 30% ± 9%. Results are expressed as the means ± SD of triplicate assays from three independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, related to untreated control. B) Response surface plots showing combined effects of *Porphyromonas gingivalis* adhesion to

eukaryotic KB cells in the presence of tested concentrations ($\mu\text{g/mL}$), *L. brasiliense* extract (g) and Surelease (mL) after preincubation to eukaryotic KB cells.

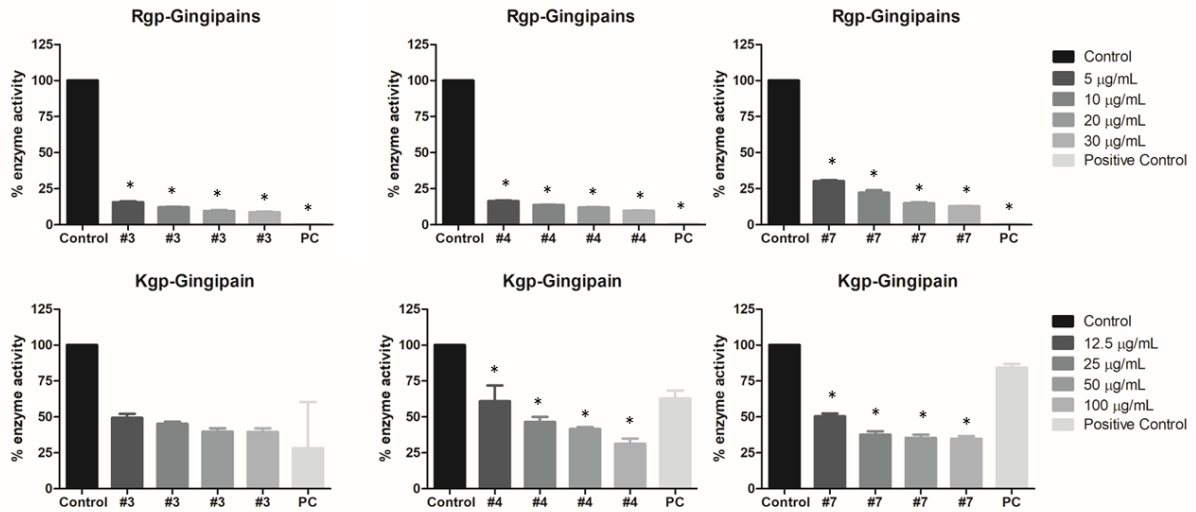


Figure 5. Relative influence of mucoadhesive microparticles prepared with distinct concentrations of *L. brasiliense* extract, Surelease and polycarbophil by spray-drying technique) on Rgp and Kgp gingipains protease activity in relation to untreated *Porphyromonas gingivalis*, that served as untreated control (UC). f3 (prepared with 50 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract), f4 (prepared with 25 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract) and f7 (prepared with 50 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract). Leupeptin acts as specific inhibitor of Rgp, and TLCK as a specific inhibitor of Kgp, served as positive control (PC). The untreated control was determined to be 100%. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate assays from three independent experiments. * $p < 0.001$, related to untreated control.

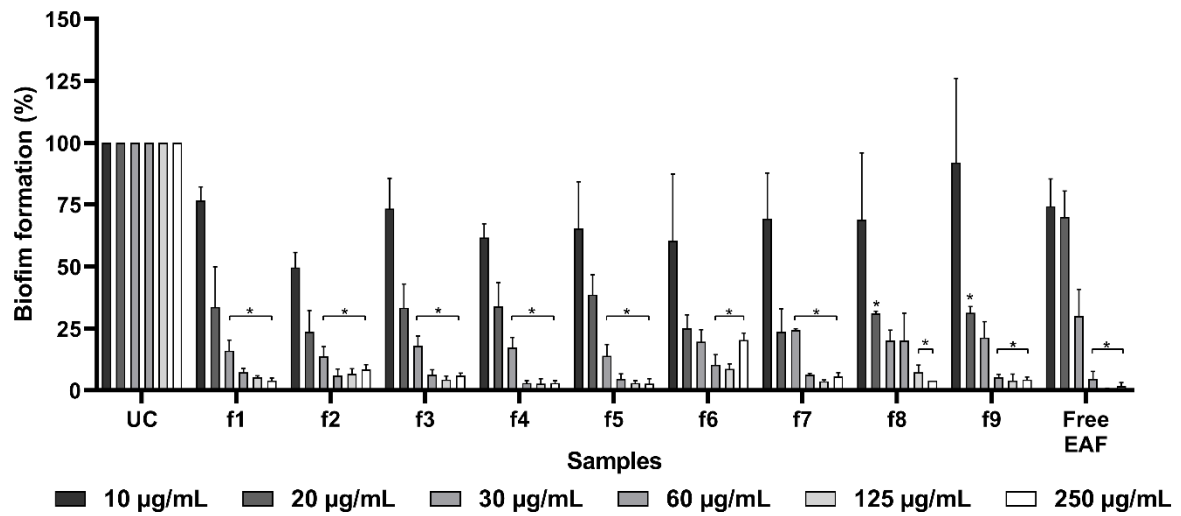


Figure 6. Distinct tested concentrations (10 to 250 µg/mL) of mucoadhesive microparticles (f1 to f9) prepared with different concentrations of *L. brasiliense* extract, Surelease and polycarbophil significantly reduce in vitro biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *L. brasiliense* extract not encapsulated in polymer matrix (free EAF) was also tested for comparison. The untreated control was determined to be 100% ± 6%. Results are expressed as the means ± SD of triplicate assays from three independent experiments. *p < 0.001, related to untreated control.

Samples	Surelease (mL) X ₁	Polycarbophil (g) X ₂	EAF (g) X ₃	DC ± SD (%)			PS ± SD (µm)	ZP ± SD (mV)	EE ± SD (%)		
				SA	EGCG	SB			SA	EGCG	SB
f1	25	0.25	1	1.27 ± 0.02	1.51 ± 0.05	2.11 ± 0.07	3.86 ± 2.18	- 45.9 ± 7.3	77.7 ± 1.4	82.9 ± 2.9	74.1 ± 2.3
f2	50	0.25	1	0.52 ± 0.02	0.73 ± 0.03	0.94 ± 0.04	4.43 ± 3.25	- 55.8 ± 6.4	58.2 ± 2.3	73.7 ± 3.4	61.2 ± 2.8
f3	50	0.25	2	1.50 ± 0.03	1.77 ± 0.04	2.48 ± 0.04	5.64 ± 3.52	- 32.6 ± 4.1	90.9 ± 1.8	96.6 ± 2.3	86.1 ± 1.3
f4	25	0.50	2	2.53 ± 0.04	3.11 ± 0.05	4.47 ± 0.07	4.15 ± 2.61	- 38.3 ± 6.5	89.1 ± 1.4	98.4 ± 1.5	90.3 ± 1.5
f5	25	0.50	1	1.04 ± 0.04	1.43 ± 0.05	2.03 ± 0.07	4.41 ± 2.70	- 40.8 ± 6.2	64.5 ± 2.6	80.0 ± 2.9	72.3 ± 2.6
f6	50	0.50	1	0.68 ± 0.02	0.86 ± 0.03	1.32 ± 0.05	4.76 ± 3.29	- 51.9 ± 7.9	78.0 ± 2.1	88.4 ± 3.1	86.4 ± 3.6
f7	50	0.50	2	1.11 ± 0.04	1.46 ± 0.03	2.17 ± 0.05	5.86 ± 3.52	- 23.9 ± 4.7	68.4 ± 2.3	80.2 ± 1.8	76.2 ± 1.8
f8	25	0.25	2	1.91 ± 0.07	0.86 ± 0.03	3.45 ± 0.14	5.60 ± 3.34	- 36.2 ± 11.2	66.2 ± 2.5	26.9 ± 0.9	68.6 ± 2.8
f9 [C]	37.5	0.375	1.5	0.98 ± 0.04	1.35 ± 0.06	2.06 ± 0.39	4.40 ± 2.55	- 43.5 ± 4.3	60.2 ± 2.4	74.0 ± 3.5	71.2 ± 3.2

Table 1. Matrix of factorial design $2^3 + 1$ for microparticles containing Surelease, polycarbophil solution and EAF and the resulting drug content of active compounds from EAF (DC), particle size (PS), zeta potential (ZP) and the respective entrapment efficiency (EE).

Supporting information

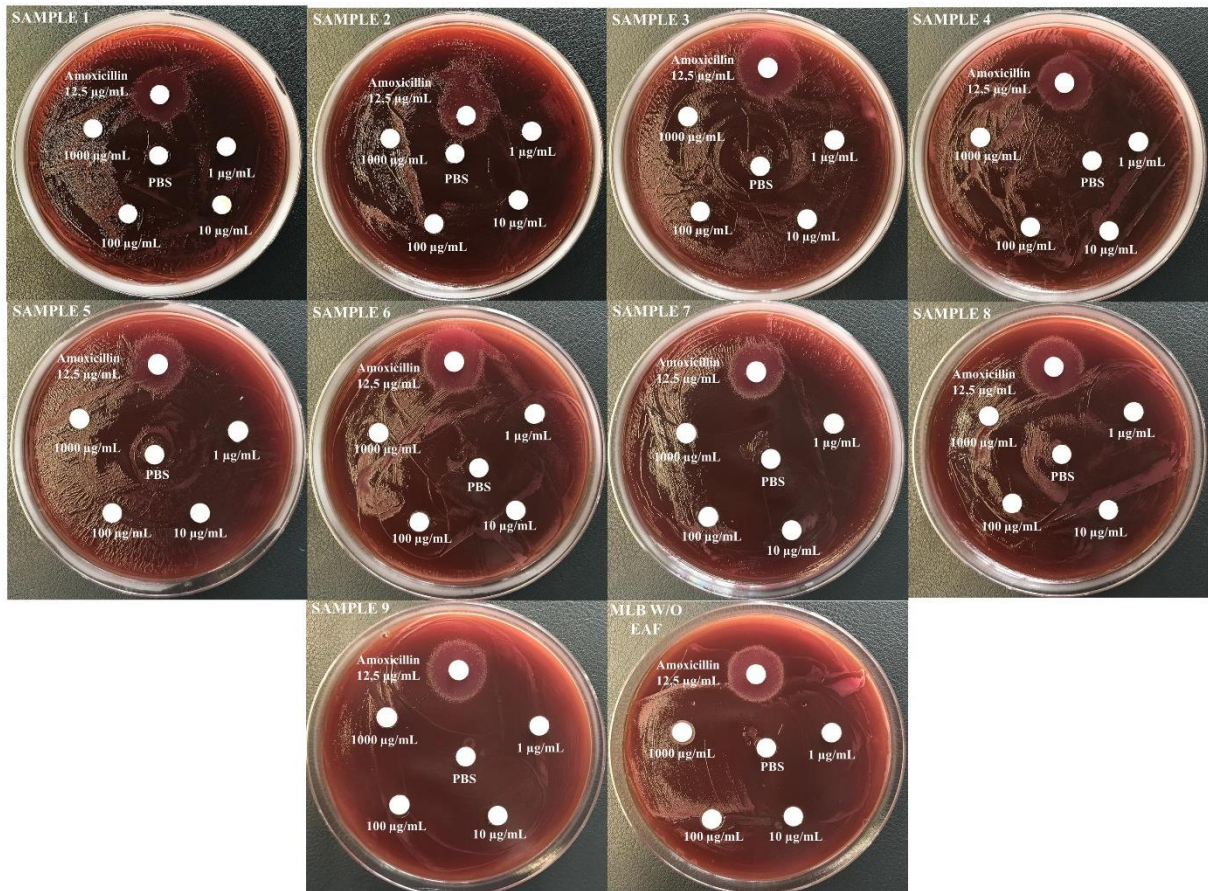


Figure 1S. Different concentrations of *L. brasiliense* extract prepared by spray-drying technique have no toxicity against *Porphyromonas gingivalis* in agar diffusion test. Agar diffusion images Sample 1) f1 prepared with 25 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, Sample 2) f2 prepared with 50 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, Sample 3) f3 prepared with 50 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, Sample 4) f4 prepared with 25 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, Sample 5) f5 prepared with 25 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, Sample 6) f6 prepared with 50 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 1 g of *L. brasiliense* extract, Sample 7) f7 prepared with 50 mL Surelease, 0.50 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, Sample 8) f8 prepared with 25 mL Surelease, 0.25 g polycarbophil and 2 g of *L. brasiliense* extract, Sample 9) f9 prepared with 37.5 mL Surelease, 0.375 g polycarbophil and 1.5 g of *L. brasiliense* extract and MLB without EAF) microparticle prepared with 37.5 mL Surelease, 0.375 g polycarbophil.

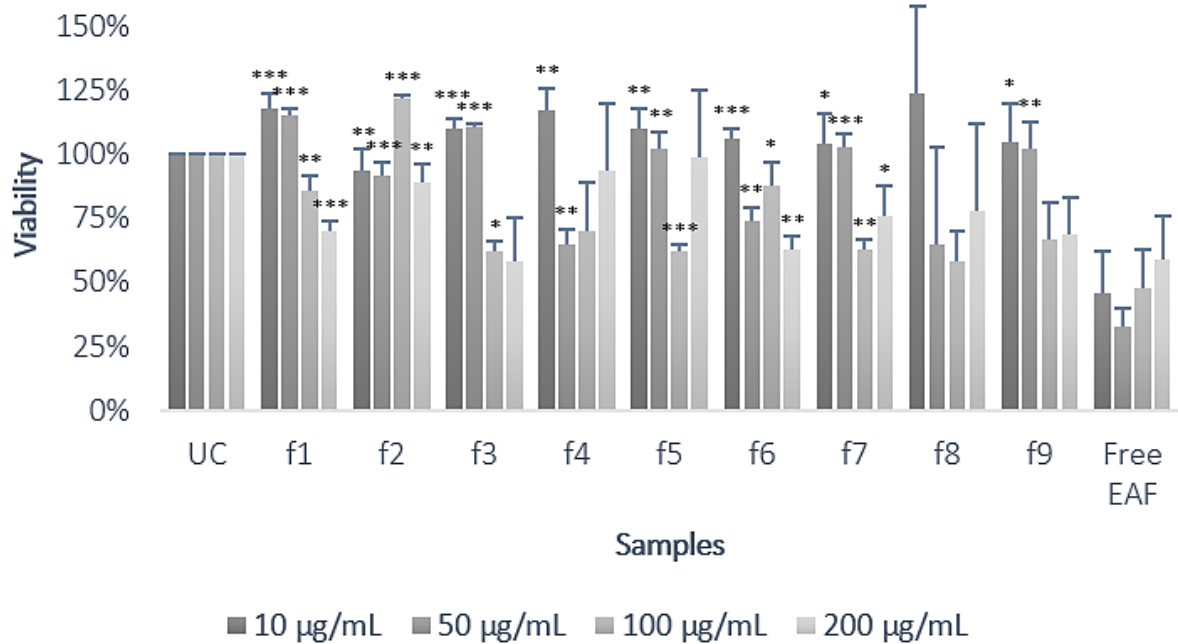


Figure 2S. Relative viability (MTT assay) of eukaryotic KB cells after 24 h treatment with mucoadhesive microparticles prepared with distinct concentrations of *Limonium brasiliense* extract, Surelease and polycarbophil (f1 to f9) and *Limonium brasiliense* extract not encapsulated in polymer matrix (free EAF). Data are related to the untreated control (UC = 100 %). Concentrations are related to the amount of EAF in the microparticles, resp. for the free EAF. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate assays from three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, related to UC.

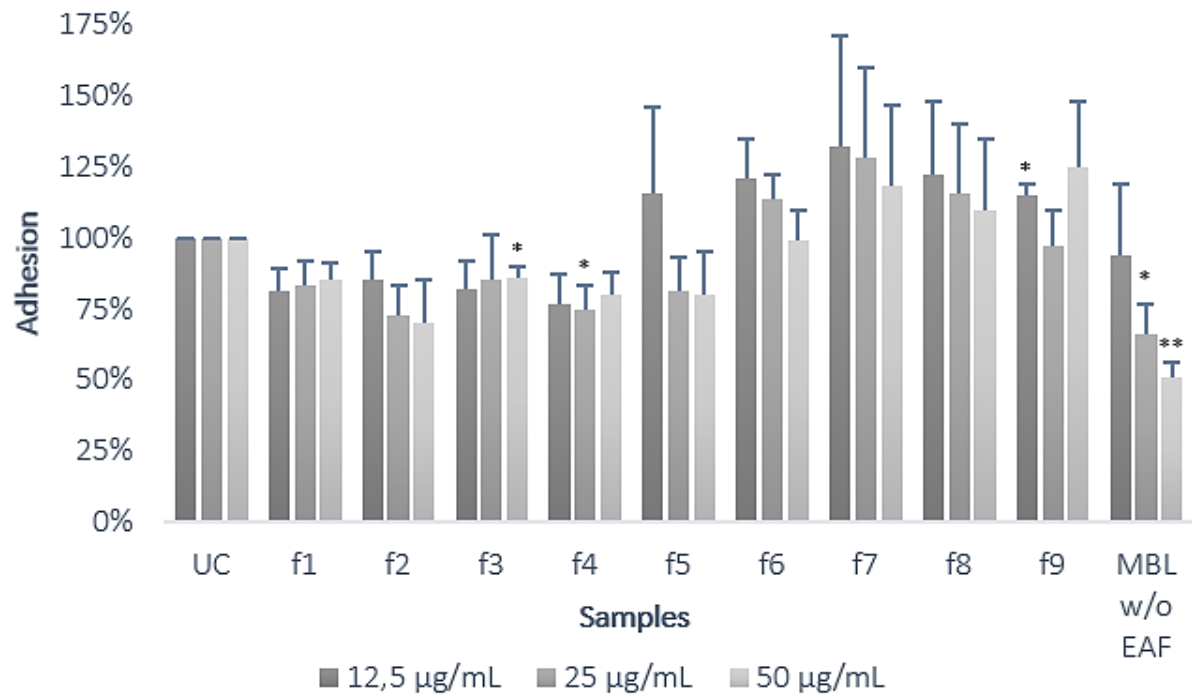


Figure 3S. Effect of the mucoadhesive microparticles prepared with distinct concentrations of *Limonium brasiliense* extract, Surelease and polycarbophil (f1 to f9) and *Limonium brasiliense* extract not encapsulated in polymer matrix (MBL w/o EAF) on the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to eukaryotic KB cells within co-incubation protocol. UC: untreated control, PC: EGCG 25 µM. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate assays from three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, related to UC.

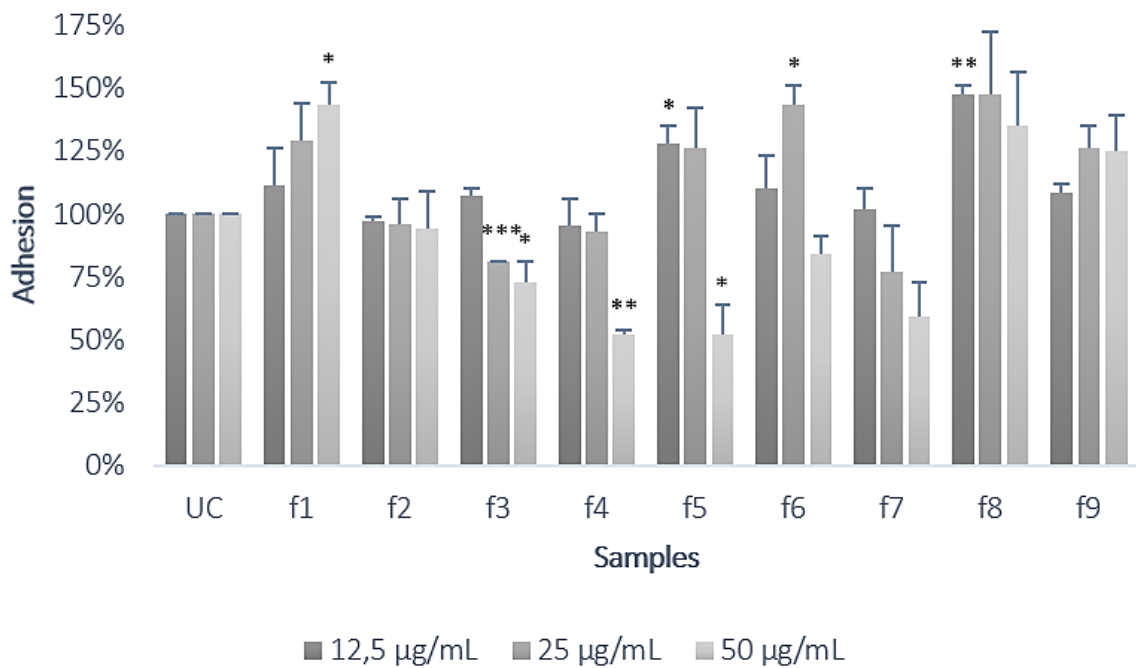


Figure 4S. Effect of the mucoadhesive microparticles prepared with distinct concentrations of *Limonium brasiliense* extract, Surelease and polycarbophil (f1 to f9) with released *Limonium brasiliense* extract (8 h previous release in EMEM medium) on the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to eukaryotic KB cells. UC: untreated control, PC: EGCG 25 µM. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate assays from three independent experiments. Significantly different (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) from the untreated control.

E-mail de aceite “*Planta Medica - Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research*”, ISSN: 0032-0943.

De: Planta Medica <onbehalf@manuscriptcentral.com>
Data: 22 de maio de 2022 04:19:07 BRT
Para: mello@uem.br
Cc: ahensel@uni-muenster.de, t.beikler@uke.de, Elke.Heiss@univie.ac.at
Assunto: **Planta Medica - Decision on PLAMED-2022-02-0143-OP.R2**
Responder A: fuerst@em.uni-frankfurt.de

22-May-2022

Dear Professor Mello,

It is a pleasure to accept your revised manuscript entitled "Microstructured polymer system containing proanthocyanidin-enriched extract from *Limonium brasiliense* as a prophylaxis strategy to prevent recurrence of *Porphyromonas gingivalis*" in its current form for publication in *Planta Medica*.

Thank you for your fine contribution. I sincerely hope that you have enjoyed your publication experience and that you will consider submitting future manuscripts to the journal. I look forward to your continued contribution to the Journal.

The manuscript will now be forwarded to the publisher (Thieme) who will be responsible for publication matters. We will contact you with the galley proofs as soon as they are ready.

In order to be able to forward your contribution into the typesetting process, it is necessary that the rights of use for all figures included in your manuscript are clarified. For legal reasons, we therefore need to ask you some important questions, which are listed below. Very important: Please contact katharina.lottermoser@thieme.de if you have any questions about the use of images.

Have you created these figures yourself?

- If yes: does a third party hold any rights of use (e.g. your employer or another publishing house where the illustrations have already been published)?

In these cases, please use the attached form and ask for permission.

Did somebody else create the figures?

- Unfortunately we cannot use these figures in this case.
- The reason is that we do not obtain the rights to the extent required, even if a license fee is paid.

Please do not pay any license fees on your own (for example with RightsLink / Copyright Clearance Center) without prior consultation with us. The standard contracts of "Creative Commons" do not help us here, therefore we highly recommend that you contact us in case of any questions you might have.

As you might know, *Planta Medica* is the official journal of GA, the "Society for Medicinal Plants and Natural Products Research". You are kindly invited to join the Society. For further information please visit www.ga-online.org.

Sincerely,

Professor Robert Fürst
 Editor-in-Chief *Planta Medica*
fuerst@em.uni-frankfurt.de

CAPÍTULO 2: Uso de polímero microestruturado com *Limonium brasiliense* e respectivas micropartículas

RESUMO: A invenção se refere ao uso de polímero microestruturado com *Limonium brasiliense*, onde se desenvolveram micropartículas contendo uma fração dessa planta, resultando em veículo ideal para se levar o fármaco ao ponto de aplicação com ênfase ao tratamento/prevenção da recorrência bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* e cuidado oral e periodontite.

CHAPTER 2: Use of microstructured polymer with *Limonium brasiliense* and respective microparticles

ABSTRACT: The invention refers to the use of a microstructured polymer with *Limonium brasiliense*, where microparticles containing a fraction of this plant were developed, resulting in an ideal vehicle to take the drug to the point of application with emphasis on the treatment/prevention of bacterial recurrence of *Porphyromonas gingivalis* and care oral and periodontitis.



17/11/2020

870200145342

20:47



29409161926258567

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição
de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 023491 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: SALUTEM FARMACÊUTICA LTDA.

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 35675352000121

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Microempresa assim definida em lei

Endereço: Avenida Colombo, nº 5.790 - QUADRA90 DATA 17/18 BLOCO B09
SALA SEDE ENCUBADORA UEMBOX 04 DT1/4-6/18/20/21
Cidade: Maringá

Estado: PR

CEP: 87030121

País: Brasil

Telefone:

Fax:

E-mail: raquelisolani@gmail.com

Dados do Pedido

Natureza Patente:	10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):	USO DE POLÍMERO MICROESTRUTURADO COM <i>LIMONIUM BRASILIENSE</i> E RESPECTIVAS MICROPARTÍCULAS Resumo: O seguinte resumo para invenção se refere ao uso de polímero microestruturado com <i>Limonium brasiliense</i> , onde se desenvolveram micropartículas contendo uma fração dessa planta, resultando em veículo ideal para se levar o fármaco ao ponto de aplicação com ênfase ao tratamento/prevenção da recorrência bacteriana de <i>Porphyromonas gingivalis</i> e cuidado oral e periodontite.

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Edmila Adriana Denig
Número OAB: 76895 PR
Número API:
CPF/CNPJ: 03606467940
Endereço: Av. Dr. Luiz Teixeira Mendes, 1184, Sala 03 - Zona 05
Cidade: Maringá
Estado: PR
CEP: 87015-001
Telefone: (44) 3034-2349
Fax:
E-mail: edmila@atlaspi.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5**Nome: JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO****CPF:** 27833194972**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Rua Marquês de Abrantes, 53, Apartamento 301, Zona 07**Cidade:** Maringá**Estado:** PR**CEP:** 87020-170**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****E-mail:** contato@atlaspi.com.br**Inventor 2 de 5****Nome: RAQUEL ISOLANI LUVIZOTTO****CPF:** 04591306925**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** Av. Horácio Raccanello, 5410, AP 308, Zona 07**Cidade:** Maringá**Estado:** PR**CEP:** 87020-035**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****E-mail:** contato@atlaspi.com.br

Inventor 3 de 5**Nome:** LARISSA VALONE SANGA**CPF:** 04692124970**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** Avenida São Paulo, 3133, Apartamento 104**Cidade:** Maringá**Estado:** PR**CEP:** 87005-040**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****E-mail:** contato@atlaspi.com.br**Inventor 4 de 5****Nome:** FERNANDA PILATTI DA SILVA**CPF:** 03208604181**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** Avenida Prudente de Moraes, 493, Apartamento 203, Zona 07**Cidade:** Maringá**Estado:** PR**CEP:** 87020-010**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****E-mail:** contato@atlaspi.com.br

Inventor 5 de 5

Nome: DANIELA CRISTINA DE MEDEIROS ARAÚJO

CPF: 02679103980

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Trabalhador dos serviços de saúde

Endereço: Rua Pioneiro Rinzo Guinoza, 19A, Jardim Dourados

Cidade: Maringá

Estado: PR

CEP: 87040-615

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

E-mail: contato@atlaspi.com.br

DOCUMENTOS ANEXADOS

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	descritivo.pdf
Reivindicação	reivindicações.pdf
Resumo	resumo patente.pdf
Procuração	Procuração pdf.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante (2).pdf

Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

USO DE POLÍMERO MICROESTRUTURADO COM *LIMONIUM BRASILIENSE* E RESPECTIVAS MICROPARTÍCULAS¹³

RESUMO

O seguinte resumo para invenção se refere ao uso de polímero microestruturado com *Limonium brasiliense*, onde se desenvolveram micropartículas contendo uma fração dessa planta, resultando em veículo ideal para se levar o fármaco ao ponto de aplicação com ênfase ao tratamento/prevenção da recorrência bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* e cuidado oral e periodontite.

REIVINDICAÇÕES:

1- USO DE POLÍMERO MICROESTRUTURADO, caracterizado pelo uso de micropartículas contendo uma fração de *Limonium brasiliense*, resultando em veículo para se levar o fármaco ao ponto de aplicação com ênfase ao:

- a) - tratamento/prevenção da recorrência bacteriana de *Porphyromonas gingivalis*; e
- b) - cuidado oral e periodontite.

2- MICROPARTÍCULAS, de acordo com a reivindicação 01 e caracterizado por ditas micropartículas serem capazes de revestir essa fração do extrato e torná-lo muito mais ativo.

3- MICROPARTÍCULAS, de acordo com a reivindicação 02 é caracterizado por conseguir reduzir as doses de extrato que seriam aplicadas, tornando essas micropartículas mucoadesivas, para que fiquem aderidas à mucosa liberando esse extrato no local de infecção.

¹³ O TRL, ou seja, *Technology Readiness Level*, é um método criado pela NASA para avaliar o Nível de Maturidade Tecnológica de um projeto em desenvolvimento. Este método divide-se em 9 níveis, dentre os quais, os projetos que estão sendo inicialmente idealizados são classificados como 1 e aqueles que já tem uma tecnologia estabelecida em ambiente operacional e produtivo, como 9. Assim, ao avaliar o projeto de desenvolvimento de micropartículas mucoadesivas contendo *Limonium brasiliense* no tratamento/prevenção da recorrência bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* e cuidado oral e periodontite, entende-se que ainda está nos níveis iniciais do TRL. Mais especificamente, acredita-se que o projeto esteja na etapa TRL 3, descrita pela necessidade e execução de estudos analíticos e/ou laboratoriais para avaliar se a tecnologia é viável e pronta para prosseguir para o processo de desenvolvimento. Assim sendo, ainda há necessidade de realização de testes adicionais, avaliação da performance da aplicação, criação de um protótipo, qualificação da tecnologia e futura implementação.

AGRADECIMENTOS



EQUIPE PALAFITO!!!

CONTATO:

Fernanda Pilatti da Silva
lattes.cnpq.br/5310780216364439
E-mail: pilattifernanda@gmail.com
LinkedIn: [fernandapilatti](https://www.linkedin.com/in/fernandapilatti)
<http://sites.uem.br/palafito/>