



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

LAERTE OLIVEIRA BARRETO NETO

**EFEITO IMUNOMODULADOR E ANTIMICROBIANO
DOS EXTRATOS DE *LIPPIA ALNIFOLIA* E *VATAIREA
MACROCARPA* NA PERIODONTITE**

Feira de Santana, BA
2019

LAERTE OLIVEIRA BARRETO NETO

**EFEITO IMUNOMODULADOR E ANTIMICROBIANO
DOS EXTRATOS DE *LIPPIA ALNIFOLIA* E *VATAIREA
MACROCARPA* NA PERIODONTITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Soraya Castro Trindade
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Angelica Lucchese

Feira de Santana, BA
2019

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

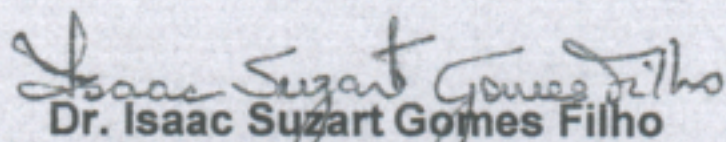
B263e Barreto Neto, Laerte Oliveira
Efeito imunomodulador e antimicrobiano dos extratos de *Lippia
alnifolia* e *Vatairea macrocarpa* na periodontite / Laerte Oliveira Barreto
Neto. - 2019.
135 f.: il.

Orientadora: Soraya Castro Trindade.
Coorientadora: Angelica Lucchese.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

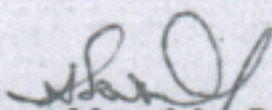
1. Plantas medicinais .2. *Lippia alnifolia*. 3. *Vatairea Macrocarpa*. 3.
Periodontite.. I. Trindade, Soraya Castro, orient. II. Lucchese, Angelica,
coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 633.88:616.314.17-008.1

BANCA EXAMINADORA

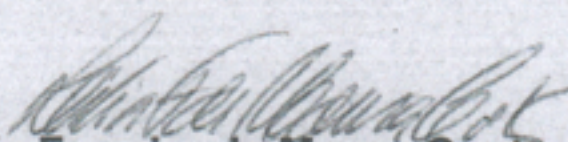

Dr. Isaac Suzart Gomes Filho

(Universidade Estadual de Feira de Santana)



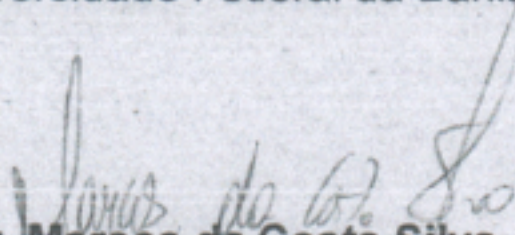
Dr.^a Viviane Almeida Sarmento

(Universidade Estadual de Feira de Santana)



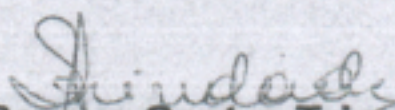
Dr.^a Lilia Ferreira de Moura Costa

(Universidade Federal da Bahia)



Dr. Marcos da Costa Silva

(Universidade do Estado da Bahia)



Dr.^a Soraya Castro Trindade

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Feira de Santana – BA
2019

Dedico este trabalho à minha esposa Juliana e aos meus filhos Gabriel e Bernardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, que sempre me dá forças para prosseguir. À minha orientadora, professora Soraya Castro Trindade, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela disponibilidade, paciência e compreensão em todos os momentos e por contribuir com minha formação profissional, desde a graduação. À minha co-orientadora, professora Angélica Lucchese, por sua relevante participação na execução deste estudo. À minha esposa Juliana, grande incentivadora, e aos meus filhos Gabriel e Bernardo, razões da minha vida. À toda a minha família, pelo apoio de sempre. Aos colegas, grandes colaboradores, que vivenciaram comigo este momento, em especial Rebeca, Thais e Jurandi. À toda “família Nuppiim” (professores e alunos) pela convivência durante tantos anos e pela significativa colaboração na execução deste trabalho e na minha formação profissional.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é nada, senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O uso de fitoterápicos tem se tornado um recurso valioso no seu tratamento de afecções bucais, como infecções fúngicas e bacterianas. Uma das doenças infecciosas e inflamatórias mais prevalentes na boca é a periodontite, que se não tratada, pode levar à perda dentária. Este estudo avaliou o potencial imunomodulador e antimicrobiano do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (LA) e *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke (VM). A avaliação imunológica foi realizada por imunoenensaio, após cultivo das células do sangue periférico de indivíduos com e sem periodontite com o extrato da planta e o extrato do periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* (PG). A atividade antimicrobiana foi testada com concentração inibitória mínima e ensaio de difusão em disco. O extrato de LA inibiu a produção de IL-13, IL-6 e IFN- γ , tanto em relação com a concentração basal produzida pelas células, quanto com a concentração produzida pelas células co-cultivadas com o extrato de PG. O co-cultivo de VM com PG promoveu uma redução nos níveis de IL-1 β , IL-13, IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-17. O extrato de LA apresentou atividade bacteriostática para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, fungistática para *Candida albicans* e fungicida para *Candida glabrata*. VM apresentou atividade bactericida para a espécie *Micrococcus luteus* e bacteriostática demais bactérias, bem como atividade fungistática para *Candida albicans* e fungicida para *Candida glabrata*. Os extratos de LA e VM são promissores na regulação da produção de citocinas em a antígenos de PG e no controle de microrganismos bucais.

Palavras-chave: Citocinas, Doenças Periodontais, Plantas Medicinais, Anti-Infeciosos.

ABSTRACT

The use of herbal medicines has become a valuable resource in its treatment of oral disorders such as fungal and bacterial infections. One of the most prevalent infectious and inflammatory diseases in the mouth is periodontitis, which if left untreated, can lead to tooth loss. This study evaluated the immunomodulatory and antimicrobial potential of *Lippia alnifolia* Mart & Schauer (LA) and *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (VM) leaf extract. Immunological evaluation was performed by immunoassay after culturing peripheral blood cells of individuals with and without periodontitis with the plant extract and the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* (PG) extract. Antimicrobial activity was tested with minimal inhibitory concentration and disk diffusion assay. LA extract inhibited the production of IL-13, IL-6 and IFN- γ , both in relation to the basal concentration produced by cells and the concentration produced by cells co-cultured with PG extract. Co-cultivation of MV with PG promoted a reduction in IL-1 β , IL-13, IL-6, IFN- γ , IL-10 and IL-17 levels. The LA extract showed bacteriostatic activity for *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella choleraesuis*, fungistatic for *Candida albicans* and fungicide for *Candida glabrata*. VM showed bactericidal activity for *Micrococcus luteus* species and bacteriostatic other bacteria, as well as fungistatic activity for *Candida albicans* and fungicide for *Candida glabrata*. LA and VM extracts are promising in regulating cytokine production in PG antigens and in controlling oral microorganisms.

Keywords: Cytokines, Periodontal Diseases, Plants, Medicinal, Anti-infective agents.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
REVISÃO DE LITERATURA	9
- LINHAGENS MICROBIANAS	10
- IMUNOPATOGÊNESE DA PERIODONTITE	14
- TRATAMENTO DA PERIODONTITE	16
- <i>LIPPIA ALNIFOLIA</i> MART & SCHAUER	17
- <i>VATAIREA MACROCARPA</i> (BENTH.) DUCKE	18
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>LIPPIA ALNIFOLIA</i> MART. & SCHAUER NA PERIODONTITE.	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1.1 INTRODUÇÃO	22
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
1.2.1 ASPECTOS ÉTICOS	23
1.2.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES DA PESQUISA	23
1.2.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	23
1.2.4 CALIBRAÇÃO DO PESQUISADOR PARA A REALIZAÇÃO DO EXAME PERIODONTAL	24
1.2.5 EXAME PERIODONTAL	24
1.2.6 DIAGNÓSTICO DA PERIODONTITE	24
1.2.7 CULTURA DE CÉLULAS	25
1.2.8 OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>LIPPIA ALNIFOLIA</i>	25
1.2.9 DOSAGEM DE PROTEÍNA	25
1.2.10 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR	26
1.2.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	26
1.1.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
1.3 RESULTADOS	27
1.3.1 DESCRITORES CLÍNICOS	27
1.3.2 CITOCINAS	28
1.4 DISCUSSÃO	30
1.5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>VATAIREA MACROCARPA</i> (BENTH.) DUCKE NA PERIODONTITE.	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
2.1 INTRODUÇÃO	38
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.2.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
2.2.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES DA PESQUISA	39
2.2.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	40

2.2.4	EXAME PERIODONTAL	40
2.2.5	DIAGNÓSTICO DA PERIODONTITE	40
2.2.6	CULTURA DE CÉLULAS	41
2.2.7	OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>VATAIREA MACROCARPA</i>	41
2.2.8	DOSAGEM DE PROTEÍNA	41
2.2.9	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR	42
2.2.10	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	42
2.2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
2.3	RESULTADOS	43
2.4	DISCUSSÃO	45
2.5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	47
 CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>LIPPIA ALNIFOLIA</i> MART. & SCHAUER E <i>VATAIREA MACROCARPA</i> (BENTH.) DUCKE		52
	RESUMO	52
	ABSTRACT	53
3.1	INTRODUÇÃO	54
3.2	REVISÃO DE LITERATURA	55
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.3.1	OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE <i>LIPPIA ALNIFOLIA</i> MART. & SCHAUER E <i>VATAIREA MACROCARPA</i> (BENTH.) DUCKE	57
3.3.2	TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO	57
3.3.3	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	58
3.4	RESULTADOS	59
3.5	DISCUSSÃO	62
3.6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
 CONCLUSÃO GERAL		70
 ANEXO: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		86
 APÊNDICES		94
	A. FICHA DE ANAMNESE	94
	B. PERIOGRAMA	97
	C. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	98
	D. TABELA SUPLEMENTAR 1	101
	E. TABELA SUPLEMENTAR 2	103
	F. ARTIGO SUMETIDO À REVISTA PRINCÍPIA IFPB	105
	G. SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA PRINCÍPIA IFPB	115
	H. ARTIGO SUMETIDO À REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ	116
	I. SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ	133

INTRODUÇÃO GERAL

A periodontite é uma doença inflamatória caracterizada pela perda de tecidos de sustentação, reabsorção do osso alveolar e formação de bolsas periodontais (LIMA *et al.*, 2008). Resulta da interação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, agentes microbianos, fatores ambientais e genéticos (FINOTI *et al.*, 2017).

É iniciada por um biofilme com uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica, com a presença de “patógenos – chave” que são encontradas em baixa quantidade, mas com ação em toda a comunidade microbiana, sendo críticas para o desenvolvimento de disbiose. O exemplo melhor documentado é o de *Porphyromonas gingivalis* (HAJISHENGALLIS, LAMONT, 2014), uma bactéria anaeróbia Gram negativa que possui diversos fatores de virulência capazes de interagir com o sistema imune do hospedeiro (TRINDADE *et al.*, 2011;2012;2013; CARVALHO-FILHO *et al.*, 2013;2016;2019; SANTOS-LIMA *et al.*, 2019a;2019b).

A periodontite tem sido investigada como fator de risco para agravos sistêmicos e desfechos indesejáveis, como parto prematuro e nascimento de bebês com baixo peso (TRINDADE *et al.*, 2018; TRINDADE *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2015), pré-eclâmpsia (KUMAR *et al.*, 2014), diabetes (GALVIS, ZULUAGA, SALDARRIAGA, 2012), osteoporose (PASSOS *et al.*, 2010), síndrome metabólica (GOMES-FILHO *et al.*, 2016), pneumonia (GOMES-FILHO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2011), asma (SOLEDADE-MARQUES *et al.*, 2017), infarto agudo do miocárdio (GOMES-FILHO *et al.*, 2017) doença renal crônica (NUNES *et al.*, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2011), dentre outras.

Um dos seus desfechos indesejáveis na cavidade bucal é a perda progressiva de dentes, caso o tratamento adequado não seja realizado (TALVAN *et al.*, 2017), gerando repercussões negativas na qualidade de vida dos indivíduos, prejudicando o desempenho de atividades cotidianas e sociais. A rotina diária do indivíduo é alterada, sofrendo modificações pela interferência na fala, alterações comportamentais, dificuldades de mastigação, no convívio social e na autoestima (PASSOS-SOARES *et al.*, 2018).

De acordo com o último levantamento epidemiológico de saúde bucal, realizado em 2010, no Brasil, a prevalência da doença periodontal “moderada a grave” em adultos foi de 15,3% e para a condição “grave” foi de 5,8%. Adultos com idade mais avançada, de cor de pele parda, sexo masculino, menor renda familiar e menor escolaridade apresentaram maiores chances de desenvolver a periodontite (VETTORE, MARQUES, PERES, 2013). Além disso,

as condições periodontais nas regiões Norte e Nordeste foram piores em todas as idades e os grupos etários, quando comparadas com as demais regiões (BRASIL, 2012). Neste panorama, a busca por novas alternativas que, com baixo custo, auxiliem no controle da periodontite, pode gerar um impacto positivo às políticas públicas de saúde bucal.

No Brasil, um país de biodiversidade extremamente vasta (GONÇALVES, PINTO 2013) foi aprovada, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) desencadeando o desenvolvimento de políticas, programas e projetos em todas as instâncias governamentais, pela institucionalização dessas práticas no SUS. (BRASIL, 2006).

No nordeste, regiões associadas à pobreza financeira, como o bioma caatinga, possuem um grande número de plantas com potencial biotecnológico a serem estudadas (LUCENA *et al.*, 2013) podendo representar uma fonte de tratamento eficazes e acessíveis à população (JUIZ, ALVES, BARROS, 2010).

Existe uma espécie de *Lippia*, encontrada na Chapada Diamantina, denominada *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (CNCFLORA, 2012). Esta planta tem sido investigada quanto à ação antibacteriana de seu extrato metanólico, com resultados que fortalecem o seu uso popular contra dermatite, infecções vaginais e como anti-séptico bucal (PINTO *et al.*, 2013), além de propriedades atividade espasmolítica, antitussígena e expectorante (VILELA, 2018). No cerrado e nordeste brasileiro, uma árvore denominada *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke, é usada popularmente em indivíduos com diabetes (SANTOS *et al.*, 2016). Possui propriedades antimicrobiana (VALADARES, 2017; MATOS *et al.*, 1988) antiulcerogênica (JESUS, 2007), hipoglicemiante (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Nesta perspectiva, o presente projeto tem como objetivo avaliar o efeito imunomodulador e antimicrobiano do extrato das espécies vegetais *Lippia alnifolia* e *Vatairea macrocarpa* sobre sangue total de voluntários com e sem periodontite.

REVISÃO DE LITERATURA

- Linhagens microbianas

A microbiota bucal é composta por centenas de espécies diferentes de bactérias, fungos, protozoários e arqueias (antigamente chamadas de arqueobactérias) (ARDIZZONI *et al.*, 2018), cada um tendo um papel particular, mas interagindo fortemente uns com os outros e com o hospedeiro, na doença ou na saúde (SAMPAIO-MAIA *et al.*, 2016). Podem, por exemplo, proteger o indivíduo contra a colonização de micro-organismos extrínsecos, que inclusive podem afetar a saúde sistêmica. Por outro lado, as doenças bucais mais comuns são causadas por componentes desta microbiota, sendo que muitos deles se organizam em biofilmes (ARWEILER, NETUSCHIL, 2016).

Através da colonização de micro-organismos nas superfícies duras e macias (dentes, superfícies da língua e epitélio) da cavidade oral, forma-se o biofilme (STONE, XU, 2017). Nas comunidades microbianas bucais, as redes de múltiplas interações sinérgicas e antagônicas geram interdependências microbianas e conferem aos biofilmes uma resiliência a pequenas perturbações ambientais. Se as principais pressões ambientais excederem os limiares associados à saúde, a competitividade entre os micro-organismos bucais será alterada e a disbiose poderá ocorrer, aumentando o risco de doenças (MARSH, ZAURA, 2017).

Existem bactérias críticas para o desenvolvimento da disbiose, como o *Porphyromonas gingivalis*, que possui diversos fatores de virulência capazes de interagir com o sistema imune do hospedeiro. Diversos estudos têm documentado a sua relação no desenvolvimento de doenças bucais, como a periodontite (HAJISHENGALLIS, LAMONT, 2014; TRINDADE *et al.*, 2011; 2012; 2013; CARVALHO-FILHO *et al.*, 2013; 2016; 2019; SANTOS-LIMA *et al.*, 2019a; 2019b). Além da periodontite, os microrganismos bucais podem estar associados a outras doenças da cavidade oral, como cárie dentária, infecções endodônticas e câncer bucal (SAMPAIO-MAIA *et al.*, 2016).

O conhecimento sobre como os microorganismos interagem entre si, pode ser um fator chave para entender a etiologia e a progressão de diversas doenças (SAMPAIO-MAIA *et al.*, 2016). Além de complicações na cavidade bucal, existem situações, como nas infecções nosocomiais, em que microorganismos resistentes em pacientes com baixa imunidade podem levar a graves consequências.

As infecções nosocomiais (IN) apresentam alta incidência em hospitais e nas unidades de terapia intensiva (UTIs). Sabe-se que essas infecções são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes graves e estão associadas ao aumento do tempo de internação e ao custo hospitalar excessivo (ZARAGOZA, RAMÍREZ, LOPEZ-PUEYO, 2014).

Existem vários fatores de risco, incluindo o uso de cateteres e outros equipamentos invasivos, e certos grupos de pacientes - por exemplo, aqueles com trauma ou queimaduras - que são reconhecidos como mais suscetíveis à infecção nosocomial do que outros. A conscientização desses fatores e a adesão a medidas preventivas simples, como a higiene adequada das mãos, podem limitar o ônus da doença. O tratamento da infecção nosocomial depende da antibioticoterapia adequada e apropriada, que deve ser selecionada após discussão com especialistas em doenças infecciosas e adaptada à medida que os dados microbiológicos se tornam disponíveis (VINCENT, 2003).

A disseminação ambiental de bactérias resistentes a antibióticos tem sido reconhecida como uma crescente ameaça à saúde pública para a qual os hospitais desempenham um papel significativo (LIEN *et al.*, 2017). Os patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) são a principal causa de infecções nosocomiais em todo o mundo. A maioria deles são resistentes a múltiplas drogas, o que se torna um grande desafio na prática clínica. A resistência a múltiplas drogas está entre as três principais ameaças à saúde pública global e geralmente é causada pelo uso excessivo de drogas ou prescrição, uso inadequado de antimicrobianos e produtos farmacêuticos abaixo do padrão (SANTAJIT, INDRAWATTANA, 2016).

Bacillus subtilis é uma espécie bacteriana notavelmente diversa que é capaz de crescer em muitos ambientes. Análises genômicas comparativas revelaram que os membros desta espécie também exibem considerável diversidade. A identificação de genes específicos pode explicar como *B. subtilis* se tornou tão amplamente adaptado (EARL, LOSIC, KOLTER, 2008). Tem sido utilizado no tratamento complexo de pacientes com infecções hospitalares do trato urinário. Metabólitos de *B. subtilis* levam à diminuição da resistência da microbiota uropatogênica isolada a antibióticos (PUSHKAREV *et al.*, 2007).

O habitat primário de *Escherichia coli* não patogênica é o intestino dos vertebrados, vivendo em simbiose com o hospedeiro (TENAILLON *et al.*, 2010). Enquanto isso, a *Escherichia coli* patogênica causa milhões de casos de disenteria e um milhão de mortes por ano (WIRTH *et al.*, 2006). As cepas patogênicas também estão relacionadas a infecções de

feridas, meningite, septicemia, aterosclerose, síndrome urêmica hemolítica e doenças imunológicas, como artrite reumatoide (OLSVIK *et al.*, 1991). Também tem sido demonstrada a resistência a antibióticos pela *Escherichia coli* em ambiente hospitalar (LIEN *et al.*, 2017).

Apesar de ser constituinte do microbioma oral humano, *Micrococcus luteus* (ZAWADZKI *et al.*, 2017) já foi reportada como responsável por casos de bacteremia em pacientes imunodeprimidos (GUERRA, ASENJO, MARTIN, 2018), endocardite (DÜRST *et al.*, 1991; USÓ *et al.*, 2003), pneumonia (SOUHAMI *et al.*, 1979), endoftalmite (MIÑO DE KASPAR, GRASBON, KAMPIK, 2010) e artrite séptica (BAUMBACH *et al.*, 2018).

A dormência é um estado protetor no qual diversas bactérias, incluindo, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* (sífilis) e *Borrelia burgdorferi* (doença de Lyme), reduzem a atividade metabólica para sobreviver a estresses externos, incluindo antibióticos. Evidências sugerem que a dormência está relacionada à tolerância a antibióticos, reemergência de infecções latentes e formação de biofilme (MALI *et al.*, 2017).

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista capaz de causar uma variedade de doenças, incluindo osteomielite, endocardite e infecções de feridas. Estas infecções são frequentemente crônicas e altamente resistentes ao tratamento com antibióticos. Uma multiplicidade de fatores contribui para a virulência do *S. aureus* e altos níveis de falha do tratamento. Estes incluem a sua capacidade de colonizar a pele e as narinas do hospedeiro, a sua capacidade de evadir o sistema imunitário do hospedeiro e o desenvolvimento de resistência a uma variedade de antibióticos (CONLON, 2014).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa que, como outros membros do gênero *Pseudomonas*, é conhecido por sua versatilidade metabólica e sua capacidade de colonizar uma ampla gama de nichos ecológicos, como rizosfera, ambientes aquáticos e hospedeiros animais, incluindo seres humanos, onde pode causar infecções graves. Outra particularidade da *P. aeruginosa* é a sua alta resistência intrínseca a anti-sépticos e antibióticos, que é em parte devido à sua baixa permeabilidade da membrana externa (CHEVALIER *et al.*, 2017).

A *Salmonella* entérica sorotipo *Choleraesuis* (*S. Choleraesuis*) é um patógeno intracelular facultativo Gram-negativo, capaz de induzir a cólera em porcos cujos sintomas se manifestam como febre, depressão, septicemia, artrite e diarreia (LIU *et al.*, 2017). O mecanismo pelo qual *S. Choleraesuis* é mais invasivo para humanos ainda é desconhecido (HUANG *et al.*, 2016).

Candida albicans é um dos patógenos fúngicos mais comuns em humanos, devido à sua alta frequência como um fungo oportunista e patogênico, causando infecções superficiais e invasivas em pacientes imunocomprometidos (XU *et al.*, 2014). Um dos principais atributos de virulência da *Candida albicans* é a sua capacidade de formar biofilmes, comunidades densamente carregadas de células aderidas a uma superfície. Esses biofilmes são intrinsecamente resistentes à terapêutica antifúngica convencional, ao sistema imune do hospedeiro e a outros fatores ambientais, tornando as infecções associadas ao biofilme um desafio clínico significativo (GULATI, NOBILE, 2016).

A cavidade bucal também pode ser acometida por doenças fúngicas provocadas por patógenos oportunistas, como *Candida albicans*. Ocorrem principalmente em idosos usuários de prótese, em pacientes diabéticos e em indivíduos imunocomprometidos (ARDIZZONI *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, tem havido um notável aumento nas infecções fúngicas relacionadas a espécies não-albicans de *Candida*, incluindo a *Candida glabrata*, que possui resistência intrínseca e resistência comumente adquirida aos antifúngicos azólicos (HU, HAYNE, 2015). Esse fungo patogênico, prevalente em humanos, é caracterizado por sua extrema agressividade, baixa resposta terapêutica e responsável por candidíase recorrente grave (RODRIGUES, 2017). Trata-se de um patógeno oportunista que provoca infecções sistêmicas potencialmente fatais (KASPER, SEIDER, HUBE, 2015).

Filogeneticamente, *C. glabrata* está mais intimamente relacionada ao organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* que não é patogênico do que a outras espécies de *Candida*. Apesar da designação de *C. glabrata* como patógeno desde 1957, relativamente pouco se sabe sobre seu mecanismo de virulência. Nos últimos anos, a tecnologia para analisar as bases moleculares da infecção se desenvolveu rapidamente, e aqui analisamos brevemente os principais avanços em ferramentas e tecnologias disponíveis para explorar e investigar a virulência de *C. glabrata* que ocorreu na última década (HU, HAYNE, 2015).

Durante a infecção, *C. glabrata* tem que lidar com células do sistema imune inato, como macrófagos, que pertencem à primeira linha de defesa contra patógenos invasores. *Candida glabrata* é capaz de sobreviver e até mesmo se replicar dentro de macrófagos (KASPER, SEIDER, HUBE, 2015).

Diante do exposto, fica evidenciada a necessidade de desenvolver estudos que descubram alternativas no manejo clínico desses microorganismos, minimizando as graves consequências, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

- Imunopatogênese da periodontite

A periodontite, doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes (osso, ligamento periodontal e cimento) (BEKLEN, 2017), tem etiologia multifatorial, cujo fator primário é a presença de biofilme bacteriano sinérgico e disbiótico (MEYLE, CHAPPLE, 2015; HAJISHENGALLIS, LAMMONT, 2014). Condições sociodemográficas desfavoráveis e higiene bucal deficiente podem influenciar no estabelecimento dessa doença (BAIJU *et al.*, 2019). Entretanto, sua manifestação resulta da interação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, agentes microbianos, fatores ambientais e genéticos (FINOTI *et al.*, 2017).

Os mecanismos de resposta do hospedeiro a fatores microbianos estão relacionados à gravidade da doença, uma vez que componentes e produtos dessas bactérias são capazes de ativar as células de defesa do hospedeiro determinando a liberação de mediadores que estimulam o dano tecidual (LIMA *et al.*, 2008).

Existem moléculas protéicas, chamadas de citocinas, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico (VARELLA, FORTE, 2001). Elas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As citocinas possuem função preferencialmente parácrina, atuando em células próximas àquela que as sintetizaram; mas eventualmente agem de forma autócrina, atuando na própria célula produtora e endócrina, quando sua ação é à distância. (VARELLA, FORTE, 2001). Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, diversos estudos apontam as citocinas como importantes mediadores associados à patogênese da periodontite (LIMA *et al.*, 2008).

A interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) são citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata, encontradas em grande quantidade nos tecidos periodontais e no fluido gengival de sítios com periodontite (MENEGAT *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2008). Atuam no recrutamento de leucócitos para o local da infecção, estimulação da liberação de outros mediadores inflamatórios, além de desequilibrar o eixo RANK-RANKL-OPG (SINGH *et al.*, 2012; KWAN *et al.*, 2004), levando à reabsorção óssea. De acordo com Mao *et al.*, 2016, a interleucina-1 β (IL-1 β) quando em baixas concentrações, promove a osteogênese. Entretanto,

quando em altas doses, inibe esse processo. Com relação à IL-6, tem sido demonstrado que indivíduos portadores de periodontite apresentam polimorfismos nos genes dessa citocina, que podem determinar sua alta produção (TRINDADE *et al.*, 2013).

A interleucina 13 (IL-13) é uma citocina multifuncional do perfil T-helper tipo 2 (Th2), que pode diminuir as respostas inflamatórias e desempenhar um papel na regulação da homeostase do colágeno em fibroblastos gengivais. A IL-13 regula o fator de transformação do crescimento β (TGF- β), uma citocina conhecida por estimular a produção de colágeno. Além disso, infra-regula a produção de metaloproteinases da matriz (MMP-1), enzimas que estão envolvidas na degradação de proteínas do tecido conjuntivo (BEKLEN, 2017).

A interleucina-17 (IL-17) é uma citocina chave na ativação das células T para a mobilização e ativação de neutrófilos. Como tal, a IL-17 pode mediar a imunidade inata protetora contra patógenos ou contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias. Além de promover a inflamação neutrofílica, a IL-17 tem efeitos pró-osteoclastogênicos potentes que provavelmente contribuem para a patogênese da periodontite (ZENOBIA, HAJISHENGALLIS, 2015).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina considerada anti-inflamatória, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias citocinas inflamatórias, como IL-1 α , TNF- α e IL-6 (FOEY *et al.*, 1998). Também possui funções relacionadas à inibição da fagocitose de células inflamatórias (LIRA-JUNIOR *et al.*, 2013). Tem sido relacionada à periodontite, com ação inibidora/moduladora sobre o sistema imune (TRINDADE *et al.*, 2012; TRINDADE *et al.*, 2013)

O interferon gama (IFN- γ) é uma citocina que, por sua natureza pró-inflamatória, é importante na modulação da osteoclastogênese na periodontite, sendo capaz de ativar ou inibir a reabsorção óssea. Seus níveis elevados no soro e no fluido gengival podem ser associados com a severidade da periodontite (BEILER, FISCHER, FIGUEIREDO, 2013).

Neste contexto, percebe-se como na periodontite é desencadeada uma complexa estimulação do sistema imunológico do hospedeiro (BARBOSA *et al.*, 2012). Sendo assim, a compreensão deste complexo mecanismo associado à interação bactéria-hospedeiro parece ser um caminho para o avanço no controle da doença.

- Tratamento da periodontite

O tratamento da periodontite visa prevenir a progressão da doença com a intenção de reduzir o risco de perda dentária, minimizar os sintomas e possivelmente restaurar o tecido periodontal perdido (GRAZIANI *et al.*, 2017).

A intervenção terapêutica necessita da introdução de técnicas que tem por objetivo a mudança do comportamento do indivíduo, tais como: instruções individuais de higiene bucal, um programa de cessação do tabagismo, ajuste dietético e controle de placa. É necessária a remoção de cálculo e em alguns casos, farmacoterapia local e sistêmica, além de cirurgia (GRAZIANI *et al.*, 2017).

Para remover o cálculo dentário, é feita a raspagem e alisamento das superfícies radiculares. Além disso, durante o tratamento periodontal, medidas de cuidado pessoais para o controle do biofilme bucal também são muito importantes. Além da escovação e uso do fio dental, também devem ser considerados fatores como educação, motivação e adesão à recomendação profissional (ARWEILER, AUSCHILL, SCULEAN, 2018).

Após o tratamento, para manutenção da condição periodontal obtida, é recomendada profilaxia com instruções de higiene bucal, isoladamente ou em combinação com instrumentação subgingival, a depender do caso (ANGST *et al.*, 2019).

Adjuvantes químicos também podem ser utilizados na terapia periodontal, como o uso de colutórios e antibióticos (GONÇALVES, PINTO, 2013), sendo que o tratamento periodontal mecânico se beneficia da quimioterapia antimicrobiana adjunta (GRAZIANI *et al.*, 2017).

Quanto ao uso de colutórios, a composição desses produtos é bastante diversa, variando de acordo com o a indicação de uso, fabricante e apresentação comercial. São produtos de fácil acesso, podendo ser adquirido em supermercados e farmácias (CORTEZ, 2011). Enxaguatórios bucais contendo triclosan, clorexidina e cetilpiridínio se mostram eficazes na regulação da homeostase microbiana da cavidade oral, fornecendo um balanço positivo para a saúde bucal (ARDIZZONI *et al.*, 2018). Entretanto, a clorexidina tem efeitos adversos que devem ser considerados, tais como: alteração na coloração nos elementos dentários, restaurações, próteses e língua, perda do paladar, xerostomia e gosto residual desagradável na boca (PERGORARO *et al.*, 2014). O uso do triclosan, uma substância bactericida presente em alguns colutórios, tem sido questionado em função de alguns fatores, tais como a toxicidade e a capacidade de bioacumular (CORTEZ, 2011). Além disso, sua presença em águas superficiais pode afetar uma

grande variedade de organismos aquáticos (TIBURTIUS, SCHEFFER, 2014), agredindo sobremaneira o meio ambiente.

A prescrição de antibióticos pode ser indicada como tratamento adjuvante na terapia periodontal, especialmente nas formas mais agressivas da periodontite (DAHLEN, PREUS, 2016). Entretanto, o seu uso indiscriminado pode resultar na resistência bacteriana (SEKIGUCHI et al, 2007).

A resistência à antibioticoterapia convencional e a antissépticos bucais exigem a busca por novos métodos coadjuvantes ao tratamento clínico da periodontite. Assim, já que o Brasil possui várias espécies com potencial biotecnológico, é natural que se procure em nossas plantas produtos que beneficiem a população a custos mais baixos (JUIZ, ALVES, BARROS, 2010) Neste contexto a eficácia de plantas medicinais, como componentes tanto nos géis dentifrícios, como nos enxaguatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento de gengivites e a utilização de extratos vegetais vem se tornando uma alternativa importante para a prevenção de doenças periodontais (CORDEIRO et al., 2006).

- *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer

As plantas do gênero *Lippia* são arbustos pertencentes à família Verbenaceae (CNCFLORA, 2012), usados popularmente como antissépticos, bem como no tratamento de doenças infecciosas (PINTO *et al.*, 2013), incluindo afecções da cavidade bucal (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Existe uma espécie de *Lippia* que é endêmica do Estado da Bahia, sendo encontrada na região da Chapada Diamantina, denominada *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (CNCFLORA, 2012). É um arbusto aromático que cresce em solos arenosos, entre rochas (MATES *et al.*, 2000). Está citado na “Lista de espécies da flora brasileira com deficiência de dados”, presente no Anexo II, página 5, da Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008, do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2008) e ainda é pouco estudado, com dados escassos na literatura sobre suas propriedades.

Um estudo para a revisão e atualização taxonômica da família Verbenaceae para a Flora do Brasil (SALIMENA, MÚLGARA, 2015), relatou que a *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer foi descrita com base na coleção de Martius s.n., havendo a referência: “*In campis graminosis Brasiliae, in Prov. Minarum et Bahiensis*” (em campos graminosos no Brasil, em ameaça na Bahia).

Conhecida popularmente como alecrim-do-mato (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007) e pedressa (MATES *et al.*, 2000), trata-se de um arbusto de até 2,5 m de altura com folhas coriáceas, aromáticas, rugosas e flores rosadas. É encontrada em afloramentos rochosos de campos rupestres, em altitudes de 1000-1500 m. Floresce em março e julho e frutifica em julho (MOLDENKE, 1981).

Na Bahia, é encontrada na região da Chapada Diamantina, no Morro do Pai Inácio. Nesta região, foram descritas densidades absolutas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer de 3,48 ind./ha no Platô Cruz, platô mais alto que abrange o cume de 1.170 metros de altitude, e de 1,55 ind./ha no Platô Dois, 50 m abaixo do primeiro. Os substratos nos dois platôs são compostos por afloramentos rochosos de quartzito-arenito, solos arenosos e fragmentos de rochas variáveis em tamanho. A espécie também é encontrada em áreas de conservação nessa região, como a Área de Proteção Ambiental Marimbus-Iraquara. Os locais onde a espécie ocorre estão sujeitos a degradações causadas por atividades como exploração de recursos vegetais nativos, abertura de pastagens, queimada, garimpo e agricultura (CONCEIÇÃO, GIULIETTI, 2002).

Apesar dos poucos estudos existentes com a *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer na literatura científica, sabe-se que os constituintes principais do seu óleo essencial são o limoneno - 47,2% e óxido de piperitenona - 44,6% (MATES *et al.*, 2000). Além disso, tem sido investigada a ação antibacteriana de seu extrato metanólico, com resultados que justificam o seu uso popular contra dermatite, infecções vaginais e como anti-séptico bucal (PINTO *et al.*, 2013), além de propriedades atividade espasmolítica, antitussígena e expectorante (VILELA, 2018).

- *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke

A *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke, conhecida popularmente como amargoso, maleiteira e angelim-do-cerrado, pertence à família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) (SANTOS *et al.*, 2016). Sua floração é bianual e ocorre entre os meses de junho a agosto e a frutificação entre os meses de setembro e outubro (COSTA, LIMA, SILVA, 2014). É uma árvore selvagem nativa do cerrado e amplamente distribuída através todo o território brasileiro, usada popularmente em indivíduos com diabetes (SANTOS *et al.*, 2016). Possui propriedades antimicrobiana (VALADARES, 2017; MATOS *et al.*, 1988) antiulcerogênica (JESUS, 2007), hipoglicemiante (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Foram encontrados compostos fenólicos e flavonoides tanto nas folhas quanto no caule

desta planta, cujas folhas demonstraram atividade antimicrobiana (VALADARES, 2017). O extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke demonstrou efeito preventivo de ulcerações e promoveu elevação no conteúdo de muco da mucosa gástrica. Em análise fitoquímica foi detectada a presença de flavonóides, flavonas, taninos, esteróides, quinonas e resinas. Desta forma, o efeito antiulcerogênico do extrato pode estar relacionado com sua atividade antioxidante e citoprotetora através da elevação do muco da parede gástrica (JESUS, 2007).

Considerando que o uso de produtos naturais tem recebido recentemente mais atenção como uma estratégia no combate a doenças infecciosas causadas por microorganismos multirresistentes, Santos *et al.*, 2019 avaliaram a capacidade de uma lectina de ligação à galactose de sementes de *Vatairea macrocarpa*, para modular atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, demonstrando, pela primeira vez, a atividade de modulação de uma lectina vegetal sobre a resistência microbiana.

Gonçalves *et al.*, 2013, avaliaram a capacidade da lectina de ligação à galactose de sementes de *Vatairea macrocarpa* em alterar a função neural em camundongos. Os resultados mostraram o desencadeamento de respostas neuroinflamatórias no hipocampo e a exibição de atividade depressiva, indicando um duplo papel para lectinas de ligação à galactose na modulação da função do sistema nervoso central.

O extrato acetônico da planta mostrou acentuada atividade antibacteriana sobre *Klebsiella sp* e *Staphylococcus aureus*, mas se mostrou inativo frente as bactérias *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*, bem como para os fungos *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* (MATOS, AGUIAR, SILVA, 1998).

Apesar da literatura relatar as propriedades descritas acima, ainda são escassos os estudos que avaliaram as suas propriedades biológicas, principalmente relacionadas a condições inflamatórias e infecciosas da boca.

CAPÍTULO 1

Avaliação do potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer na periodontite.

Laerte Oliveira Barreto Neto¹, Angélica Maria Lucchese², Rebeca Pereira Bulhosa³, Thais Brito de Oliveira Moura⁴, Ellen Karla Nobre dos Santos⁵, Soraya Castro Trindade⁶

¹ Cirurgião-dentista. Doutorando em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana.

² Doutorado em Química Orgânica. Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana.

³ Biomédica. Mestrado em Imunologia. Universidade Federal da Bahia.

⁴ Bióloga. Doutoranda em Imunologia. Universidade Federal da Bahia.

⁵ Cirurgião-dentista. Doutora em Imunologia. Universidade Federal da Bahia.

⁶ Doutora em Imunologia. Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Resumo

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, iniciada por um biofilme com uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica. Caso o tratamento adequado não seja realizado, pode ocorrer a perda dentária, gerando repercussões negativas na qualidade de vida dos indivíduos. Considerando a alta prevalência das doenças periodontais num contexto onde existe uma Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), as plantas medicinais podem representar uma fonte de tratamento eficazes e acessíveis à população. Objetivo. Nesta perspectiva, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer na periodontite. Métodos. Os grupos de comparação consistiram em um grupo teste, formado por indivíduos com o diagnóstico de periodontite (P) e um grupo controle, com indivíduos sem periodontite (SP). A produção das citocinas nos sobrenadantes da cultura de sangue total foi quantificada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções dos fabricantes. Constatações e principais conclusões. O extrato da *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer regula a produção de citocinas produzidas em resposta à presença de antígenos de *Porphyromonas gingivalis*.

Palavras Chave: Citocinas, Doenças Periodontais, Plantas medicinais.

Abstract

Periodontitis is multifactorial disease, initiated by a synergistic and dysbiotic subgingival biofilm. If it is not properly treated, tooth loss may occur, generating negative repercussions on the individuals' quality of life. Considering the adjuvant role of chemical control of biofilm, medicinal plants can represent a source of effective and accessible treatment for the population. Objectives. To evaluate the immunomodulatory potential of the leaf extract of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer on periodontitis. Methods. A test group was composed by individuals with periodontitis (P) and a control group, with individuals without periodontitis (SP). Cytokine production in supernatants from whole blood culture was quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Findings and main conclusions. *L. alnifolia* Mart. & Schauer (LA) inhibited the production of IL-13 ($p = 0.024$), IL-6 ($p = 0.000$) and IFN-g ($p = 0.000$). This inhibition was maintained even when *P. gingivalis* extract was added to the culture (LA + PG), with levels still reduced compared to unstimulated cells at IL-13 ($p = 0.003$), IL-6 ($p = 0.000$) and IFN-g ($p = 0.000$). The extract of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer regulates the production of cytokines produced in response to the presence of *Porphyromonas gingivalis* antigens.

Keywords: Cytokines, Periodontal Diseases, Plants, Medicinal.

1.1 Introdução

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial na qual existe a participação de fatores bacterianos, ambientais e da resposta imune do hospedeiro (CORRÊA *et al.*, 2017). É iniciada por um biofilme com uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica. Existem bactérias denominadas “patógenos – chave” que são encontradas em baixa quantidade, mas com efeitos em toda a comunidade, sendo críticas para o desenvolvimento de disbiose. O exemplo melhor documentado é o da *Porphyromonas gingivalis* (HAJISHENGALLIS, LAMMONT, 2014).

A sua prevalência mundial é alta, sendo a principal causa de perdas dentárias em adultos (VIEIRA *et al.*, 2018). Devido à heterogeneidade metodológica existente nos estudos atuais, conclusões a respeito da incidência e prevalência global da periodontite não podem ser firmadas (FRENCKEN *et al.*, 2017). No Brasil, de acordo com o último levantamento epidemiológico nacional de saúde bucal, realizado em 2010, a prevalência da doença periodontal “moderada a grave” em brasileiros adultos foi de 15,3% e para a condição “grave” foi de 5,8%, com variações consideráveis entre os municípios e regiões. Adultos com idade mais avançada, de cor de pele parda, sexo masculino, menor renda familiar e menor escolaridade apresentaram maiores chances para as condições periodontais investigadas (VETTORE, MARQUES, PERES, 2013).

Caso o tratamento adequado não seja realizado, pode ocorrer a perda dentária. Assim, são geradas repercussões negativas na qualidade de vida dos indivíduos, prejudicando o desempenho de atividades cotidianas e necessárias. A rotina diária é alterada, sofrendo modificações pela interferência na fala, dificuldades de mastigação, alterações comportamentais, com repercussões no convívio social e na autoestima (PASSOS-SOARES *et al.*, 2018).

Considerando a alta prevalência das doenças periodontais num contexto onde existe uma Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), publicada na forma das Portarias Ministeriais nº 971 em 03 de maio de 2006, e nº 1.600, de 17 de julho de 2006 (BRASIL, 2006), o estudo de novas alternativas para o controle da periodontite pode impactar significativamente às políticas públicas de saúde bucal.

Entende-se que as plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento de doenças, inclusive bucais (CORDEIRO *et al.*, 2006). No Brasil, país detentor de uma rica biodiversidade, as plantas medicinais podem representar uma fonte de tratamento eficazes e acessíveis à população (JUIZ, ALVES, BARROS, 2010). Nesta perspectiva, este

trabalho teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer na periodontite.

1.2 Materiais e métodos

1.2.1 Aspectos éticos

O projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), sendo o número do parecer: 1.344.223 (2015). Foram obtidos os termos de consentimento livre e esclarecido dos indivíduos selecionados, que explicam em linguagem clara e acessível os procedimentos empregados e suas finalidades.

1.2.2 Seleção dos participantes da pesquisa

Foram convidados a compor a amostra, indivíduos com boa saúde sistêmica que buscaram atendimento odontológico nos ambulatórios do curso de Odontologia da UEFS, no período de agosto de 2016 a dezembro de 2018, e possuíam ao menos quatro dentes em boca. Os critérios de não inclusão avaliados pela anamnese e considerados para este estudo foram: história de hipertensão, diabetes, doenças autoimunes, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e anti-inflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta.

Os grupos de comparação consistiram em um grupo teste, formado por indivíduos com o diagnóstico de periodontite (P) e um grupo controle, com indivíduos sem periodontite (SP).

1.2.3 Cálculo do tamanho da amostra

Para a avaliação do efeito imunomodulador do extrato de *Lippia alnifolia* na periodontite crônica, foi proposto um estudo do tipo experimental em células do sangue periférico dos participantes. Para o cálculo do tamanho da amostra foi efetuado um estudo piloto para a determinação do erro mínimo e do desvio padrão a serem considerados, para um nível de significância de 5% e poder do teste 80%. Sendo assim, considerando o desvio padrão dos níveis de IL-6 de 1.260 pg/mL e um erro mínimo de 950pg/mL, o número 26 de participantes apontado para cada grupo foi de 28 indivíduos. Acrescentando 10% para previsão de perdas, o

tamanho total da amostra calculado foi de 31 participantes com periodontite e 31 participantes sem periodontite.

1.2.4 Calibração do pesquisador para a realização do exame periodontal

Dado o alto grau de subjetividade do diagnóstico das doenças bucais, a realização da calibração com os examinadores é muito importante, para que se obtenha uma uniformidade nos diagnósticos obtidos (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

A avaliação da condição periodontal foi realizada por um examinador, cirurgião dentista, previamente treinado. Os resultados obtidos pelo examinador durante o período de calibração foram comparados com os resultados obtidos por um professor, Doutor em Periodontia, considerado no teste como padrão ouro.

A concordância das medidas clínicas foi calculada pelo índice Kappa interexaminadores, obtendo-se os valores de concordância de 0,83 e 0,74, para as medidas de profundidade de sondagem e recessão, respectivamente.

1.2.5 Exame periodontal

No exame periodontal, foram medidos: o índice de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem de sulco/bolsa e a recessão/hiperplasia gengival e obtidos os valores de nível de inserção para toda a cavidade bucal. Tais observações foram obtidas em seis diferentes locais para cada unidade dentária (disto-vestibular, médio-vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, médio-lingual, mesio-lingual), exceto para o índice de placa visível que foi avaliado apenas em 4 locais (mesial, distal, vestibular e lingual). Todas as medidas foram realizadas com o auxílio de uma sonda milimetrada do tipo Williams e registradas no periograma.

1.2.6 Diagnóstico da periodontite

O diagnóstico da condição periodontal foi realizado empregando-se o critério que considera com periodontite o indivíduo que apresentar pelo menos quatro dentes com no mínimo um sítio com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, perda de inserção

maior ou igual a 3mm e sangramento à sondagem, no mesmo sítio (GOMES-FILHO et al., 2007).

1.2.7 Cultura de células

A colheita de 30 mL de sangue periférico foi realizada por punção venosa em todos os sujeitos da pesquisa por sistema a vácuo com tubos heparizados para a realização da cultura de sangue total.

Em um fluxo laminar, em ambiente estéril, para cada participante, 02 ml de sangue foram colocados em cada poço de uma placa de cultivo celular de 24 poços (COSTAR, Nova Iorque, EUA). As células foram cultivadas com 0,5 µg/mL do extrato imunogênico de *P. gingivalis* ATCC 33277 (TRINDADE *et al.*, 2008), com 10 µg/mL do extrato de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer ou com ambos os estímulos, concomitantemente. Um poço permaneceu apenas com o sangue total, representando o controle negativo, e em outro, foram colocados 2,5 µg/ml do mitógeno Pokeweed (PWM), como controle positivo.

As células foram cultivadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após 48h, o material foi coletado dos poços e centrifugado em centrífuga para microtubos para obtenção do sobrenadante, que foi armazenado a - 20°C até o momento das análises.

1.2.8 Obtenção do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer

As folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer foram coletadas e levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da UEFS, secas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e posteriormente pulverizadas em moinho de facas. Após a pulverização, o material foi submetido à extração consecutiva, por três vezes, por maceração com metanol. Em seguida o extrato bruto foi concentrado em evaporadores rotatórios sob pressão reduzida e em temperatura entre 40° e 45°C. Os resíduos do solvente foram retirados por evaporação em capela de exaustão.

1.2.9 Dosagem de proteína

Alíquotas do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer foram diluídas em metanol (Synth)/DMSO (Dimetilsulfóxido) (Synth) a 3% e filtradas com membrana estéril de

diâmetro de 0,22µm para obtenção da concentração proteica. A dosagem de proteínas foi realizada com a técnica de Lowry modificada, de acordo com as instruções do fabricante (DC™ ProteinAssay da Biorad, CA, USA) e o resultado foi obtido pela leitura em espectrofotômetro.

1.2.10 Avaliação da citotoxicidade celular

Para avaliação da viabilidade celular do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer, o sangue de três participantes foi processado para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (TRINDADE *et al.*, 2011), que foram cultivadas nas mesmas condições da cultura de células de sangue total. O extrato foi aplicado em diferentes poços nas concentrações de: 1 µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL. O teste colorimétrico que avalia a conversão de MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium] - em formazan (Sigma, St. Louis, MI, USA) foi empregado obedecendo as instruções do fabricante, usando o comprimento de onda de 570nm para obtenção das densidade ótica.

1.2.11 Avaliação da Produção de Citocinas

A produção das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, (Biolegend, CA, USA) e IL1-β (Invitrogen, CA, USA) nos sobrenadantes da cultura de sangue total foi quantificada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções dos fabricantes.

Após 48 horas de cultivo, em presença do mitógeno pokeweed (PWM) (2,5 µg/mL); do antígeno, extrato de *P. gingivalis* (0,5 µg/mL); do extrato de *Lippia alnifolia* (10 µg/mL) e do extrato de *Lippia alnifolia* (10 µg/mL) em adição concomitantemente ao extrato de *P. gingivalis* (0,5 µg/mL), as citocinas foram mensuradas por imunensaio enzimático usando-se kits disponíveis comercialmente. Os ensaios foram realizados usando-se placas de poliestireno de alta adsorção com 96 poços de fundo chato (COSTAR, Coornig Life Science, Tewksbury, MA, EUA). Todas as etapas foram realizadas também de acordo com as instruções do fabricante. Após revelação com tetrametilbenzidina (TMB) e parada da reação com H₂SO₄2N, a densidade ótica foi determinada em Leitora de ELISA (ELx 800 – Bio-Tek) ajustada para um comprimento de onda na faixa de 450 nm.

1.2.12 Análise estatística

Inicialmente, foi efetuada uma análise descritiva das características clínicas dos indivíduos, para caracterização dos grupos de estudo. Em seguida, a distribuição dos dados referentes às variáveis principais do estudo foi verificada com o emprego do teste qui-quadrado para variáveis categóricas ou com o teste Kolmogorov-Smirnov, para variáveis contínuas.

As comparações entre os estímulos foram feitas com o teste Kruskal-Wallis e entre os grupos foi feita com o teste Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se valores de $p \leq 0,05$.

1.3. Resultados

1.3.1 Descritores clínicos

O extrato concentrado de *Lippia alnifolia* demonstrou uma concentração proteica de 4,53 mg/ml. Na análise de citotoxicidade celular, foi observado que as células se mantiveram viáveis quando o extrato foi testado a 1 µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL, sendo escolhida a concentração de 10µg/mL para a execução dos experimentos.

Foram selecionados 58 indivíduos para participar do estudo, sendo que destes, 17 compuseram o grupo com periodontite (CP) e 41 compuseram o sem periodontite (SP). A média \pm desvio padrão da idade foi de 43,18 \pm 11,01 no grupo CP e 38,44 \pm 12,80 no grupo SP. A avaliação dos dados clínicos investigados demonstrada na tabela 01 evidenciou que os grupos foram homogêneos entre si com relação à idade ($p=0,165$) e ao número de dentes presentes na boca ($p=0,450$). Entretanto, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao sexo ($p=0,012$). Quanto aos descritores clínicos periodontais, houve diferença estatisticamente significativa no percentual de sítios com SS ($p=0,001$), percentual de sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm ($p=0,000$) e percentual de sítios com nível de inserção clínica ≥ 3 mm ($p=0,000$), ratificando a pior condição no grupo com o diagnóstico da doença.

Tabela 01: Características clínicas dos grupos com periodontite (P) e sem periodontite (SP), diagnosticados segundo os critérios de Gomes-Filho *et al.*, (2007).

DESCRITORES CLÍNICOS	CLASSIFICAÇÃO DA PERIODONTITE Gomes-Filho et al, 2007				P
	Com periodontite (CP)		Sem periodontite (SP)		
	N	%	N	%	
Sexo					
Masculino	10	58,8	10	24,4	0,012
Feminino	07	65,1	31	66,7	
Total	17	100	41	100	
Idade	N=17		N= 41		
Média ±DP	43,18±11,01		38,44±12,80		0,165
Nº de dentes	N=17		N= 41		
Mediana (IQ)	22,00 (19,00-26,00)		24,00 (19,50-27,00)		0,450
% de sítios com sangramento	N=17		N= 41		
Mediana (IQ)	45,65 (28,55-69,77)		9,52 (3,66-32,40)		0,001
% de sítios com profundidade de sondagem ≥4mm	N=17		N= 41		
Mediana (IQ)	16,66 (8,27-38,48)		0,00 (0,00-3,77)		0,000
% de sítios com NIC ≥ 3mm	N=17		N= 41		
Mediana (IQ)	51,85 (15,06-76,05)		7,63 (2,15-18,37)		0,000

1.3.2 Citocinas

Na comparação dos grupos estudados quanto às concentrações de citocinas no sobrenadante de cultura, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre CP e SP nos níveis de IL-13, IFN- γ , IL-6 e IL-10. Não foi obtida amostra suficiente no grupo SP para a comparação quanto aos níveis de IL-17.

Observando a produção de citocinas pelas células humanas independentemente da condição periodontal, demonstrada na figura 1, foi possível constatar que as células cultivadas com o extrato de *Porphyromonas gingivalis* (PG) produziram níveis mais elevados de IL-1 β (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN- γ (p=0,000), IL-10 (p=0,004) e IL-17 (p=0,006) do que as células não estimuladas (B), enquanto que o extrato de *L. alnifolia* (LA) inibiu a produção de

IL-13 ($p=0,024$), IL-6 ($p=0,000$) e IFN- γ ($p=0,000$). Esta inibição se manteve mesmo quando o extrato de *P. gingivalis* foi adicionado ao cultivo (LA+PG), com níveis ainda reduzidos em comparação com as células não estimuladas nas concentrações de IL-13 ($p=0,003$), IL-6 ($p=0,000$) e IFN- γ ($p=0,000$).

As células cultivadas com o extrato de *P. gingivalis* induziram concentrações mais altas de IL-1 β ($p=0,000$), IL-13 ($p=0,002$), IL-6 ($p=0,000$), IFN- γ ($p=0,003$), IL-10 ($p=0,001$) e IL-17 ($p=0,003$) do que aquelas cultivadas com o extrato de *L. alnifolia*. Entretanto, a presença do extrato de *L. alnifolia* no cultivo juntamente com o extrato de *P. gingivalis* reduziu a produção de IL-1 β ($p=0,000$), IL-13 ($p=0,000$), IL-6 ($p=0,000$), IFN- γ ($p=0,000$), IL-10 ($p=0,001$) e IL-17 ($p=0,003$), em relação às concentrações induzidas pelo extrato de *P. gingivalis* isoladamente. A combinação dos extratos fez com que os níveis de IL-1 β ($p=0,000$) fosse maior do que aqueles observados com a utilização do extrato de *L. alnifolia* separadamente.

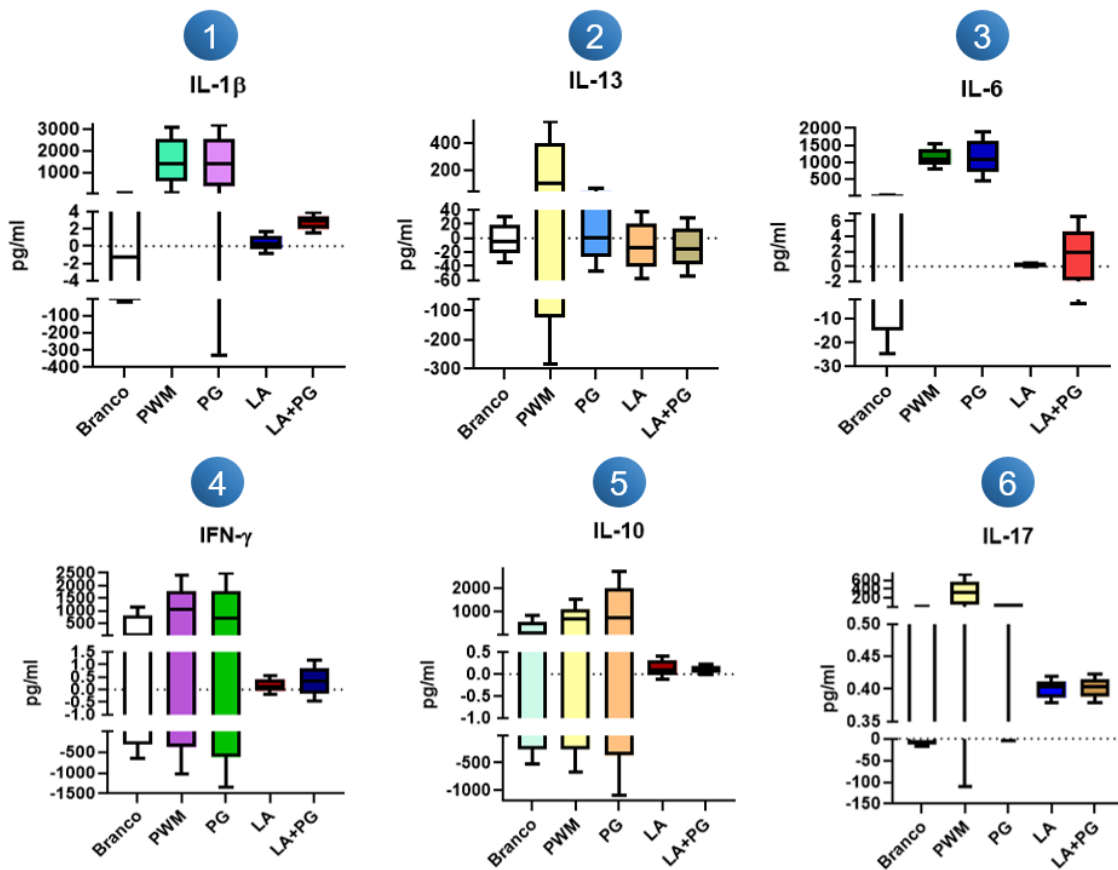


Figura 1: Concentração de citocinas (pg/mL) em sobrenadante de cultura de células do sangue periférico humanas cultivadas sem estimulação antigênica (Branco), com o mitógeno pokeweed (PWM), com o extrato de *P. gingivalis* (PG), com o extrato de *Lippia alnifolia* (LA) e com ambos os extratos

concomitantemente (LA+PG). A: interleucina 1 β (IL-1 β); B: interleucina 13 (IL-13); C: interleucina 6 (IL-6); D: interferon γ (IFN- γ); E: interleucina 10 (IL-10) e F: interleucina 17 (IL-17).

1.4 Discussão

De acordo com os achados do presente estudo, o extrato de *L. alnifolia* Mart. & Schauer tem a capacidade de inibir a produção *in vitro* de IL-13 e IFN- γ por células do sangue periférico humanas. Além disso, parece promover a regulação negativa da produção de IL-1 β , IL-13, IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-17, em contraponto à estimulação antigênica pelo extrato de *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria considerada patógeno chave na disbiose periodontal (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2011), relacionada ao início e à progressão da periodontite (JUIZ *et al.*, 2016)

A IL-1 β e a IL-6 são citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata encontradas em grande quantidade nos tecidos periodontais e no fluido gengival de sítios com periodontite (MENEGAT *et al.*, 2010, LIMA *et al.*, 2008). Atuam no recrutamento de leucócitos para o local da infecção, estimulação da liberação de outros mediadores inflamatórios, além de desequilibrar o eixo RANK-RANKL-OPG (SINGH *et al.*, 2012, Kwan *et al.*, 2004), levando a reabsorção óssea. Diversos antígenos de *P. gingivalis* têm demonstrado a capacidade de estimular a sua produção, o que pode explicar parcialmente a interação patógeno-hospedeiro na patogênese da doença. Isto revela o potencial do extrato de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer no controle da periodontite.

Embora seja considerada uma citocina imunorreguladora, a IL-10 também está relacionada à resposta à infecção por *Porphyromonas gingivalis* (LIU *et al.*, 2017, TRINDADE *et al.*, 2012, WANG *et al.*, 1999). Sabe-se que a produção desta citocina é desencadeada para regular a produção de IFN- γ , característica da resposta Th1 (HERRERO *et al.*, 2003), bem como pode controlar, positiva ou negativamente, a produção de citocinas do perfil Th2, como IL-4 e IL-13 (KOSAKA *et al.*, 2011). Como *Porphyromonas gingivalis* é um patógeno intracelular facultativo, isto é, embora não seja o seu habitat de escolha, a bactéria pode sobreviver no compartimento intracelular (LI *et al.*, 2008), pode desencadear diferentes tipos de resposta no hospedeiro. Consequentemente, ocorrerá uma maior ou menor destruição tecidual, a depender da combinação de mediadores produzidos. A possibilidade do extrato de *Lippia alnifolia* atuar na inibição destas citocinas de diversos perfis também parece ser favorável para o seu uso no manejo da inflamação periodontal.

Com relação à IL-17, esta é a citocina de assinatura do perfil Th17, que é caracterizado por uma intensa resposta neutrofílica (NORMATON, MARTI, 2013). Vale salientar que os

neutrófilos são as células mais descritas na patogênese da periodontite, cuja funcionalidade e mobilidade defeituosas estão fortemente relacionadas à patogênese da doença (GAUDILLIERE *et al.*, 2019). Sugere-se também que a IL-17 esteja envolvida na reabsorção óssea da periodontite (RUÍZ-GUTIERREZ *et al.*, 2014). Estas considerações levam a crer que o perfil TH17 pode ser induzido na periodontite e que a sua regulação seja necessária para o retorno à homeostase tecidual.

As plantas do gênero *Lippia* são arbustos pertencentes à família Verbenaceae (CNCFLORA, 2012), usados popularmente como antissépticos, bem como no tratamento de doenças infecciosas (PINTO *et al.*, 2013), incluindo afecções da cavidade bucal (OLIVEIRA *et al.*, 2018). A *Lippia alnifolia* possui propriedades antisséptica e antimicrobiana (PINTO *et al.*, 2013), antitussígena e expectorante (VILELA, 2018), porém ainda são escassos os estudos que avaliaram as suas propriedades biológicas, principalmente relacionadas a condições inflamatórias e infecciosas da boca.

Deste modo, ainda não se conhece aspectos importantes sobre a administração deste extrato, como o veículo, a concentração ideal a ser empregada e os seus efeitos colaterais. No presente estudo, a citotoxicidade do extrato nas concentrações de 1 µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL, foi testada *in vitro*, demonstrando baixa agressividade às células do hospedeiro. A concentração de 10µg/mL foi escolhida para a realização da estimulação antigênica e determinação da concentração de citocinas em razão de também ter sido testada em estudo piloto prévio com *Artemia salina* (dados não mostrados), sendo o mais alto valor não citotóxico encontrado. Além disso, concentrações inferiores não poderiam garantir a estimulação antigênica necessária para as avaliações.

Vale salientar que a estimulação das células do sangue periférico foi realizada *in vitro*, o que dificulta a possibilidade de extrapolação dos resultados. Outra limitação importante foi o pequeno tamanho da amostra, que pode ter interferido no poder da análise e, conseqüentemente, nos resultados das comparações entre os grupos de indivíduos com e sem a periodontite.

Entretanto, é importante ressaltar que não foram encontrados estudos que tenham investigado a regulação da produção de citocinas pelo extrato de *L. alnifolia*, principalmente no contexto da infecção periodontal por *Porphyromonas gingivalis*. Neste sentido, esforços devem ser realizados para investigar as propriedades biológicas deste extrato *in vivo*, para determinar se este extrato pode ser uma ferramenta no tratamento adjuvante da periodontite.

1.5 Conclusão

O extrato da *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer regula a produção de citocinas produzidas em resposta à presença de antígenos de *Porphyromonas gingivalis*.

REFERÊNCIAS

1. CORRÊA, JD, CALDERARO DC, FERREIRA GA, MENDONÇA SM, FERNANDES GR, XIAO E, TEIXEIRA AL, LEYS EJ, GRAVES DT, SILVA TA. Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: association with periodontal status. *Microbiome*, v.5, n.1, p.34, 2017.
2. HAJISHENGALLIS G; LAMONT, RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol.*, v.44, n.2, p.328-338, 2014.
3. VIEIRA SPL, LIMA ML, TAVARES SJS, GUIMARÃES MV. Inter-relação entre periodontite crônica e parto prematuro / baixo peso ao nascer – revisão de literatura. *Revista Bahiana de Odontologia*, v,9, n.1, p. 1-11, 2018.
4. FRENCKEN JE, SHARMA P, STENHOUSE L, GREEN D, LAVERTY D, DIETRICH T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol*, v.44, supl.44, p.94-105, 2017.
5. VETTORE MV, MARQUES RAA, PERES MA. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível. *Rev Saúde Pública*, v.47, supl. 3, p. 29-39, 2013.
6. PASSOS-SOARES JS, GOMES-FILHO IS, SANTOS LPS, SANTOS PNP, SILVA, ICO, BALINHA ISCE, TRINDADE SC. Impacto da perda dentária na qualidade de vida relacionada a saúde bucal de adultos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v.17, n.2, p.158-165, 2018.
7. BRASIL 2006. Presidência da República. Decreto no. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. *DOU. Poder Executivo*, Brasília, DF, 23 jun. 2006.
8. CORDEIRO CHG, SACRAMENTO LVS, CORRÊA MA, PIZZOLITTO AC, BAUAB TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v,42, n.3, p.395-404, 2006.

9. JUIZ, P JL; ALVES, R JC; BARROS, T F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Rev. bras. farmacogn.*, v.20, n.1, p.134-139, 2010.
10. OLIVEIRA AGRC, UNFER B, COSTA ICC, ARCIERI RM, GUIMARÃES LOC, SALIBA NA. Levantamentos epidemiológicos em saúde bucal: análise da metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde. *Rev. bras. epidemiol.*, v.1, n.2, p.177-189, 1998.
11. GOMES-FILHO IS, CRUZ SS, REZENDE EJ, DOS SANTOS CA, SOLEDADE KR, MAGALHÃES MA, AZEVEDO AC, TRINDADE SC, VIANNA MI, PASSOS JS, CERQUEIRA EM. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol.*, v.34, n.11, p.957-63, 2007.
12. TRINDADE SC, GOMES-FILHO IS, MEYER RJ, VALE VC, PUGLIESE L, FREIRE SM. Serum antibody levels against Porphyromonas gingivalis extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol.*, v.10, n.2, p.50-58, 2008.
13. TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, MOURA-COSTA LF, CERQUEIRA EM, GALDINO-NETO M, ALVES H, CARVALHO-FILHO PC, XAVIERMT, MEYER R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by Porphyromonas gingivalis HmuY in humans. *J Periodontal Res.*, v.47, n.1, p.27-32, 2011.
14. HAJISHENGALLIS G, LIANG S, PAYNE MA, HASHIM A, JOTWANI R, ESKAN MA, MCINTOSH ML, ALSAM A, KIRKWOOD KL, LAMBRIS JD, DARVEAU RP, CURTIS MA. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. *Cell Host & Microbe*, v.10, n.05, p.497-506, 2011.
15. JUIZ, P JL, SILVA, F, CAMPOS MJA, UETANABARO APT, CAMPOS RJ, ALVES, AML Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Ocimum americanum e Ocimum basilicum sobre periodontopatógenos. *Braz J Periodontol*, v.26, n.04, 2016.
16. MENEGAT J, BRITO F, BARROS F, PEDREIRA R, FISCHER RG, FIGUEIREDO CMS. Níveis elevados de IL-6 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica e retrocolite ulcerativa idiopática. *Periodontia*, v.20, n.2, p.61-68, 2010.
17. LIMA V, BEZERRA MM, LEITÃO RFDC, BRITO GADC, ROCHA, FACD, RIBEIRO RDA. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da

- Periodontite–Papel de Moduladores Farmacológicos. R Periodontia, v.18, n.3, p.7-19, 2008.
18. SINGH A, MEHDI AA, SRIVASTAVA RN, VERMA NS. Immunoregulation of bone remodelling. Int J Crit Illn Inj Sci., v.2, n.2, p.75-81, 2012.
 19. KWAN TS, PADRINES M, THÉOLEYRE S, HEYMANN D, FORTUN Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev., v.15, n.1, p.49-60, 2004.
 20. LIU Z, HU Y, YU P, LIN M, HUANG G, KAWAI T, TAUBMAN M, WANG Z, XIAOZHE H. Toll-like receptor agonists *Porphyromonas gingivalis* LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells. J Appl Oral Sci, v.25, n.1, p.90-100, 2017.
 21. TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, DE MOURA-COSTA LF, VALE VC, GALDINO-NETO M, ALVES DOS SANTOS H, DE CARVALHO FILHO PC, STOCKER A, BENDICHO MT, XAVIER MT, DE MORAES MARCÍLIO CERQUEIRA E, MEYER R. Porphyromonas gingivalis HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. J Periodontol., v.84, n.5, p.650-655, 2012.
 22. WANG PL, SHIRASU S, SHINOHAR M, AZUMA Y, DAITO M, YASUDA H, OHURA K. IL-10 inhibits Porphyromonas gingivalis LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. Biochem Biophys Res Commun., v.263, n.2, p. 372-377, 1999.
 23. HERRERO C, HU X, LI WP, SAMUELS S, SHARIF MN, KOTENKO S, IVASHKIV LB. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN- γ . J Immunol.,v.171, n.10, p.5034-5041, 2003.
 24. KOSAKA S, TAMAUCHI H, TERASHIMA M, MARUYAMA H, HABU S, KITASATO H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. Immunobiology, v.216, n.7, p.811-20, 2011.
 25. LI L, MICHEL R, COHEN J, DECARLO A, KOZAROV E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of Porphyromonas gingivalis. BMC Microbiol., v.6, n.8, p.26, 2008.
 26. NORMATON M, MARTI LC. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. Einstein, v.11, n.2, p.237-246, 2013.

27. RUÍZ-GUTIÉRREZ AC, HERRERA-MORA MC, ZAMORA-PÉREZ AL, MELÉNDEZ-RUÍZ, JL, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ VC, GUERRERO-VELÁZQUEZ C. Determinación de los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva. Rev Mex Periodontol, v.5, n.2, p.46-50, 2014.
28. CNCFlora. *Lippia alnifolia* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia alnifolia](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia%20alnifolia)>. Acesso em 12 julho 2019.
29. PINTO CP, RODRIGUES VD, PINTO FP, PINTO RP, UETANABARO AP, PINHEIRO CS, GADEA SF, SILVA TR, LUCCHESI AM. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. Evid Based Complement Alternat Med. v. 2013; p.1-5, 2013.
30. OLIVEIRA TB, SOUZA JS, GOMES-FILHO IS, MOURA D, PEREIRA-FILHO JN, TRINDADE SC. O uso da *Lippia* no tratamento das doenças periodontais. J Dent Pub H., v. 09, n. 03, p.227-237, 2018.
31. VILELA, DAD. Avaliação da atividade espasmolítica e antiasmática do óleo essencial de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (VERBENACEAE). 2018. 88f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina.

CAPÍTULO 2

Avaliação do potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke na periodontite.

Laerte Oliveira Barreto Neto¹, Angélica Maria Lucchese², Rebeca Pereira Bulhosa³, Thais Brito de Oliveira Moura⁴, Ellen Karla Nobre dos Santos⁵, Soraya Castro Trindade⁶

¹ Cirurgião-dentista. Doutorando em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana.

² Doutorado em Química Orgânica. Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana.

³ Biomédica. Mestrado em Imunologia. Universidade Federal da Bahia.

⁴ Bióloga. Doutoranda em Imunologia. Universidade Federal da Bahia.

⁵ Cirurgiã-Dentista. Doutora em Imunologia. Universidade Federal da Bahia.

⁶ Doutora em Imunologia. Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Resumo

A periodontite é uma doença inflamatória crônica induzida por microrganismos, que pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças sistêmicas. A transição do periodonto saudável para o doente depende da disbiose microbiana sinérgica e da resposta imune do hospedeiro, sendo que, neste contexto, *Porphyromonas gingivalis* pode ser considerado um patógeno-chave. Considerando o contexto da prevalência da periodontite no Brasil, país de grande biodiversidade e várias espécies com potencial biotecnológico, o uso de plantas medicinais pode se tornar uma alternativa importante para o controle desta doença a custos mais baixos, beneficiando a população. Objetivo. Avaliar o potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke na periodontite. Métodos. Os grupos de comparação consistiram em um grupo teste, formado por indivíduos com o diagnóstico de periodontite (P) e um grupo controle, com indivíduos sem periodontite (SP). A produção das citocinas nos sobrenadantes da cultura de sangue total foi quantificada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Constatações e principais conclusões. O extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (VM) inibiu a produção de IL-13 (p=0,002), IL-6 (p=0,000) e IFN- γ (p=0,000) em comparação com a produção basal das células (não estimuladas). A utilização do extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke juntamente com o extrato de *P. gingivalis* no cultivo promoveu uma redução nos níveis de IL-1 β (p=0,000), IL-13 (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN- γ (p=0,000), IL-10 (p=0,005) e IL-17 (p=0,003), em relação às concentrações induzidas pelo extrato de *P. gingivalis* isoladamente. O extrato da *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke tem efeito modulador da produção das citocinas induzidas em resposta à presença de antígenos de *Porphyromonas gingivalis*.

Palavras Chave: Citocinas, Doenças Periodontais, Plantas medicinais.

Abstract

Periodontitis is a chronic inflammatory disease induced by microorganisms that may contribute to the development of various systemic diseases. Since the transition from healthy to diseased periodontal tissues depends on synergistic microbial dysbiosis and host immune response, *Porphyromonas gingivalis* can be considered a key pathogen. Considering the prevalence of periodontitis in a country with large biodiversity of species with biotechnological potential such as Brazil, the use of medicinal plants can become a low cost alternative to control periodontitis, benefiting the population. Objective. To evaluate the immunomodulatory potential of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke leaf extract on periodontitis. Methods. The comparison groups consisted of a test group, consisting of individuals diagnosed with periodontitis (P) and a control group, with individuals without periodontitis (WP). Cytokine production in whole blood culture supernatants was quantified using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Considerations and conclusion. *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (VM) extract inhibited IL-13 ($p=0,002$), IL-6 ($p=0,000$) and IFN- γ ($p=0,000$) production compared to basal cell production (unstimulated). The use of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract along with *P. gingivalis* extract in cell cultures promoted a reduction in IL-1 β ($p=0,000$), IL-13 ($p=0,000$), IL-6 ($p=0,000$), IFN- γ ($p=0,000$), IL-10 ($p=0,005$) and IL-17 ($p=0,003$) levels, compared to the concentrations induced by *P. gingivalis* extract alone. *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract has a modulating effect on the production of induced cytokines in response to the presence of *Porphyromonas gingivalis* antigens.

Keywords: Cytokines, Periodontal Diseases, Plants, Medicinal.

2.1 Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória crônica dos tecidos periodontais induzida por microrganismos presentes no biofilme subgengival, que pode contribuir para o desenvolvimento de vários agravos sistêmicos, como asma (SOLEDADE-MARQUES *et al.*, 2018), síndrome metabólica (GOMES-FILHO *et al.*, 2016), doenças cardiovasculares (GOMES-FILHO *et al.*, 2017), nascimento de bebês com baixo peso (CRUZ *et al.*, 2009) e diabetes (GALVIS, ZULUAGA, SALDARRIAGA, 2012). A transição da condição de periodonto saudável para a doença inflamatória periodontal depende da instalação da disbiose microbiana e da resposta imune do hospedeiro (LUNDMARK *et al.*, 2019), sendo que, neste contexto, *Porphyromonas gingivalis* pode ser considerado um microrganismo-chave (CARLOS *et al.*, 2018).

De acordo com o SB Brasil 2010, último levantamento epidemiológico nacional de saúde bucal realizado no país, cerca de um quarto dos adolescentes de 12 anos de idade, um terço dos adolescentes de 15 a 19 anos, aproximadamente a metade dos adultos de 35 a 44 anos de idade e menos de um quinto dos idosos apresentaram sangramento gengival. A presença de cálculo dentário aumentou com a idade, atingindo a maior prevalência entre adultos, aproximadamente 64%. As condições periodontais nas regiões Norte e Nordeste foram piores em todas as idades e os grupos etários, quando comparadas com as demais regiões (BRASIL, 2012)

A ausência de tratamento adequado da periodontite pode levar à perda dentária, tendo alterações físicas, biológicas e psíquicas como consequências, impactando negativamente na qualidade de vida dos indivíduos, prejudicando o desempenho cotidiano (PASSOS-SOARES *et al.*, 2018)

O fator mais importante na manutenção da saúde periodontal é o adequado controle do biofilme (DIAS, SILVA, LIMA, 2015), realizado por métodos mecânicos (escovação, uso do fio dental, raspagem e alisamento radicular, etc) e químicos, como o uso de colutórios e antibióticos (GONÇALVES, PINTO, 2013). Entretanto, devido a resistência à antibioticoterapia convencional e a antissépticos bucais (JUIZ, ALVES, BARROS, 2010), torna-se necessário buscar alternativas para o desenvolvimento de um meio químico eficaz e menos agressivo para o controle do biofilme (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

No Brasil, país de grande biodiversidade e várias espécies com potencial biotecnológico (JUIZ, ALVES, BARROS, 2010), a implantação de ações e serviços de homeopatia, plantas

medicinais e fitoterapia é contemplada pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), aprovada em 2006 (BRASIL, 2006). Desta forma, considerando o panorama da periodontite no país, o uso de plantas medicinais pode se tornar uma alternativa importante para o controle desta doença (CORDEIRO *et al.*, 2006) a custos mais baixos, beneficiando a população (JUIZ, ALVES, BARROS, 2010). Nesta perspectiva, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke na periodontite.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), sendo aprovado sob parecer número 1.344.223 (2015). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

2.2.2 Seleção dos participantes da pesquisa

Indivíduos com boa saúde sistêmica que buscaram os ambulatórios do curso de Odontologia da UEFS para atendimento odontológico, no período de agosto de 2016 a dezembro de 2018 foram convidados para compor a amostra da pesquisa.

Após avaliação realizada a partir da anamnese, os seguintes critérios de não inclusão foram considerados: história de hipertensão, diabetes, doenças autoimunes, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e anti-inflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta.

Os grupos de comparação consistiram em um grupo teste, formado por indivíduos com o diagnóstico positivo para periodontite (CP) e um grupo controle, com indivíduos sem periodontite (SP).

2.2.3 Cálculo do tamanho da amostra

Para calcular o tamanho da amostra foi realizado um estudo piloto, com o propósito de determinar o erro mínimo e o desvio padrão, para um nível de significância de 5% e poder do teste 80%, a serem considerados para a dosagem de interleucina-6 (IL-6) produzida em resposta ao estímulo com *Vatairea macrocarpa (Benth.)Ducke*. Desta forma, considerando o desvio padrão dos níveis de IL-6 de 1.260 pg/mL e um erro mínimo de 950pg/mL, o número de participantes apontado para cada grupo foi de 28 indivíduos. Acrescentando 10% para previsão de perdas, o tamanho total da amostra calculado foi de 31 participantes com periodontite e 31 participantes sem periodontite.

2.2.4 Exame periodontal

Um examinador, cirurgião dentista, previamente treinado (índice Kappa de 0,83 para as medidas de profundidade de sondagem e 0,74 para índice de recessão/hiperplasia), foi responsável pela avaliação da condição periodontal nos indivíduos. Uma sonda milimetrada do tipo Williams foi utilizada para a aferição das medidas que foram registradas no periograma. Foram medidos: índice de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem de sulco/bolsa e a recessão/hiperplasia gengival. Também foram obtidos os valores de nível de inserção para toda a cavidade bucal. Para a obtenção destes dados, foram considerados diferentes locais para cada unidade dentária (disto-vestibular, médio-vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, médio-lingual, mesio-lingual), exceto para o índice de placa visível que foi avaliado apenas em 4 locais (mesial, distal, vestibular e lingual).

2.2.5 Diagnóstico da periodontite

Os participantes selecionados para o grupo CP tiveram o diagnóstico da periodontite quando atingiam os critérios de gravidade moderada ou grave da doença, de acordo com Gomes-Filho et al., 2018. Assim, foram considerados com periodontite os indivíduos que apresentaram ao menos quatro dentes com no mínimo um sítio com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, perda de inserção maior ou igual a 3mm e sangramento à sondagem, no mesmo sítio (GOMES-FILHO et al., 2007).

2.2.6 Cultura de células

Foi realizada punção venosa na fossa antecubital em todos os indivíduos selecionados para a pesquisa, coletando-se 30 mL de sangue de sangue periférico em tubos com heparina com sistema a vácuo.

O sangue coletado foi distribuído em placas para cultivo celular de 24 poços (COSTAR, Coornig Life Science, Tewksbury, MA, EUA), em um fluxo laminar. Para cada participante foram colocados 2 mL de sangue em cada poço, totalizando cinco poços: um poço permaneceu apenas com o sangue total, representando o controle negativo, e em outro, foram colocados 2,5 µg/ml do mitógeno Pokeweed (PWM), como controle positivo; nos três restantes, foram adicionados os antígenos extrato de *P. gingivalis* ATCC 33277 (0,5 µg/mL) (TRINDADE *et al.*, 2008), extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke (10 µg/mL) ou os dois extratos concomitantemente.

As células foram cultivadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Após 48h, o material foi coletado dos poços e utilizou-se uma centrífuga para microtubos para obtenção do sobrenadante, que foi armazenado a - 20°C até o momento das análises.

2.2.7 Obtenção do extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke

As folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke foram coletadas e levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da UEFS, onde foram secas e posteriormente pulverizadas em moinho de facas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, o material foi submetido à extração consecutiva, por três vezes, por maceração com metanol. O extrato bruto obtido foi concentrado por rotaevaporação sob pressão reduzida e em temperatura entre 40° e 45°C. Os resíduos do solvente foram retirados por evaporação em capela de exaustão.

2.2.8 Dosagem de proteína

Alíquotas do extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke foram diluídas em metanol (Synth)/DMSO (Dimetilsulfóxido) (Synth) a 3% e filtradas com membrana estéril de diâmetro de 0,22µm para obtenção da concentração proteica. A dosagem de proteínas foi

realizada com a técnica de Lowry modificada, de acordo com as instruções do fabricante (DC™ ProteinAssay da Biorad, CA, USA) e o resultado foi obtido pela leitura em espectrofotômetro.

2.2.9 Avaliação da citotoxicidade celular

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular do extrato de folhas da *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke, processou-se o sangue de três participantes, para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (TRINDADE *et al.*, 2011), que foram cultivadas nas mesmas condições da cultura de células de sangue total. O extrato, nas concentrações de 1 µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL foi aplicado em diferentes poços. O teste colorimétrico que avalia a conversão de MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium]- em formazan (Sigma, St. Louis, MI, USA), foi empregado seguindo as instruções do fabricante. Para a obtenção das densidades óticas foi utilizado o comprimento de onda de 570nm.

2.2.10 Avaliação da Produção de Citocinas

O método de ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para quantificar a produção das citocinas IL1-β (Invitrogen, CA, USA), IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, (Biolegend, CA, USA) nos sobrenadantes da cultura de sangue total, de acordo com as instruções dos fabricantes.

Os ensaios foram realizados usando-se placas de poliestireno de alta adsorção com 96 poços de fundo chato (COSTAR, Coornig Life Science, Tewksbury, MA, EUA). Após revelação com tetrametilbenzidina (TMB) e parada da reação com H2SO42N, a densidade ótica foi obtida em leitora de ELISA (ELx 800 – Bio-Tek) ajustada para um comprimento de onda na faixa de 450 nm.

2.2.11 Análise estatística

A distribuição dos dados das variáveis idade, número de dentes presentes na boca, descritores clínicos periodontais e concentração das citocinas foi verificada com o teste Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre os grupos SP e CP foi feita com o teste T de Student para a idade e com o teste Mann-Whitney para as demais variáveis. A comparação entre os grupos com relação ao sexo foi feita com o teste Qui-quadrado.

Para a comparação das concentrações de citocinas entre os diversos estímulos empregados no cultivo celular, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis; para a combinação entre os pares de estímulos foi empregado o teste Mann-Whitney com correção de Bonferroni. Todas as análises foram feitas no programa SPSS v.22 e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se valores de $p \leq 0,05$.

2.3 Resultados

O extrato concentrado de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke demonstrou uma concentração proteica de 3,64 mg/ml. Na análise de citotoxicidade celular, foi observado que as células se mantiveram viáveis quando o extrato foi testado a 1 µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL, sendo escolhida a concentração de 10µg/mL para a execução dos experimentos.

Participaram deste estudo 58 indivíduos, sendo 17 com periodontite (CP), com média de idade de 43,18±11,01 anos e 41 sem periodontite (SP), com média de idade de 38,44±12,80 anos. Os grupos CP e SP demonstraram homogeneidade com relação às covariáveis idade e número de dentes presentes na boca (Tabela 1), uma vez que não foi observada diferença estatisticamente significativa. Entretanto, houve diferença entre os grupos com relação ao sexo ($p=0,012$). Demonstrando a pior condição periodontal no grupo CP, houve diferença estatisticamente significativa no percentual de sítios com SS ($p=0,001$), percentual de sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm ($p=0,000$) e percentual de sítios com nível de inserção clínica ≥ 3 mm ($p=0,000$), como pode ser observado na tabela 1).

Tabela 1: Características clínicas dos grupos com periodontite (P) e sem periodontite (SP), diagnosticados segundo os critérios de Gomes-Filho *et al.*, (2007).

DESCRITORES CLÍNICOS	CLASSIFICAÇÃO DA PERIODONTITE Gomes-Filho et al, 2007				P
	Com periodontite (CP)		Sem periodontite (SP)		
	N	%	N	%	
Sexo					
Masculino	10	58,8	10	24,4	0,012
Feminino	07	65,1	31	66,7	
Total	17	100	41	100	
Idade	N=17		N= 41		
Média ±DP	43,18±11,01		38,44±12,80		0,165
Nº de dentes	N=17		N= 41		

Mediana (IQ)	22,00 (19,00-26,00)	24,00 (19,50-27,00)	0,450
% de sítios com sangramento	N=17	N= 41	
Mediana (IQ)	45,65 (28,55-69,77)	9,52 (3,66-32,40)	0,001
% de sítios com profundidade de sondagem ≥4mm	N=17	N= 41	
Mediana (IQ)	16,66 (8,27-38,48)	0,00 (0,00-3,77)	0,000
% de sítios com NIC ≥ 3mm	N=17	N= 41	
Mediana (IQ)	51,85 (15,06-76,05)	7,63 (2,15-18,37)	0,000

As células dos indivíduos do grupo SP cultivadas com o extrato de *Porphyromonas gingivalis* produziram maiores concentrações de IL-1 β que as células do grupo CP cultivadas nas mesmas condições, com medianas de 1784,52 (IQ: 1,392,42-1940,97) pg/mL e 1023,18 (IQ: 133,15-1418,04) pg/mL, respectivamente (p=0,007). Por outro lado, foi observada maior produção de IL-6 pelas células do grupo CP (2,624; IQ: 1,68-2,67) co-estimuladas com os extratos de com *Vaiterea macrocarpa* e *Porphyromonas gingivalis*, em comparação com as células do grupo SP (0,211; IQ:0,07-2,11).

Na comparação dos níveis de citocinas entre as condições de cultivo, foi possível detectar concentrações mais altas de IL-1 β (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN- γ (p=0,000), IL-10 (p=0,004) e IL-17 (p=0,006) nas culturas das células cultivadas com o extrato de *Porphyromonas gingivalis* (PG) do que daquelas células não estimuladas (B). O extrato de *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*)*Ducke* (VM) inibiu a produção de IL-13 (p=0,002), IL-6 (p=0,000) e IFN-g (p=0,000), mantendo estes níveis reduzidos mesmo quando as células foram co-cultivadas com os extratos de *Vatairea macrocarpa* e de *P. gingivalis* (VM+PG).

Foram mensuradas concentrações mais elevadas de IL-1 β (p=0,000), IL-13 (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN-g (p=0,000), IL-10 (p=0,003) e IL-17 (p=0,003) produzidas pelas células cultivadas com o extrato de *P. gingivalis* do que por aquelas cultivadas com o extrato de *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*)*Ducke*. Além disso, a combinação dos extratos de *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*)*Ducke* e *P. gingivalis* no cultivo promoveu uma redução nos níveis de IL-1 β (p=0,000), IL-13 (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN- γ (p=0,000), IL-10 (p=0,005) e IL-17 (p=0,003), em relação às concentrações induzidas pelo extrato de *P. gingivalis* isoladamente e um aumento nos níveis de IL-1b (p=0,000) em relação à utilização do extrato de *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*)*Ducke* sozinho.

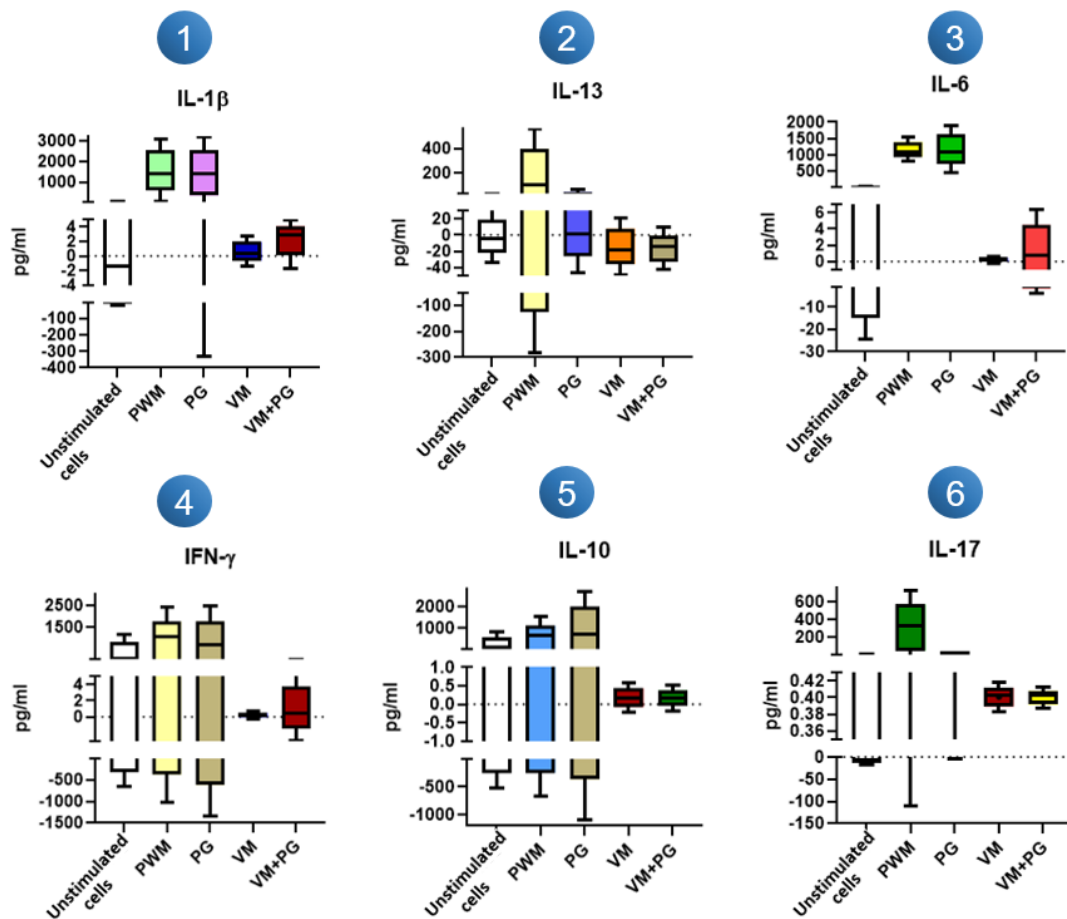


Figura 1: Concentração de citocinas (pg/mL) em sobrenadante de cultura de células do sangue periférico humanas cultivadas sem estimulação antigênica (Branco), com o mitógeno *pokeweed* (PWM), com o extrato de *P. gingivalis* (PG), com o extrato de *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*)*Ducke* (VM) e com ambos os extratos concomitantemente (VM+PG). A: interleucina 1 β (IL-1 β); B: interleucina 13 (IL-13); C: interleucina 6 (IL-6); D: interferon γ (IFN- γ); E: interleucina 10 (IL-10) e F: interleucina 17 (IL-17).

2.4 Discussão

De acordo com os achados do presente estudo, o extrato de *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*)*Ducke* tem a capacidade de inibir a produção *in vitro* de IL-13 e IFN- γ por células do sangue periférico humanas. Além disso, parece promover a regulação negativa da produção de IL-1 β , IL-13, IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-17, em contraponto à estimulação antigênica pelo extrato de *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria considerada patógeno chave na disbiose periodontal (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2011), relacionada ao início e à progressão da periodontite (JUIZ *et al.*, 2016)

A IL-1 β e a IL-6 são citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata encontradas em grande quantidade nos tecidos periodontais e no fluido gengival de sítios com periodontite

(MENEGAT *et al.*, 2010, LIMA *et al.*, 2011). Atuam no recrutamento de leucócitos para o local da infecção, estimulação da liberação de outros mediadores inflamatórios, além de desequilibrar o eixo RANK-RANKL-OPG (SINGH *et al.*, 2012, KWAN *et al.*, 2004), levando a reabsorção óssea. Diversos antígenos de *P. gingivalis* têm demonstrado a capacidade de estimular a sua produção, o que pode explicar parcialmente a interação patógeno-hospedeiro na patogênese da doença. Isto revela o potencial do extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke no controle da periodontite.

Embora seja considerada uma citocina imunorreguladora, a IL-10 também está relacionada à resposta à infecção por *Porphyromonas gingivalis* (LIU *et al.*, 2017, TRINDADE *et al.*, 2012, WANG *et al.*, 1999) Sabe-se que a produção desta citocina é desencadeada para regular a produção de IFN- γ , característica da resposta Th1 (HERRERO *et al.*, 2003), bem como pode controlar, positiva ou negativamente, a produção de citocinas do perfil Th2, como IL-4 e IL-13 (KOSAKA *et al.*, 2011). Como *Porphyromonas gingivalis* é um patógeno intracelular facultativo, isto é, embora não seja o seu habitat de escolha, a bactéria pode sobreviver no compartimento intracelular (LI *et al.*, 2008), pode desencadear diferentes tipos de resposta no hospedeiro. Consequentemente, ocorrerá uma maior ou menor destruição tecidual, a depender da combinação de mediadores produzidos. A possibilidade do extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke atuar na inibição destas citocinas de diversos perfis também parece ser favorável para o seu uso no manejo da inflamação periodontal.

Com relação à IL-17, esta é a citocina de assinatura do perfil Th17, que é caracterizado por uma intensa resposta neutrofílica (NORMATON, MARTI, 2013). Vale salientar que os neutrófilos são as células mais descritas na patogênese da periodontite, cuja funcionalidade e mobilidade defeituosas estão fortemente relacionadas à patogênese da doença (GAUDILLIERE *et al.*, 2019). Sugere-se também que a IL-17 esteja envolvida na reabsorção óssea da periodontite (RUÍZ-GUTIERREZ *et al.*, 2014). Estas considerações levam a crer que o perfil TH17 pode ser induzido na periodontite e que a sua regulação seja necessária para o retorno à homeostase tecidual.

A *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke pertence à família Leguminosae (ou Fabaceae). É uma árvore selvagem nativa do cerrado e amplamente distribuída através todo o território brasileiro, usada popularmente em indivíduos com diabetes (SANTOS *et al.*, 2019). *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke possui propriedades antimicrobiana (VALADARES, 2017, MATOS, AGUIAR, SILVA, 1988), antiulcerogênica (JESUS, 2007), hipoglicemiante (OLIVEIRA *et al.*, 2008) porém ainda são escassos os estudos que avaliaram as suas

propriedades biológicas, principalmente relacionadas a condições inflamatórias e infecciosas da boca.

Deste modo, ainda não se conhece aspectos importantes sobre a administração deste extrato, como o veículo, a concentração ideal a ser empregada e os seus efeitos colaterais. No presente estudo, a citotoxicidade do extrato nas concentrações de 1 µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL, foi testada *in vitro*, demonstrando baixa agressividade às células do hospedeiro. A concentração de 10µg/mL foi escolhida para a realização da estimulação antigênica e determinação da concentração de citocinas em razão de também ter sido testada em estudo piloto prévio com *Artemia salina* (dados não mostrados), sendo o mais alto valor não citotóxico encontrado. Além disso, concentrações inferiores não poderiam garantir a estimulação antigênica necessária para as avaliações.

Vale salientar que a estimulação das células do sangue periférico foi realizada *in vitro*, o que dificulta a possibilidade de extrapolação dos resultados. Outra limitação importante foi o pequeno tamanho da amostra, que pode ter interferido no poder da análise e, conseqüentemente, nos resultados das comparações entre os grupos de indivíduos com e sem a periodontite.

Entretanto, é importante ressaltar que não foram encontrados estudos que tenham investigado a regulação da produção de citocinas pelo extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke, principalmente no contexto da infecção periodontal por *Porphyromonas gingivalis*. Neste sentido, esforços devem ser realizados para investigar as propriedades biológicas deste extrato *in vivo*, para determinar se este extrato pode ser uma ferramenta no tratamento adjuvante da periodontite.

2.5 Conclusão

O extrato da *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke regula a produção de citocinas produzidas em resposta à presença de antígenos de *Porphyromonas gingivalis*.

REFERÊNCIAS

1. SOLEDADE-MARQUES KR, GOMES-FILHO IS, DA CRUZ SS, PASSOS-SOARES JS, TRINDADE SC, CERQUEIRA EMM, COELHO JMF, BARRETO ML, COSTA MDCN, VIANNA MIP, SCANNAPIECO FA, CRUZ AA, SOUZA-MACHADO A. Association between periodontitis and severe asthma in adults: A case–control study. Oral Dis., v.24, n.3, p. 442-448, 2018.

2. GOMES-FILHO IS, MERCÊS MC, PASSOS-SOARES JS, CRUZ SS, TEIXEIRA AML, TRINDADE SC, CERQUEIRA EMM, COELHO JMF, MONTEIRO FMM, BARRETO ML, VIANNA MIP, COSTA MCN, SEYMOUR GJ, SCANNAPIECO FA. Severity of Periodontitis and Metabolic Syndrome: Is There an Association? *J Periodontol.*, v.87, n.4, p. 357-366, 2016.
3. GOMES-FILHO IS, FARIAS NSA, SANTOS CAST, PASSOS-SOARES JS, BARRETO ML, CRUZ SS, BARBOSA PJB, MARQUES-NETO J, COELHO JMF, CERQUEIRA EMM, HINTZ AM, COELHO AF, FIGUEIREDO ACG, SANTOS PNP, BUISCHI YP, TRINDADE SC. Periodontal Disease as a Risk Factor for Acute Myocardial Infarction. *Periodontal Disease as a Risk Factor for Acute Myocardial Infarction. EC Dental Science*, v. 10.2, p. 62-71, 2017.
4. CRUZ SS, COSTA MC, GOMES-FILHO IS, REZENDE EJ, BARRETO ML, DOS SANTOS CA, VIANNA MI, PASSOS JS, CERQUEIRA EM. Contribution of periodontal disease in pregnant women as a risk factor for low birth weight. *Community Dent Oral Epidemiol.*, v.37, n.6, p. 527-533, 2009.
5. GALVIS MM, ZULUAGA YPM, SALDARRIAGA AS. Diabetes y enfermedad periodontal: hacia un modelo clínico bidireccional. *Rev. Nac. de Odontología*, v.14, n.8, p.76-87, 2012.
6. LUNDMARK A, HU YOO, HUSS M, JOHANNSEN G, ANDERSSON AF, YUCEL-LINDBERG T. Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* v.21, p. 1-32, 2019.
7. CARLOS JC, SETE MRC, SZTAJNBOK FR, FIGUEREDO CMS. Infecção periodontal por *Porphyromonas gingivalis*: de uma inflamação oral a um possível “gatilho” para a autoimunidade via citrulinização de proteínas. *Braz J Periodontol.*, v.28, n.04, p.48-56, 2018.
8. BRASIL. Projeto SB 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde [2012]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf. Acesso em 05 mar 2019.
9. PASSOS-SOARES JS, GOMES-FILHO IS, SANTOS LPS, SANTOS PNP, SILVA, ICO, BALINHA ISCE, TRINDADE SC. Impacto da perda dentária na qualidade de vida relacionada a saúde bucal de adultos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v.17, n.2, p.158-163, 2018.
10. DIAS JN, SILVA MPCF, LIMA IPC. O uso de fitoterápicos à base de aroeira como coadjuvante no tratamento da gengivite: Revisão Sistemática. *Rev. Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.17, p. 1187-1191, 2015.
11. GONÇALVES EA; PINTO PF. Avaliação da eficácia antimicrobiana dos enxaguatórios bucais contendo como princípios ativos o triclosan, cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais. *HU Revista Juiz de Fora*, v.39, n.03, p.45-50, 2013.
12. JUIZ PJL; ALVES RJC; BARROS TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Rev. bras. farmacogn*, v.20, n.01, p.134-139, 2010.

13. OLIVEIRA TB, SOUZA JS, GOMES-FILHO IS, MOURA D, PEREIRA-FILHO JN, TRINDADE SC. O uso da Lippia no tratamento das doenças periodontais. *J Dent Pub H.*, v. 09, n. 03, p.227-237, 2018.
14. BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília: Poder Executivo [2006]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em 03 mai 2019.
15. CORDEIRO CHG, SACRAMENTO LVS, CORRÊA MA, PIZZOLITTO AC, BAUAB TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.42, n.03, p. 395-404, 2006.
16. GOMES-FILHO IS, CRUZ SS, REZENDE EJ, DOS SANTOS CA, SOLEDADE KR, MAGALHÃES MA, AZEVEDO AC, TRINDADE SC, VIANNA MI, PASSOS JS, CERQUEIRA EM. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol.*, v.34, n.11, p. 957-963, 2007.
17. TRINDADE SC, GOMES-FILHO IS, MEYER RJ, VALE VC, PUGLIESE L, FREIRE SM. Serum antibody levels against Porphyromonas gingivalis extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol.*, v.10, n.02, p.50-58, 2008.
18. TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, MOURA-COSTA LF, CERQUEIRA EM, GALDINO-NETO M, ALVES H, CARVALHO-FILHO PC, XAVIERMT, MEYER R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by Porphyromonas gingivalis HmuY in humans. *J Periodontal Res.*, v.47, n.01, p.27-32, 2011.
19. HAJISHENGALLIS G, LIANG S, PAYNE MA, HASHIM A, JOTWANI R, ESKAN MA, MCINTOSH ML, ALSAM A, KIRKWOOD KL, LAMBRIS JD, DARVEAU RP, CURTIS MA. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. *Cell Host & Microbe*, v. 10, n.05, p. 497-506, 2011.
20. JUIZ, PJJ, SILVA, F, CAMPOS MJA, UETANABARO APT, CAMPOS RJ, ALVES, AML. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Ocimum americanum e Ocimum basilicum sobre periodontopatógenos. *Braz J Periodontol.*, v.26, n.04, p. 07-14, 2016.
21. MENEGAT J, BRITO F, BARROS F, PEDREIRA R, FISCHER RG, FIGUEIREDO CMS. Níveis elevados de IL-6 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica e retrocolite ulcerativa idiopática. *Periodontia*, v.20, n.02, p. 61-68, 2010.
22. LIMA V, BEZERRA MM, LEITÃO RFDC, BRITO GADC, ROCHA, FACD, RIBEIRO RDA. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da Periodontite–Papel de Moduladores Farmacológicos. *R Periodontia*, v.18, n.03, p.07-19, 2008.
23. SINGH A, MEHDI AA, SRIVASTAVA RN, VERMA NS. Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci.*, Mai, v.02, n.02, p.75-81, 2012.

24. KWAN TS, PADRINES M, THÉOLEYRE S, HEYMANN D, FORTUN Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.15, n.01, p.49-60, 2004.
25. LIU Z, HU Y, YU P, LIN M, HUANG G, KAWAI T, TAUBMAN M, WANG Z, XIAOZHE H. Toll-like receptor agonists *Porphyromonas gingivalis* LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells. *J Appl Oral Sci*, v.25, n.01, p. 90-100, 2017.
26. TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, DE MOURA-COSTA LF, VALE VC, GALDINO-NETO M, ALVES DOS SANTOS H, DE CARVALHO FILHO PC, STOCKER A, BENDICHO MT, XAVIER MT, DE MORAES MARCÍLIO CERQUEIRA E, MEYER R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. *J Periodontol.*, v.84, n.05, p.650-655, 2012.
27. WANG PL, SHIRASU S, SHINOHAR M, AZUMA Y, DAITO M, YASUDA H, OHURA K.. IL-10 inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.263, n.02, p.372-377, 1999.
28. HERRERO C, HU X, LI WP, SAMUELS S, SHARIF MN, KOTENKO S, IVASHKIV LB. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN- γ . *J Immunol.*, v.171, n.10, p.5034-5041, 2003.
29. KOSAKA S, TAMAUCHI H, TERASHIMA M, MARUYAMA H, HABU S, KITASATO H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology*, v.216, n.07, p. 811-20, 2011
30. LI L, MICHEL R, COHEN J, DECARLO A, KOZAROV E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.*, v.06, n.08, p.01-11, 2008.
31. NORMATON M, MARTI LC. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. *Einstein*, v.11, n.02, p.237-246, 2013.
32. GAUDILLIERE DK, CULOS A, DJEBALI K, TSAI AS, GANIO EA, CHOI WM, HAN X, MAGHAIREH A, CHOISY B, BACA Q, EINHAUS JF, HEDOU JJ, BERTRAND B, ANDO K, FALLAHZADEH R, GHAEMI MS, OKADA R, STANLEY N, TANADA A, TINGLE M, ALPAGOT T, HELMS JA, ANGST MS, AGHAEPOUR N, GAUDILLIERE B. Systemic Immunologic Consequences of Chronic Periodontitis. *J Dent Res.*, v.21, p.01-11, 2019.
33. RUÍZ-GUTIÉRREZ AC, HERRERA-MORA MC, ZAMORA-PÉREZ AL, MELÉNDEZ-RUÍZ, JL, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ VC, GUERRERO-VELÁZQUEZ C. Determinación de los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva. *Rev Mex Periodontol*, v.05, n.02, p.45-50, 2014.
34. SANTOS JA, GRACIANI FS, KASSUAYA CAL, SALVADOR JM, CARDOSO CAL. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das cascas de *Vatairea macrocarpa* (Benth) Ducke em camundongos pelo modelo de pleurisia. *Rev Ciên Farm Básica Apl.*, Araraquara, v.37, n.1, 2016. Disponível em: <http://seer.fcfar.unesp.br/rcfba/index.php/rcfba/article/view/507/312>. Acesso em: 04.06.2019.

35. VALADARES SNS. Composição química, toxicidade e atividade biológica de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Leguminosae) Feira de Santana: UEFS, 2017.
36. MATOS FJA, AGUIAR LMBA, SILVA M. GORETTI V. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana de *Vatairea macrocarpa* Ducke. Acta Amazônica, v.18, n.01, p.351-352, 1988.
37. JESUS NZT. Levantamento etnobotânico e triagem antiúlcera e antiedematogênica de plantas medicinais do distrito de Pirizal-MT: avaliação da atividade antiúlcera do extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. Cuiabá: UFMT, 2007.
38. OLIVEIRA HC, SANTOS MP, GRIGULO R, LIMA LL, MARTINS DT, LIMA JC, STOPPIGLIA LF, LOPES CF, KAWASHITA NH. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. J Ethnopharmacol., v.115, n.03, p. 515-519, 2008.

CAPÍTULO 3

Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke

Laerte Oliveira Barreto Neto¹, Angélica Maria Lucchese², Rebeca Pereira Bulhosa³, Thais Brito de Oliveira Moura⁴, Ellen Karla Nobre dos Santos-Lima⁵, Soraya Castro Trindade⁶.

¹ Cirurgião-dentista. Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana.

² Doutora em Química Orgânica. Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana.

³ Biomédica. Mestre em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

⁴ Bióloga. Doutoranda em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

⁵ Cirurgiã-dentista. Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

⁶ Doutora em Imunologia. Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Resumo

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade e a Caatinga é um de seus ecossistemas mais ricos em número de espécies de plantas. No entanto, poucos produtos surgiram desse rico universo químico. O presente estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do extrato das espécies vegetais *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. Nos ensaios de concentração inibitória mínima, o extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer apresentou atividade bacteriostática para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*; atividade fungistática para *Candida albicans* e fungicida para *Candida glabrata*. O extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke apresentou atividade bactericida para a espécie *Micrococcus luteus* e bacteriostática para as bactérias supracitadas, bem como atividade fungistática para *Candida albicans* e fungicida para *Candida glabrata*. Os extratos de *Lippia alnifolia* e *Vatairea macrocarpa* são promissores para o controle dos referidos microrganismos, portanto outros estudos podem determinar a efetividade de tais extratos no controle microbiológico e seu potencial biotecnológico.

Palavras-Chave: plantas medicinais, anti-infecciosos, bioprospecção.

Abstract

Brazil is a high biodiversity country and Caatinga is one of its largest ecosystems in the number of plant species. However, few products have been taken from the rich chemical universe. The present study aimed the antimicrobial activity of the extract of plant species *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer and *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. In negative action assays, *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer, bacteriostatic collection for *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella choleraesuis*; fungistatic activity for *Candida albicans* and fungicidal for *Candida glabrata*. The leaf extract of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke-hatched as a species of luteo and bacteriostatic microorganism for aforementioned as well as fungicidal activity for *Candida albicans* and fungicide for *Candida glabrata*. *Lippia alnifolia* and *Vatairea macrocarpa* extracts are promising for the control of microorganisms.

Keywords: medicinal plants, antiinfectives, bioprospecting.

3.1 Introdução

Ao longo da história, sempre existiu uma estreita relação entre o homem e as plantas, vinculada diretamente à sobrevivência, com papel decisivo na formação das populações. Nas comunidades tradicionais, assim como nas comunidades rurais, existe grande acervo de plantas nativas e cultivadas, que fornecem variados subprodutos, os quais, além de suprir as necessidades primárias dos habitantes, apresentam relevantes propriedades terapêuticas (GOMES, 2017).

No Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) foi aprovada em 2006, em consonância com as recomendações da OMS, contemplando diretrizes e responsabilidades institucionais para implantação/adequação de ações e serviços de homeopatia, plantas medicinais e fitoterapia (BRASIL, 2006). A aprovação da PNPIC desencadeou o desenvolvimento de políticas, programas e projetos em todas as instâncias governamentais, pela institucionalização dessas práticas no SUS. Essas ações buscam ampliar a oferta de serviços e produtos relacionados à fitoterapia no SUS, de forma segura e racional, por profissionais de saúde qualificados, considerando o sujeito em sua singularidade e inserção sociocultural, promovendo a integralidade da atenção (TRIPPO *et al.*, 2017).

Apesar da biodiversidade brasileira e das publicações acadêmicas sobre plantas em revistas científicas internacionais, poucos fármacos e patentes foram derivados de tais estudos (DUTRA *et al.*, 2016). Dentre as principais razões, pode-se citar a falta de regulamentação específica para permitir que pesquisadores e empresas tenham acesso à biodiversidade para fins de inovação científica e tecnológica; e a ausência de um programa governamental de longo prazo para apoiar a pesquisa e a inovação nesse campo (CALIXTO, 2019).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, apresentando mais de 15% de todas as espécies vivas. O Nordeste brasileiro compreende uma grande parte do território nacional e possui características peculiares de solo, vegetação e clima. A região do semiárido nordestino apresenta vegetação adaptada a condições peculiares, tais como baixos índices pluviométricos e longos períodos de estiagem. Apesar disso, a Caatinga é um bioma brasileiro rico em número de espécies de plantas. (LUCENA *et al.*, 2013).

No entanto, poucos produtos surgiram desse rico universo químico. A biodiversidade da Caatinga poderia ser uma das principais fontes de prospecção de produtos naturais, os quais seriam aplicados na melhoria da qualidade de vida da população mundial (VALLI, RUSSO,

BOLZANI, 2018), possibilitando tratamentos efetivos e de baixo custo.

Neste cenário, as plantas do gênero *Lippia* são usadas popularmente como antissépticos e no tratamento de doenças infecciosas (PINTO *et al.*, 2013), incluindo patologias da cavidade bucal (OLIVEIRA *et al.*, 2018). *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer possui propriedades antisséptica, antimicrobiana, antitussígena e expectorante (VILELA, 2018). Bem como *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke é usada popularmente em indivíduos com diabetes como hipoglicemiante (SANTOS *et al.*, 2016), possui propriedades antimicrobiana e antiulcerogênica (MATOS, AGUIAR, SILVA, 1998; JESUS, 2007).

Os estudos que avaliaram as propriedades biológicas dessas espécies são escassos, principalmente quando relacionados a condições inflamatórias e infecciosas da boca. Nessa perspectiva, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato das espécies vegetais *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke.

3.2 Revisão de Literatura

3.2.1 *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer

As plantas do gênero *Lippia* são arbustos pertencentes à família *Verbenaceae* (CNCFlora, 2012), usados popularmente como antissépticos, bem como no tratamento de doenças infecciosas (PINTO *et al.*, 2013). São encontrados em diversos estados do Brasil e possuem inúmeras propriedades terapêuticas já utilizadas na cultura popular para diversas enfermidades, incluindo afecções da cavidade bucal (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Existe uma espécie de *Lippia* que é endêmica do Estado da Bahia, sendo encontrada na região da Chapada Diamantina, denominada *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (CNCFlora, 2012). É um arbusto aromático que cresce em solos arenosos, entre rochas (MATES *et al.*, 2000). Está citada na “Lista de espécies da flora brasileira com deficiência de dados”, presente no Anexo II, página 5, da Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008, do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2008) e ainda é pouco estudada, com dados escassos na literatura sobre suas propriedades.

Um estudo para a revisão e atualização taxonômica da família *Verbenaceae* para a Flora do Brasil (SALIMENA, MÚLGARA, 2015) relatou que a *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer foi descrita com base na coleção de Martius s.n., havendo a referência: “In campis graminosis Brasiliae, in Prov. Minarum et Bahiensis”. Conhecida popularmente como alecrim-

do-mato (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007) e pedressa (MATES *et al.*, 2000), trata-se de um arbusto de até 2,5 m de altura com folhas coriáceas, aromáticas e rugosas e flores rosadas. É encontrada em afloramentos rochosos de campos rupestres, em altitudes de 1000-1500 m. Floresce em março e julho e frutifica em julho (MOLDENKE, 1981).

Na Bahia, é encontrada na região da Chapada Diamantina, no Morro do Pai Inácio. Nesta região, foram descritas densidades absolutas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer de 3,48 ind./ha no Platô Cruz, platô mais alto que abrange o cume de 1.170 metros de altitude; e de 1,55 ind./ha no Platô Dois, 50 m abaixo do primeiro. Os substratos nos dois platôs são compostos por afloramentos rochosos de quartzito-arenito, solos arenosos e fragmentos de rochas variáveis em tamanho. A espécie também é encontrada em áreas de conservação nessa região, como a Área de Proteção Ambiental Marimbus-Iraquara. Os locais onde a espécie ocorre estão sujeitos a degradações causadas por atividades como exploração de recursos vegetais nativos, abertura de pastagens, queimada, garimpo e agricultura (CONCEIÇÃO, GIULIETTI, 2002).

Apesar dos poucos estudos existentes com a *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer na literatura científica, sabe-se que os constituintes principais do seu óleo essencial são o limoneno (47,2%) e óxido de piperitenona (44,6%) (MATES *et al.*, 2000). O óxido de piperitenona é um elemento que elimina amebas e giárdias, os quais são parasitas intestinais (ADJUTO, 2008); enquanto o limoneno possui atividade gastroprotetora (ROZZA *et al.*, 2011) e pode ser eficaz no tratamento da asma brônquica devido ao seu efeito anti-inflamatório (HIROTA *et al.*, 2010). Além disso, tem sido investigada a ação antibacteriana de seu extrato metanólico, com resultados que justificam o seu uso popular contra dermatite, infecções vaginais e como antisséptico bucal (PINTO *et al.*, 2013).

3.2.2. *Vaitarea macrocarpa* (Benth.) Ducke

Vaitarea macrocarpa (Benth.) Ducke pertence à família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) (OLIVEIRA *et al.*, 2008). É uma árvore selvagem nativa do bioma Cerrado e é amplamente distribuída através de todo o território brasileiro. É conhecida popularmente como amargoso por seu sabor amargo e também como maleiteira e angelim-do-cerrado na savana central. O seu uso tradicional se dá com a cocção da casca, com a obtenção de um chá castanho-avermelhado, para o controle do diabetes (SANTOS *et al.*, 2016).

O extrato metanólico de *Vaitarea macrocarpa* (Benth.) Ducke demonstrou efeito preventivo de ulcerações e promoveu elevação no conteúdo de muco da mucosa gástrica. Em

análise fitoquímica, foi detectada a presença de flavonóis, flavonas, taninos, esteróides, quinonas e resinas. Desta forma, o efeito antiulcerogênico do extrato pode estar relacionado com sua atividade antioxidante e citoprotetora através da elevação do muco da parede gástrica (JESUS, 2007).

O extrato acetônico da planta mostrou acentuada atividade antibacteriana sobre *Klebsiella sp.* e *Staphylococcus aureus*, mas se mostrou inativo frente às bactérias *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*, bem como para os fungos *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* (MATOS, AGUIAR, SILVA, 1998).

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Obtenção do extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke

As folhas de *Lippia alnifolia* foram coletadas no Pico das Almas, em Rio de Contas (Bahia), em 13 de setembro de 2013. Uma exsicata foi depositada no herbário da UEFS (HUEFS 213618). As folhas de *Vatairea Macrocarpa* foram coletadas na Rodovia Caetitê-Guanambi (BR-030), Bahia, em 28 de julho de 2013 e uma exsicata foi confeccionada e depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) sob a numeração 205330

As folhas das duas espécies, separadamente, foram submetidas ao seguinte processo: secagem à temperatura ambiente e ao abrigo da luz; posteriormente, pulverização em moinho de facas. A extração foi realizada por maceração com etanol por três vezes consecutivas. O extrato bruto foi então concentrado em evaporadores rotatórios sob pressão reduzida e em temperatura de 40-45°C. Os resíduos do solvente foram retirados por evaporação em capela de exaustão.

3.3.2 Teste de difusão em disco

A avaliação do potencial antimicrobiano foi efetuada de acordo com a norma M2-A8 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. As cepas bacterianas foram cultivadas por 24h em meio Mueller Hinton (Himedia, Índia) e as linhagens fúngicas em 48h em Ágar Saboroud Dextrose (Kasvi, Itália)

em estufa bacteriológica a 37°C. As linhagens bacterianas e fúngicas usadas são pertencentes à *American Type Culture Collection* (ATCC). Dentro desta coleção, foram utilizadas as bactérias *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC94863), *Micrococcus luteus* (ATCC10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC14028) e os fungos *Candida albicans* (ATCC18804) e *Candida glabrata* (CCT0728).

Uma suspensão microbiana foi preparada após o crescimento dos fungos e das bactérias usando uma solução salina a 0,9% estéril. Os inóculos de bactérias e fungos foram misturados na solução salina, ajustando-se até atingir a turbidez comparável com a solução padrão de McFarland a 0,5 (correspondendo de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL). Com auxílio de um swab estéril, o inóculo da solução microbiana foi semeado em placa de Petri contendo os meios de cultura respectivos para bactérias e fungos.

Em seguida, foram colocados os discos de papel filtro 6mm de diâmetro, contendo 10µL do extrato vegetal (*Lippia alnifolia* Mart. & Schauer ou *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke) na concentração de 100 mg/mL, em triplicata; um disco controle contendo DMSO, um disco contendo Cloranfenicol (30µg) (Laborclin, SP, Brasil) e Ciclopirox olamina (Mupirox) (10mg/mL) (EMS, SP, Brasil).

Após esta etapa, as placas contendo os discos foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. A leitura foi realizada mensurando os diâmetros dos halos inibitórios formados ao redor dos discos com antimicrobianos e antifúngicos, com o uso de uma régua milimetrada sobre a placa invertida, após 24 e 48h.

3.3.3 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi baseada no método de microdiluição em caldo proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), Norma M100-S15. As linhagens bacterianas utilizadas foram *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC14028) e as linhagens fúngicas foram *Candida albicans* (ATCC18804) e *Candida glabrata* (CCT0728).

Para a realização do ensaio, os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton (Himedia, Índia) e Ágar Sabouraud dextrose (Kasvi, Itália)

por 24 h para as bactérias e 48 h para os fungos. Em seguida, em placa de 96 poços estéril com tampa foram distribuídos 100 µl do meio de cultura Nutrient Broth (Himedia, Índia) em cada poço e o mesmo volume do extrato vegetal (*Lippia alnifolia* Mart. & Schauer ou *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke) na primeira fileira em triplicata. Além disso, o mesmo volume foi adicionado para os controles (DMSO a 1% e Cloranfenicol para bactérias ou Ciclopirox olamina para os fungos). Posteriormente, foi feita uma diluição seriada, deixando a última fileira apenas com meio de cultura. Em seguida, foram distribuídos 100 µL de suspensão microbiana em cada poço, exceto na última fileira. Ao final, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C (24 h para as bactérias e 48 h para os fungos) para avaliação do efeito do extrato a seu modo de ação bacteriostático ou bactericida.

3.4 Resultados

Os extratos das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (Tabela 1) e de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Tabela 2) levaram à formação de halos de crescimento das bactérias *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis* no teste de difusão em disco, realizado em 24 horas. A bactéria *Escherichia coli* também apresentou halos de inibição em presença de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke, como demonstrado na tabela 2.

Quanto à ação antifúngica, o extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer não induziu halos de inibição, quando em contato com as espécies de fungos *Candida albicans* e *Candida glabrata* em testes de difusão em disco, realizado em 48h (Tabela 3). O extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke não induziu halos de inibição quando em contato com as espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata* em testes de difusão em disco, realizado em 48h (Tabela 4).

Nos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), como pode ser observado na tabela 5, o extrato das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer apresentou atividade bacteriostática para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CIM: 1000mg/mL), *Escherichia coli* ATCC 94863 (CIM: 1000mg/mL), *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (CIM: 500mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (CIM: 250mg/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (CIM: 1000mg/mL) e *Salmonella choleraesuis* ATCC14028 (CIM: 250mg/mL). Apresentou atividade fungistática para *Candida albicans* (CIM: 62,5 mg/mL) e fungicida para *Candida glabrata* (CIM: 250 mg/mL).

O extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke apresentou atividade bactericida para a espécie *Micrococcus luteus* e bacteriostática para as demais bactérias testadas, bem como atividade fungistática para *Candida albicans* e fungicida para *Candida glabrata*, nas mesmas CIM testadas para o extrato de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer, como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 1 - Halos de inibição das espécies de bactérias pelo extrato metanólico das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (Teste de difusão em disco realizado em 24h)

Microrganismo	Metanol / DMSO 3% (CN)	Clorafenicol (10µg/mL) (CP)	Extrato das folhas de <i>Lippia alnifolia</i> Mart. & Schauer (100mg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	R	30	SH
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 94863)	R	24	SH
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	R	35	(13, 12, 10)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	R	25	(7, 7, 9)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	R	25	R
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC14028)	R	23	(7, 8, 9)

CN=Controle Negativo, CP= Controle Positivo, R=Resistente, SH= Sem halo

Tabela 2 - Halos de inibição das espécies de bactérias pelo extrato metanólico das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Teste de difusão em disco realizado em 24h)

Microrganismo	Metanol / DMSO 3% (CN)	Clorafenicol (10µg/mL) (CP)	Extrato das folhas de <i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke (100mg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	R	30	SH
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 94863)	R	24	(13, 19, 19)

<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	R	35	(20, 17, 20)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	R	25	(12, 12, 15)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	R	25	R
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC14028)	R	23	(9, 8, 9)

CN=Controle Negativo, CP= Controle Positivo, R=Resistente, SH = Sem halo.

Tabela 3 - Halos de inibição das espécies de fungos pelo extrato metanólico das folhas de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (Teste de difusão em disco realizado em 48h)

Microrganismo	Metanol / DMSO 3% (CN)	Ciclopirox olamina (100mg/mL) (CP)	Extrato das folhas de <i>Lippia alnifolia</i> Mart. & Schauer (100mg/mL)
<i>Candida albicans</i> (ATCC18804)	R	22	SH
<i>Candida glabrata</i> (CCT0728)	R	30	SH

CN=Controle Negativo, CP= Controle Positivo, R=Resistente, SH= Sem halo.

Tabela 4 - Halos de inibição das espécies de fungos pelo extrato metanólico das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Teste de difusão em disco realizado em 48h)

Microrganismo	Metanol / DMSO 3% (CN)	Ciclopirox olamina (100mg/mL) (CP)	Extrato das folhas de <i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke (100mg/mL)
<i>Candida albicans</i> (ATCC18804)	R	22	SH
<i>Candida glabrata</i> (CCT0728)	R	30	SH

CN=Controle Negativo, CP= Controle Positivo, R=Resistente, SH = sem halo.

Tabela 5 - Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e o efeito inibitório do extrato metanólico de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (24h para bactérias e 48h para fungos)

Microrganismo	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL)	Efeito Antimicrobiano
BACTÉRIAS		
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	1000	Bacteriostático
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 94863)	1000	Bacteriostático
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	500	Bacteriostático
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	250	Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	1000	Bacteriostático
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC14028)	250	Bacteriostático
FUNGOS		
<i>Candida albicans</i> (ATCC18804)	62,5	Fungistático
<i>Candida glabrata</i> (CCT0728)	250	Fungicida

Tabela 6- Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e o efeito inibitório do extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (24h para bactérias e 48h para fungos)

Microrganismo	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL)	Efeito Antimicrobiano
BACTÉRIAS		
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	1000	Bacteriostático
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 94863)	1000	Bacteriostático
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	500	Bactericida
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	250	Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	1000	Bacteriostático
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC14028)	250	Bacteriostático
FUNGOS		
<i>Candida albicans</i> (ATCC18804)	62,5	Fungistático
<i>Candida glabrata</i> (CCT0728)	250	Fungicida

3.5 Discussão

No presente trabalho, os extratos de *Lippia alnifolia* e *Vaitarea macrocarpa* apresentaram atividade fungicida para *Candida glabrata*, um patógeno humano oportunista que se associa a infecções nosocomiais graves, como a infecção da corrente sanguínea, com alta morbidade e mortalidade. *C. glabrata* pode causar desde a candidíase orofaríngea ao choque séptico. Possui fatores de virulência que favorecem a baixa resposta terapêutica e a infecção recorrente grave, além de apresentar resistência aos antifúngicos convencionais. Dentre os fatores de virulência, destaca-se sua capacidade de formação de biofilme, no qual o microrganismo séssil adquire resistência aos antimicrobianos. Quanto à resposta imune, *C. glabrata* é capaz de evadir a resposta inflamatória do hospedeiro e replicar-se intracelularmente (RODRIGUES *et al.*, 2014; 2017; TATI *et al.*, 2016; CAMPOS-GARCIA *et al.*, 2019; JIMÉNEZ-ROSALES *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2019). Portanto, é válido investir em novos fármacos que atuem efetivamente neste patógeno e tais extratos vegetais podem ser promissores.

Em adição, o extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* apresentou atividade bactericida para a espécie *Micrococcus luteus*, a qual é constituinte do microbioma oral humano (ZAWADZKI *et al.*, 2017), mas já foi reportada como responsável por casos de bacteremia em pacientes imunodeprimidos (GUERRA, ASENJO, MARTIN, 2018), endocardite (DÜRST *et al.*, 1991; USÓ *et al.*, 2003), pneumonia (SOUHAMI *et al.*, 1979), endoftalmite (MIÑO DE KASPAR, GRASBON, KAMPIK, 2010) e artrite séptica (BAUMBACH *et al.*, 2018). Além de ser um patógeno humano emergente, *Micrococcus luteus* tem recebido atenção quanto ao seu potencial biotecnológico, por possuir características únicas para se estudar a dormência, a qual é um estado protetor que permite às bactérias sobreviverem aos antibióticos e ao sistema imunológico. A dormência é composta por diferentes estados, incluindo estados persistentes e viáveis, mas não cultiváveis; que contribuem para a disseminação de infecções bacterianas (MALI *et al.*, 2017; LICHEV *et al.*, 2019).

Além disso, o extrato das folhas de *Lippia alnifolia* apresentou atividade bacteriostática para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, além de atividade fungistática para *Candida albicans*. Anteriormente, PINTO *et al.* (2013) também verificaram a atividade de *L. alnifolia* contra *S. aureus*, o que sustenta uma informação relevante, visto que *S. aureus* é um importante patógeno multirresistente (SANTOS, 2007). Tais propriedades podem ser exploradas do ponto de vista biotecnológico, inclusive por já haver o uso tradicional de *L. alnifolia* como agente antisséptico e no tratamento de doenças infecciosas.

Quanto à atividade bacteriostática de ambos extratos vegetais estudados, tal potencial biotecnológico pode ser explorado dada à relevância das espécies bacterianas testadas. *Bacillus subtilis* CU1 é uma cepa probiótica recentemente descrita que possui efeitos benéficos sobre a saúde imunológica em idosos (LEFEVRE *et al.*, 2017). *Escherichia coli* pode causar doença do sistema gastrointestinal, urinário ou nervoso central (NATARO, KAPPER, 1998). *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno humano oportunista, difícil de tratar e capaz de crescer em biofilmes. Sua letalidade é mais aparente em pacientes com fibrose cística, mas também é um grande problema em feridas por queimaduras, feridas crônicas e distúrbio pulmonar obstrutivo crônico (MULCAHY, 2014). *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia. Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS, 2007). A *Salmonella* sorotipo *Choleraesuis* (*S. Choleraesuis*) é um patógeno intracelular facultativo, Gram-negativo, capaz de induzir a cólera em porcos, cujos sintomas se manifestam como febre, depressão, septicemia, artrite e diarreia (LIU *et al.*, 2017)

Quanto à atividade fungistática dos extratos estudados, é válido ressaltar que *Candida albicans* está entre as espécies fúngicas prevalentes da microbiota humana e coloniza indivíduos saudáveis de forma assintomática. No entanto, é também um patógeno oportunista que pode causar infecções graves e, muitas vezes, fatais na corrente sanguínea. O impacto médico de *C. albicans* normalmente depende de sua capacidade de formar biofilmes, que são comunidades complexas que se aderem a superfícies, como tecidos vivos e dispositivos médicos implantados (LOHSE *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que as infecções associadas aos cuidados de saúde (nosocomiais) são um problema mundial (HAQUE *et al.*, 2018), principalmente devido à resistência a múltiplas drogas desenvolvida pelos patógenos bacterianos e fúngicos (CHANG *et al.*, 2015; PAUL, MOYE-ROWLEY, 2014). Portanto, sugere-se que mais estudos sejam realizados para que os extratos de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke possam ser utilizados de forma efetiva no controle dos microrganismos supracitados.

3.6 Conclusão

Os extratos das espécies vegetais brasileiras *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke são promissores para o controle bacteriano e fúngico, portanto outros estudos podem ser realizados para determinar a efetividade de tais extratos no controle microbiológico e seu potencial biotecnológico.

Referências

1. ADJUTO, ENP. Caracterização morfológica e de óleo essencial de seis acesos de Hortelanzinho (*Mentha* spp.). 2008. 79p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Agrárias) – Departamento de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
2. AGRA MF, SILVA KN, BASÍLIO IJLD, FREITAS PF, BARBOSA-FILHO JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, v.18, p. 472-508, 2008.
3. BAUMBACH SF, PRALL WC, SCHARPF AM, HERERICH V, SCHMIDT M, SUEDEKAMP NP, STOEHR A, MAYR HO. Significant increase of pathogen detection rate by dry arthroscopic biopsies at suspected low-grade infection following total knee arthroplasty: a prospective observational study. *Arch Orthop Trauma Surg.*, v.138, n.11, p. 1583-1590, 2018.
4. BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília: Poder Executivo [2006]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em 03 mai 2019.
5. BRASIL. Instrução Normativa nº 06, de 23 de setembro de 2008. Reconhece espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados. Brasília: Poder Executivo [2008]. Disponível em: http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_federal/INS_TRUCAO_NORMATIVA/INSTRUCAO_NORMATIVA_06_DE_23_DE_SETEMBRO_DE_2008.pdf. Acesso em 03 mai 2019.
6. CALIXTO JB. The role of natural products in modern drug discovery. *An Acad Bras Cienc.* v. 91, Supl 3, p.1-7, 2019.

7. CAMPOS-GARCIA L, JIMENEZ-VALDES RJ, HERNANDEZ-BELLO R, PALMA-NICOLAS J, GONZALEZ GM, SANCHEZ-GONZALEZ A. Candida albicans and non-albicans Isolates from Bloodstream Have Different Capacities to Induce Neutrophil Extracellular Traps. J Fungi (Basel), v.5, n.2, p.1-16, 2019.
8. CHANG HH, COHEN T, GRAD YH, HANAGE WP, O'BRIEN TF, LIPSITCH M. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. Microbiol Mol Biol Rev, v.79, n.1, p.101–116, 2015.
9. CNCFLORA. Lippia alnifolia in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia_alnifolia>. Acesso em 12 julho 2019.
10. CONCEIÇÃO AA, GIULIETTE AM. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Hoehnea, v.29. n.1, p. 37-48, 2002.
11. DÜRST UN, BRUDER E, EGLOFF L, WÜST J, SCHNEIDER J, HIRZEL HO. Micrococcus luteus: a rare pathogen of valve prosthesis endocarditis. Z Kardiol., v.80, n.4, p.294-298, 1991.
12. DUTRA RC, CAMPOS MM, SANTOS AR, CALIXTO JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. Pharmacol Res., v. 112, p. 112-114, 2016.
13. GOMES, TMF. Uso tradicional de plantas medicinais em comunidade rural no semiárido piauiense. 2017. 58f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.
14. GUERRA JMM, ASENJO MM, MARTÍN CR. Bacteriemia por Micrococcus luteus en un paciente inmunodeprimido. Med Clin, v.152, n.11, p.469-470, 2018.
15. HAQUE M, SARTELLI M, MCKIMM J, ABU BAKAR M. Health care-associated infections - an overview. Infect Drug Resist., v.11, p.2321–2333, 2018.
16. HIROTA R, ROGER NN, NAKAMURA H, SONG HS, MASAYOSHI SM, SUGANUMA N. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (Citrus junos Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. Journal of Food Science, v. 75, n. 3, 2010.
17. JESUS NZT. Levantamento etnobotânico e triagem antiúlcera e antiedematogênica de plantas medicinais do distrito de Pirizal-MT: avaliação da atividade antiúlcera do

- extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. 2007. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2007.
18. JIMÉNEZ-ROSALES R, AYUSO-CARRASCO CAB, OJEDA-HINOJOSA M. The first reported case of colonic infection caused by *Candida glabrata*. *Rev Esp Enferm Dig.*, v.111, n.8, p.648-649, 2019.
 19. KUMAR K, ASKARI F, SAHU MS, KAUR R. *Candida glabrata*: A Lot More Than Meets the Eye. *Microorganisms*, v.7, n.39, p.1-22, 2019.
 20. LEFEVRE M, RACEDO SM, DENAYROLLES M, RIPERT G, DESFOUGÈRES T, LOBACH AR, SIMON R, PÉLERIN F, JÜSTEN P, URDACI MC. Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regul Toxicol Pharmacol.*, v.83, p.54-65, 2017.
 21. LICHEV A, ANGELOV A, CUCURULL I, LIEBL W. Amino acids as nutritional factors and (p)ppGpp as an alarmone of the stringent response regulate natural transformation in *Micrococcus luteus*. *Sci Rep.* v.9, n.1, p.1-15, 2019.
 22. LIU Q, YI J, LIANG K, ZHANG X, LIU Q. *Salmonella Choleraesuis* outer membrane vesicles: Proteomics and immunogenicity. *J Basic Microbiol.*, v.57, n.10, p.852-861, 2017.
 23. LOHSE MB, GULATI M, JOHNSON AD, NOBILE CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol.*, v.16, n.1, p.19-31, 2018.
 24. LUCENA CM, LUCENA RF, COSTA GM, CARVALHO TK, COSTA GG, ALVES RR, PEREIRA DD, RIBEIRO JE, ALVES CA, QUIRINO ZG, NUNES EN. Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed.*, v. 9, n.62, p.1-11, 2013.
 25. MALI S, MITCHELL M, HAVIS S, BODUNRIN A, RANGEL J, OLSON G, WIDGER WR, BARK SJ. A Proteomic Signature of Dormancy in the Actinobacterium *Micrococcus luteus*. *J Bacteriol.*, v.199, n.14, p. 1-47, 2017.
 26. MATES FJA, MACHADO MIL, SILVA MG, CRAVEIRO AA, ALENCAR JW. Essential oils of *Lippia alnifolia* Schau.(Verbenaceae) and *Lippia aff. gracillis* HBK, two aromatic medicinal shrubs from northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 12, n. 3, p. 295-297, 2000.

27. MATOS FJA, AGUIAR LMBA, SILVA M. GORETTI V. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana de *Vatairea macrocarpa* Ducke. *Acta Amazônica*, v.18, n.01, p.351-352, 1988.
28. MIÑO DE KASPAR H, GRASBON T, KAMPIK A. Automated surgical equipment requires routine disinfection of vacuum control manifold to prevent postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology.*, v.107, n.4, p.685-690, 2000.
29. MOLDENKE HN. Notes on new and noteworthy plants. *Phytologia*, v.51, p.48-290, 1981.
30. MULCAHY LR, ISABELLA VM, LEWIS K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.*, v.68, n.1, p.1-12, 2014.
31. NATARO JP, KAPER, JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.1, p. 142-201, 1998.
32. OLIVEIRA HC, SANTOS MP, GRIGULO R, LIMA LL, MARTINS DT, LIMA JC, STOPPIGLIA LF, LOPES CF, KAWASHITA NH. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. *J Ethnopharmacol.*, v.115, n.03, p. 515-519, 2008.
33. OLIVEIRA TB, SOUZA JS, GOMES-FILHO IS, MOURA D, PEREIRA-FILHO JN, TRINDADE SC. Uso da *Lippia* no tratamento das doenças periodontais. *J Dent Pub H.*, v.9, n.3, p.227-237, 2018.
34. PAUL S, MOYE-ROWLEY WS. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front Physiol.*, v.5, p.1-14, 2014.
35. PINTO CP, RODRIGUES VD, PINTO FP, PINTO RP, UETANABARO AP, PINHEIRO CS, GADEA SF, SILVA TR, LUCCHESI AM. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evid Based Complement Alternat Med.* v. 2013; p.1-5, 2013.
36. RODRIGUES CF, RODRIGUES ME, SILVA S, HENRIQUES M. *Candida glabrata* Biofilms: How Far Have We Come? *J Fungi (Basel)*, v.3, n.1, p.1-30, 2017.
37. RODRIGUES CF, SILVA S, HENRIQUES M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v,33, n.5, p.673-88.2014.
38. ROZZA AL, MORAES TM, KUSHIMA H, TANIMOTO A, MARQUES MOM, BAUAB TM HIRUMA-LIMA C. A, PELLIZZON CH. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide,

- glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions*, n. 189, p. 82–89, 2011.
39. SALIMENA FRG, MULGURA, ME. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. *Rodriguésia*, v.66, n.1, p.191-197, 2015.
40. SANTOS AL, SANTOS DO, FREITAS CC, FERREIRA, BLA, AFONSO IF, RODRIGUES CR, CASTRO, HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, Dec. 2007 .
41. SANTOS JA, GRACIANI FS, KASSUAYA CAL, SALVADOR JM, CARDOSO CAL. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das cascas de *Vatairea macrocarpa* (Benth) Ducke em camundongos pelo modelo de pleurisia. *Rev Ciên Farm Básica Apl.*, v.37, n.1, p.1, 2016.
42. SOUHAMI L, FELD R, TUFFNELL PG, FELLER T. *Micrococcus luteus* pneumonia: a case report and review of the literature. *Med Pediatr Oncol.*, v.7, n.4, p. 309-314, 1979.
43. TATI S, DAVIDOW P, MCCALL A, HWANG-WONG E, ROJAS IG, CORMACK B, EDGERTON M. *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS Pathog* v.12, n.3, p. 1-21, 2016.
44. TRIPPO KV, ALMEIDA LA, JESUS MC, NASCIMENTO MS, MOREIRA NL, OLIVEIRA MC. Concepção de acadêmicos de saúde sobre a PNPIC e sua aplicabilidade no SUS. *Revista Pesquisa em Fisioterapia*, v.7, n.4, p.481-488, 2017.
45. USÓ J, GIL M, GOMILA B, TIRADO MD. Endocarditis due to *Micrococcus luteus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, v.21, n.2, p.116-117, 2003.
46. VALLI M, RUSSO HM, BOLZANI VS. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *An Acad Bras Cienc.*, v.16, n.9, supl1, p. 763-778, 2018.
47. VILELA, DAD. Avaliação da atividade espasmolítica e antiasmática do óleo essencial de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (VERBENACEAE). 2018. 88f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina.
48. ZAWADZKI PJ, PERKOWSKI K, PADZIK M, MIERZWINSKA-NASTALSKA E, SZAFLIK JP, CONN DB, CHOMICZ L. Examination of Oral Microbiota Diversity in Adults and Older Adults as an Approach to Prevent Spread of Risk Factors for Human Infections. *Biomed Res Int*. v. 2017, p. 1-8, 2

CONCLUSÃO GERAL

Os extratos de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer e *Vatairea macrocarpa* (Benth.)Ducke regulam a produção de citocinas produzidas em resposta à presença de antígenos de *Porphyromonas gingivalis* e são promissores para o controle bacteriano e fúngico. Portanto, recomenda-se a realização de outros estudos para determinar a efetividade de tais extratos no controle microbiológico e seu potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

1. ADJUTO, ENP. Caracterização morfológica e de óleo essencial de seis acesos de Hortelanzinho (*Mentha spp.*). 2008. 79p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Agrárias) – Departamento de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
2. AGRA MF, SILVA KN, BASÍLIO IJLD, FREITAS PF, BARBOSA-FILHO JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, v.18, p. 472-508, 2008.
3. ALMEIDA DC, PEREIRA CS, GRANJEIRO JM, MACHADO WAS, TOSTES FRV, BARBOZA ESP. A relação bidirecional entre doença periodontal e doença renal crônica: da progressão da doença renal crônica à terapia renal substitutiva dediálise. *R. Periodontia*, v.21, n.1, p. 73-79, 2011.
4. ANGST PDM, FINGER STADLER A, MENDEZ M, OPPERMANN RV, VAN DER VELDEN U, GOMES SC. Supportive periodontal therapy in moderate-to-severe periodontitis patients: a two years randomized clinical trial., *J Clin Periodontol.*, online version doi: 10.1111/jcpe.13178., p.1-24, 2019.
5. ARDIZZONI A, PERICOLINI E, PAULONE S, ORSI CF, CASTAGNOLI A, OLIVA I, STROZZI E, BLASI E. In vitro effects of commercial mouthwashes on several virulence traits of *Candida albicans*, viridans streptococci and *Enterococcus faecalis* colonizing the oral cavity. *PLoS One*, v.13, n.11, p.1-20, 2018.
6. ARWEILER NB, NETUSCHIL L. The Oral Microbiota. *Adv Exp Med Biol.*, v.902, p.45-60, 2016.
7. ARWEILER NB, AUSCHILL TM, SCULEAN A. Patient self-care of periodontal pocket infections. *Periodontol 2000*, v.76, n.1, p.164-179, 2018.
8. BAIJU RMP, PETER E, NAYAR BR, VARUGHESE JM, VARGHESE NO. Prevalence and predictors of early periodontal disease among adolescents. *J Indian Soc Periodontol.*, v.23, n.4, p.356-361, 2019.

9. BARBOSA KGN, CASTRO RD, CARVALHO FG, CABRAL YN. A Participação das respostas imunológicas nas doenças periodontais. *Odontol. Clín.-Cient.*, v.11, n.1, p.7-12, 2012.
10. BAUMBACH SF, PRALL WC, SCHARPF AM, HERERICH V, SCHMIDT M, SUEDEKAMP NP, STOEHR A, MAYR HO. Significant increase of pathogen detection rate by dry arthroscopic biopsies at suspected low-grade infection following total knee arthroplasty: a prospective observational study. *Arch Orthop Trauma Surg.*, v.138, n.11, p. 1583-1590, 2018.
11. BEILER TFCS, FISCHER RG, FIGUEIREDO CM. Interferon- γ e sua relação com a doença periodontal. *Braz J Periodontol*, v.23, n.1, p.25-32, 2013.
12. BEKLEN A. Effects of IL-13 on TGF and MMP-1 in periodontitis. *Biotechnic & Histochemistry* early online, p 1–7, 2017.
13. BRASIL 2006. Presidência da República. Decreto no. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006.
14. BRASIL 2008. Instrução Normativa nº 06, de 23 de setembro de 2008. Reconhece espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados. Brasília: Poder Executivo [2008]. Disponível em: http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_federal/INSTRUCAO_NORMATIVA/INSTRUCAO_NORMATIVA_06_DE_23_DE_SETEMBRO_DE_2008.pdf. Acesso em 03 mai 2019.
15. BRASIL 2012. Projeto SB 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde [2012]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf. Acesso em 05 mar 2019.
16. CALIXTO JB. The role of natural products in modern drug discovery. *An Acad Bras Cienc.* v. 91, Supl 3, p.1-7, 2019.
17. CAMPOS-GARCIA L, JIMENEZ-VALDES RJ, HERNANDEZ-BELLO R, PALMA-NICOLAS J, GONZALEZ GM, SANCHEZ-GONZALEZ A. Candida albicans and non-albicans Isolates from Bloodstream Have Different Capacities to Induce Neutrophil Extracellular Traps. *J Fungi (Basel)*, v.5, n.2, p.1-16, 2019.

18. CARLOS JC, SETE MRC, SZTAJNBOK FR, FIGUEREDO CMS. Infecção periodontal por *Porphyromonas gingivalis*: de uma inflamação oral a um possível “gatilho” para a autoimunidade via citrulinização de proteínas. *Braz J Periodontol.*, v.28, n.04, p.48-56, 2018.
19. CARVALHO-FILHO PC, GOMES-FILHO IS, MEYER R, OLCZAK T, XAVIER MT, TRINDADE SC. Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in immunopathogenesis of Chronic Periodontitis, *Mediators Inflamm.*,v.2016, p.1-10, 2016.
20. CARVALHO-FILHO PC, MOURA-COSTA LF, PIMENTEL ACM, LOPES MPP, FREITAS SA, MIRANDA PM, COSTA RS, FIGUEIRÊDO CAV, MEYER R, GOMES-FILHO IS, OLCZAK T, XAVIER MT, TRINDADE SC. Apoptosis Transcriptional Profile Induced by *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *Mediators Inflamm.* v.2019,p. 1-9, 2019.
21. CARVALHO-FILHO PC, TRINDADE SC, OLCZAK T, SAMPAIO GP, OLIVEIRA-NETO MG, SANTOS HA, PEREIRA BF, MOURA-COSTA L, XAVIER MT, MEYER R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+ T cells. *BMC Microbiol.*, v.11, n.13, p.1-6, 2013
22. CHANG HH, COHEN T, GRAD YH, HANAGE WP, O'BRIEN TF, LIPSITCH M. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*,v.79, n.1, p.101–116, 2015.
23. CHEVALIER S, BOUFFARTIGUES E, BODILIS J, MAILLOT O, LESOUHAITIER O, FEUILLOLEY MGJ, ORANGE N, DUFOUR A, CORNELIS P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.*, v.41, n.5, p-698-722, 2017.
24. CNCFlora. *Lippia alnifolia* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia alnifolia](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia%20alnifolia)>. Acesso em 12 julho 2019.
25. CONCEIÇÃO AA, GIULIETTE AM. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Hoehnea*, v.29. n.1, p. 37-48, 2002.
26. CONLON BP. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. *Bioessays*, v.36, n.10, p.991-996, 2014.

27. CORDEIRO CHG, SACRAMENTO LVS, CORRÊA MA, PIZZOLITTO AC, BAUAB TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v,42, n.3, p.395-404, 2006.
28. CORRÊA, JD, CALDERARO DC, FERREIRA GA, MENDONÇA SM, FERNANDES GR, XIAO E, TEIXEIRA AL, LEYS EJ, GRAVES DT, SILVA TA. Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: association with periodontal status. *Microbiome*, v.5, n.1, p.34, 2017.
29. CORTEZ, FS. Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados humanos. 2011, 218p. Dissertação de Mestrado em Ciências na Área de tecnologia Nuclear. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
30. COSTA FO, LIMA DCR, SILVA ALG. Biologia reprodutiva de *Vatairea Macrocarpa* (Benth.) Ducke (Fabaceae – Faboideae) em uma área de cerrado no município de Chapadinha, MA, Brasil. *Heringeriana*, v.8, n.1, p.1-19, 2014.
31. CRUZ SS, COSTA MC, GOMES-FILHO IS, REZENDE EJ, BARRETO ML, DOS SANTOS CA, VIANNA MI, PASSOS JS, CERQUEIRA EM. Contribution of periodontal disease in pregnant women as a risk factor for low birth weight. *Community Dent Oral Epidemiol.*, v.37, n.6, p. 527-533, 2009.
32. DAHLEN G, PREUS HR. Low antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy. *Anaerobe*, v.43, p.94-98, 2017.
33. DIAS JN, SILVA MPCF, LIMA IPC. O uso de fitoterápicos à base de aroeira como coadjuvante no tratamento da gengivite: Revisão Sistemática. *Rev. Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, p. 1187-1191, 2015.
34. DÜRST UN, BRUDER E, EGLOFF L, WÜST J, SCHNEIDER J, HIRZEL HO. *Micrococcus luteus*: a rare pathogen of valve prosthesis endocarditis. *Z Kardiol.*, v.80, n.4, p.294-298, 1991.
35. DUTRA RC, CAMPOS MM, SANTOS AR, CALIXTO JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.*, v. 112, p. 112-114, 2016.
36. EARL AM, LOSICK R, KOLTER R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.*, v.16, n.6, p.269-75, 2008.

37. FINOTI LS, NEPOMUCENO R, PIGOSSI SC, CORBI CTC, SECOLIN R, SCAREL-CAMINAGA RM. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease – a Prisma compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine*, v.96, p.1-8, 2016.
38. FOEY AD, PARRY SL, WILLIAMS LM, FELDMANN M, FOXWELL BM, BRENNAN FM. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol.*, v.160, n.2, p.920-928, 1998.
39. FRENCKEN JE, SHARMA P, STENHOUSE L, GREEN D, LAVERTY D, DIETRICH T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol*, v.44, supl.44, p.94-105, 2017.
40. GALVIS MM, ZULUAGA YPM, SALDARRIAGA AS. Diabetes y enfermedad periodontal: hacia un modelo clínico bidireccional. *Rev. Nac. de Odontología*, v.14, n.8, p.76-87, 2012.
41. GAUDILLIERE DK, CULOS A, DJEBALI K, TSAI AS, GANIO EA, CHOI WM, HAN X, MAGHAIREH A, CHOISY B, BACA Q, EINHAUS JF, HEDOU JJ, BERTRAND B, ANDO K, FALLAHZADEH R, GHAEMI MS, OKADA R, STANLEY N, TANADA A, TINGLE M, ALPAGOT T, HELMS JA, ANGST MS, AGHAEPOUR N, GAUDILLIERE B. Systemic Immunologic Consequences of Chronic Periodontitis. *J Dent Res.*, v.21, p.01-11, 2019.
42. GOMES, TMF. Uso tradicional de plantas medicinais em comunidade rural no semiárido piauiense. 2017. 58f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.
43. GOMES-FILHO IS, CRUZ SS, REZENDE EJ, DOS SANTOS CA, SOLEDADE KR, MAGALHÃES MA, AZEVEDO AC, TRINDADE SC, VIANNA MI, PASSOS JS, CERQUEIRA EM. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol.*, v.34, n.11, p. 957-963, 2007.
44. GOMES-FILHO IS, FARIAS NSA, SANTOS CAST, PASSOS-SOARES JS, BARRETO ML, CRUZ SS, BARBOSA PJB, MARQUES-NETO J, COELHO JMF, CERQUEIRA EMM, HINTZ AM, COELHO AF, FIGUEIREDO ACG, SANTOS PNP, BUISCHI YP, TRINDADE SC. Periodontal Disease as a Risk Factor for Acute

- Myocardial Infarction. Periodontal Disease as a Risk Factor for Acute Myocardial Infarction. *EC Dental Science*, v. 10.2, p. 62-71, 2017.
45. GOMES-FILHO IS, MERCÊS MC, PASSOS-SOARES JS, CRUZ SS, TEIXEIRA AML, TRINDADE SC, CERQUEIRA EMM, COELHO JMF, MONTEIRO FMM, BARRETO ML, VIANNA MIP, COSTA MCN, SEYMOUR GJ, SCANNAPIECO FA. Severity of Periodontitis and Metabolic Syndrome: Is There an Association? *J Periodontol.*, v.87, n.4, p. 357-366, 2016.
 46. GOMES-FILHO IS, OLIVEIRA TFL, CRUZ SS, PASSOS-SOARES JS, TRINDADE SC, OLIVEIRA MT, SOUZA-MACHADO A, CRUZ AA, BARRETO ML, SEYMOUR GJ. *J Periodontol*, v.85, n.5, p.82-90, 2014.
 47. GONÇALVES EA; PINTO PF. Avaliação da eficácia antimicrobiana dos enxaguatórios bucais contendo como princípios ativos o triclosan, cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais. *HU Revista Juiz de Fora*, v.39, n.03, p.45-50, 2013
 48. GONÇALVES FM, FREITAS AE, PERES TV, RIEGER DK, BEN J, MAESTRI M, COSTA AP, TRAMONTINA AC, GONÇALVES CA, RODRIGUES ALS, NAGANO CS, TEIXEIRA EH, NASCIMENTO KS, CAVADA BS, LEAL RB. Vatairea macrocarpa Lectin (VML) Induces Depressive-like Behavior and Expression of Neuroinflammatory Markers in Mice. *Neurochem Res*, v.38, p.2375-2384, 2013.
 49. GRAZIANI F, KARAPETSA D, ALONSO B, HERRERA D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000*, v.75, n.1, p.152-188, 2017.
 50. GUERRA JMM, ASENJO MM, MARTÍN CR. Bacteriemia por *Micrococcus luteus* en un paciente inmunodeprimido. *Med Clin*, v.152, n.11, p.469-470, 2018.
 51. GULATI M, NOBILE CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.*, v.18, n.5, p.310-321,2016.
 52. HAJISHENGALLIS G, LIANG S, PAYNE MA, HASHIM A, JOTWANI R, ESKAN MA, MCINTOSH ML, ALSAM A, KIRKWOOD KL, LAMBRIS JD, DARVEAU RP, CURTIS MA. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. *Cell Host & Microbe*, v.10, n.05, p.497-506, 2011.
 53. HAJISHENGALLIS G; LAMONT, RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol.*, v.44, n.2, p.328-338, 2014.

54. HAQUE M, SARTELLI M, MCKIMM J, ABU BAKAR M. Health care-associated infections - an overview. *Infect Drug Resist.*, v.11, p.2321–2333, 2018.
55. HERRERO C, HU X, LI WP, SAMUELS S, SHARIF MN, KOTENKO S, IVASHKIV LB. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN- γ . *J Immunol.*, v.171, n.10, p.5034-5041, 2003.
56. HIROTA R, ROGER NN, NAKAMURA H, SONG HS, MASAYOSHI SM, SUGANUMA N. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 3, 2010.
57. HO HL, HAYNES K. *Candida glabrata*: new tools and technologies-expanding the toolkit. *FEMS Yeast Res*, v.15, n.6, p.1-14, 2015.
58. HU HL, HAYNE K, *Candida glabrata*: new tools and technologies-expanding the toolkit. *FEMS Yeast Res.*, v.15, n.6, p.1-14 2015.
59. HUANG KY, WANG YH, CHIEN KY, JANAPATLA RP, CHIU CH. Hyperinvasiveness of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis linked to hyperexpression of type III secretion systems in vitro. *Sci Rep*, v. 6, n.1, p.1-11, 2016.
60. JESUS NZT. Levantamento etnobotânico e triagem antiúlcera e antiedematogênica de plantas medicinais do distrito de Pirizal-MT: avaliação da atividade antiúlcera do extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. 2007. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2007.
61. JIMÉNEZ-ROSALES R, AYUSO-CARRASCO CAB, OJEDA-HINOJOSA M. The first reported case of colonic infection caused by *Candida glabrata*. *Rev Esp Enferm Dig.*, v.111, n.8, p.648-649, 2019.
62. JUIZ PJL; ALVES RJC; BARROS TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Rev. bras. farmacogn*, v.20, n.01, p.134-139, 2010.
63. JUIZ, PJL, SILVA, F, CAMPOS MJA, UETANABARO APT, CAMPOS RJ, ALVES, AML Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* sobre periodontopatógenos. *Braz J Periodontol.*, v.26, n.04, p. 07-14, 2016.
64. JUIZ, PJL; ALVES, RJC; BARROS, TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Rev. bras. farmacogn.*, v.20, n.1, p.134-139, 2010.
65. KASPER L, SEIDER K, HUBE B. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Res.*, v.15, n.5, p.1-49, 2015.

66. KASPER L, SEIDER K, HUBE B. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Res.*, v.15, n.5, p.1-49, 2015.
67. KOSAKA S, TAMAUCHI H, TERASHIMA M, MARUYAMA H, HABU S, KITASATO H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology*, v.216, n.7, p.811-20, 2011.
68. KUMAR K, ASKARI F, SAHU MS, KAUR R. *Candida glabrata*: A Lot More Than Meets the Eye. *Microorganisms*, v.7, n.39, p.1-22, 2019.
69. KWAN TS, PADRINES M, THÉOLEYRE S, HEYMAN D, FORTUN Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.15, n.1, p.49-60, 2004.
70. LEFEVRE M, RACEDO SM, DENAYROLLES M, RIPERT G, DESFOUGÈRES T, LOBACH AR, SIMON R, PÉLERIN F, JÜSTEN P, URDACI MC. Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regul Toxicol Pharmacol.*, v.83, p.54-65, 2017.
71. LI L, MICHEL R, COHEN J, DECARLO A, KOZAROV E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.*, v.06, n.08, p.01-11, 2008.
72. LICHEV A, ANGELOV A, CUCURULL I, LIEBL W. Amino acids as nutritional factors and (p)ppGpp as an alarmone of the stringent response regulate natural transformation in *Micrococcus luteus*. *Sci Rep.* v.9, n.1, p.1-15, 2019.
73. LIEN TQ, LAN PT, CHUC NTK, HOA NQ, NHUNG PH, THOA NTM, DIWAN V, TAMHANKAR AJ, STÅLSBY LC.. Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Hospital Wastewater in Vietnam. *Int J Environ Res Public Health.*, v.15, n.7, p.1-11, 2017.
74. LIMA V, BEZERRA MM, LEITÃO RFDC, BRITO GADC, ROCHA, FACD, RIBEIRO RDA. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da Periodontite–Papel de Moduladores Farmacológicos. *R Periodontia*, v.18, n.3, p.7-19, 2008.
75. LIRA-JÚNIOR R, RIBEIRO MSM, MACEDO JMB, FISCHER RG. Papel da interleucina-10 na patogênese da doença periodontal: revisão da literatura. *Braz J Periodontol.*, v.23, n.2, p.39-44 2013.

76. LIU Q, YI J, LIANG K, ZHANG X, LIU Q. Salmonella Choleraesuis outer membrane vesicles: Proteomics and immunogenicity. *J Basic Microbiol.*, v.57, n.10, p.852-861, 2017.
77. LIU Z, HU Y, YU P, LIN M, HUANG G, KAWAI T, TAUBMAN M, WANG Z, XIAOZHE H. Toll-like receptor agonists *Porphyromonas gingivalis* LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells. *J Appl Oral Sci*, v.25, n.1, p.90-100, 2017.
78. LOHSE MB, GULATI M, JOHNSON AD, NOBILE CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol.*, v.16, n.1, p.19-31, 2018.
79. LUCENA CM, LUCENA RF, COSTA GM, CARVALHO TK, COSTA GG, ALVES RR, PEREIRA DD, RIBEIRO JE, ALVES CA, QUIRINO ZG, NUNES EN. Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed.*, v. 9, n.62, p.1-11, 2013.
80. LUCENA CM, LUCENA RFP, CARVALHO TKN, COSTA GGS, ALVES RRN, PEREIRA DD, RIBEIRO JES, ALVES CAB, QUIRINO ZGM, NUNES EN. Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. *J. Ethnobiol. And Ethnomedicine*, v.9, n.62, p.1-11, 2013.
81. LUNDMARK A, HU YOO, HUSS M, JOHANNSEN G, ANDERSSON AF, YUCEL-LINDBERG T. Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* v.21, p. 1-32, 2019.
82. MALI S, MITCHELL M, HAVIS S, BODUNRIN A, RANGEL J, OLSON G, WIDGER WR, BARK SJ. A Proteomic Signature of Dormancy in the Actinobacterium *Micrococcus luteus*. *J Bacteriol.*, v.199, n.14, p. 1-47, 2017.
83. MAO CY, WANG YG, ZHANG X, ZHENG XY, TANG TT, LU EY. Double-edged-sword effect of IL-1 β on the osteogenesis of periodontal ligament stem cells via crosstalk between the NF- κ B, MAPK and BMP/Smad signaling pathways. *Cell Death & Disease*, v.7, p.1-12, 2016.
84. MARSH PD, ZAURA E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.*, v.44, supl 18, p.12-22, 2017.
85. MATES FJA, MACHADO MIL, SILVA MG, CRAVEIRO AA, ALENCAR JW. Essential oils of *Lippia alnifolia* Schau.(Verbenaceae) and *Lippia aff. gracilllis* HBK,

- two aromatic medicinal shrubs from northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 12, n. 3, p. 295-297, 2000.
86. MATOS FJA, AGUIAR LMBA, SILVA M, GORETTI V. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana de *Vatairea macrocarpa* Ducke. *Acta Amazônica*, v.18, n.01, p.351-352, 1988.
87. MENEGAT J, BRITO F, BARROS F, PEDREIRA R, FISCHER RG, FIGUEIREDO CMS. Níveis elevados de IL-6 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica e retrocolite ulcerativa idiopática. *Periodontia*, v.20, n.02, p. 61-68, 2010.
88. MEYLE J, CHAPPLE I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, v.69, n.1, p.7-17, 2015.
89. MIÑO DE KASPAR H, GRASBON T, KAMPIK A. Automated surgical equipment requires routine disinfection of vacuum control manifold to prevent postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology.*, v.107, n.4, p.685-690, 2000.
90. MOLDENKE HN. Notes on new and noteworthy plants. *Phytologia*, v.51, p.48-290, 1981.
91. MULCAHY LR, ISABELLA VM, LEWIS K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.*, v.68, n.1, p.1-12, 2014.
92. NATARO JP, KAPER, JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.1, p. 142-201, 1998.
93. NORMATON M, MARTI LC. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. *Einstein*, v.11, n.2, p.237-246, 2013.
94. NUNES CM, FERREIRA CL, BERNARDO DV, MARCO AC, SANTAMARIA MP, JARDINI MAN. Chronic kidney disease and periodontal disease. Case report. *Braz Dent Sci*, v.21, n.1, p.133-143, 2018.
95. OLIVEIRA AGRC, UNFER B, COSTA ICC, ARCIERI RM, GUIMARÃES LOC, SALIBA NA. Levantamentos epidemiológicos em saúde bucal: análise da metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde. *Rev. bras. epidemiol.*, v.1, n.2, p.177-189, 1998.
96. OLIVEIRA CMB, SAKATA RK, ISSY AM, GEROLA R, SALOMÃO R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anesthesiol*, v.61, n.2, p.255-265, 2011.
97. OLIVEIRA HC, SANTOS MP, GRIGULO R, LIMA LL, MARTINS DT, LIMA JC, STOPPIGLIA LF, LOPES CF, KAWASHITA NH. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. *J Ethnopharmacol.*, v.115, n.03, p. 515-519, 2008.

98. OLIVEIRA TB, SOUZA JS, GOMES-FILHO IS, MOURA D, PEREIRA-FILHO JN, TRINDADE SC. O uso da Lippia no tratamento das doenças periodontais. *J Dent Pub H.*, v. 09, n. 03, p.227-237, 2018.
99. OLIVEIRA TFL, GOMES-FILHO IS, PASSOS JS, CRUZ SS, OLIVEIRA MT, TRINDADE SC, MACHADO AS, COELHO JMF, SANTOS CML, CERQUEIRA EMM. Fatores associados à pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. *Rev Assoc Med Bras*, v.57, n.6, p.630-636, 2011.
100. PASSOS JS, GOMES-FILHO IS, VIANNA MIP, CRUZ SS, BARRETO ML, OLIVEIRA TJS, BORGES LD, MONTEIRO FM. Outcome Measurements in Studies on the Association Between Osteoporosis and Periodontal Disease. *J*
101. PASSOS-SOARES JS, GOMES-FILHO IS, SANTOS LPS, SANTOS PNP, SILVA, ICO, BALINHA ISCE, TRINDADE SC. Impacto da perda dentária na qualidade de vida relacionada a saúde bucal de adultos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v.17, n.2, p.158-165, 2018.
102. PAUL S, MOYE-ROWLEY WS. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front Physiol.*, v.5, p.1-14, 2014.
103. PERGORARO J, SILVESTRI L, CARA G, STEFENON L, MOZZINI CB. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. *J Oral Invest*, v.3, n.1, p. 33-37, 2014.
104. *Periodontol*, v.81, n.12, p.1773-1780, 2010.
105. PINTO CP, RODRIGUES VD, PINTO FP, PINTO RP, UETANABARO AP, PINHEIRO CS, GADEA SF, SILVA TR, LUCCHESI AM. Antimicrobial activity of Lippia species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evid Based Complement Alternat Med*. v. 2013; p.1-5, 2013.
106. RODRIGUES CF, RODRIGUES ME, SILVA S, HENRIQUES M. Candida glabrata Biofilms: How Far Have We Come? *J Fungi (Basel)*, v.3, n.1, p.1-30, 2017.
107. RODRIGUES CF, SILVA S, HENRIQUES M. Candida glabrata: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v,33, n.5, p.673-88.2014.
108. ROZZA AL, MORAES TM, KUSHIMA H, TANIMOTO A, MARQUES MOM, BAUAB TM HIRUMA-LIMA C. A, PELLIZZON CH. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal

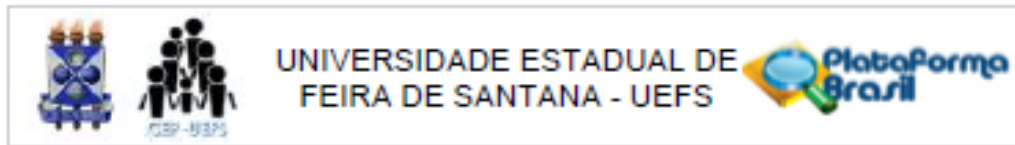
- peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions*, n. 189, p. 82–89, 2011.
109. RUÍZ-GUTIÉRREZ AC, HERRERA-MORA MC, ZAMORA-PÉREZ AL, MELÉNDEZ-RUÍZ, JL, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ VC, GUERRERO-VELÁZQUEZ C. Determinación de los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva. *Rev Mex Periodontol*, v.5, n.2, p.46-50, 2014.
110. SALIMENA FRG, MULGURA, ME. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. *Rodriguésia*, v.66, n.1, p.191-197, 2015.
111. SANTOS AL, SANTOS DO, FREITAS CC, FERREIRA, BLA, AFONSO IF, RODRIGUES CR, CASTRO, HC. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, Dec. 2007 .
112. SANTOS JA, GRACIANI FS, KASSUAYA CAL, SALVADOR JM, CARDOSO CAL. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das cascas de *Vatairea macrocarpa* (Benth) Ducke em camundongos pelo modelo de pleurisia. *Rev Ciên Farm Básica Apl.*, v.37, n.1, p.1, 2016.
113. SANTOS-LIMA EKN, CARDOSO KAPA, DE MIRANDA PM, PIMENTEL ACM, DE CARVALHO-FILHO PC, DE OLIVEIRA YA, DE MOURA-COSTA LF, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, MEYER RJ, XAVIER MT, TRINDADE SC. In silico analysis as a strategy to identify candidate epitopes with human IgG reactivity to study *Porphyromonas gingivalis* virulence factors. *AMB Express*, v.9, n.1, p.1-11, 2019a.
114. SANTOS-LIMA EKN, OLIVEIRA YA, SANTOS RPB, SAMPAIO GP, PIMENTEL ACM, CARVALHO-FILHO PC, MOURA-COSTA LF, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, MEYER RJ, XAVIER MT, TRINDADE SC. Production of interferon-gamma, interleukin-6, and interleukin-1 β by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with novel lys-gingipain synthetic peptides. *J Periodontol.*, online version doi: 10.1002/JPER.18-0626, 2019b.
115. SEKIGUCHI RT, FUKUDA CT, DAMANTE CA, MICHELI G, LOTUFO RFM. Alerta à resistência antibiótica em periodontia. *Rev. de Odontologia da UNESP*, v.36, n.4, p.299-304, 2007.

116. SINGH A, MEHDI AA, SRIVASTAVA RN, VERMA NS. Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci.*, v.2, n.2, p.75-81, 2012.
117. SOLEDADE-MARQUES KR, GOMES-FILHO IS, DA CRUZ SS, PASSOS-SOARES JS, TRINDADE SC, CERQUEIRA EMM, COELHO JMF, BARRETO ML, COSTA MDCN, VIANNA MIP, SCANNAPIECO FA, CRUZ AA, SOUZA-MACHADO A. Association between periodontitis and severe asthma in adults: A case-control study. *Oral Dis.*, v.24, n.3, p. 442-448, 2018.
118. SOUHAMI L, FELD R, TUFFNELL PG, FELLER T. *Micrococcus luteus* pneumonia: a case report and review of the literature. *Med Pediatr Oncol.*, v.7, n.4, p. 309-314, 1979.
119. SOUZA LM, CRUZ SS, GOMES-FILHO IS, BARRETO ML, PASSOS-SOARES JS, TRINDADE SC, FIGUEIREDO ACM, ALVES CMC, COELHO JMF, VIANNA MIP Effect of maternal periodontitis and low birth weight—A case control study. *Acta Odontologica Scandinavica*, early online, p. 1-8, 2015.
120. TÂLVAN ET, MOHOR C, CHISNOIU D, CRISTEA V CÂMPIAN RS. Expression of Interleukin (IL)-1 β , IL-8, IL-10 and IL-13 in Chronic Adult Periodontitis Progression. *Archives of medicine*, v.9, n.3/4, p.1-8, 2017.
121. TATI S, DAVIDOW P, MCCALL A, HWANG-WONG E, ROJAS IG, CORMACK B, EDGERTON M. *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS Pathog* v.12, n.3, p. 1-21, 2016.
122. TIBURTIUS ERL, SCHEFFER EWO. Triclosan: Destino no Meio Ambiente e Perspectivas no Tratamento de Águas de Abastecimento Público. *Rev. Virtual Quim.*, v.6, n.15, p. 1144-1159, 2014.
123. TRINDADE SC, BARRETO JAR, BARRETO-NETO LA, PASSOS-SOARES JS, VIANNA MIP, AZEVEDO ACO, GENOVESE WJ, BARRETO ML, CRUZ SS, GOMES-FILHO IS. Condição bucal de gestantes e puérperas no município de Feira de Santana, em três diferentes períodos entre os anos de 2005 e 2015. *Epidemiol. Serv. Saude*, v.27, n.3, p.1-12, 2018.
124. TRINDADE SC, GOMES-FILHO IS, MEYER RJ, VALE VC, PUGLIESE L, FREIRE SM. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol.*, v.10, n.2, p.50-58, 2008.

125. TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, DE MOURA-COSTA LF, VALE VC, GALDINO-NETO M, ALVES DOS SANTOS H, DE CARVALHO FILHO PC, STOCKER A, BENDICHO MT, XAVIER MT, DE MORAES MARCÍLIO CERQUEIRA E, MEYER R. Porphyromonas gingivalis HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. J Periodontol., v.84, n.5, p.650-655, 2012.
126. TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, MOURA-COSTA LF, CERQUEIRA EM, GALDINO-NETO M, ALVES H, CARVALHO-FILHO PC, XAVIERMT, MEYER R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by Porphyromonas gingivalis HmuY in humans. J Periodontal Res., v.47, n.01, p.27-32, 2011.
127. TRINDADE SC, SOUZA NCA, CRUZ SS, PASSOS-SOARES JS, PEREIRA EC, CAMPOS GS, BARRETO JAR, CERQUEIRA DO, ALVES CMC, LOPES FF, HINTZ AM, GOMES-FILHO IS. Condição bucal de puérperas atendidas em um hospital público no município de Feira de Santana, Bahia, Brasil. Revista de Saúde Coletiva da UEFS, v.7, n.1, p.44-50, 2017.
128. TRINDADE, SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, COSTA LFM, VALE VC, GALDINO-NETO M, SANTOS HA, CARVALHO-FILHO PC, STÖCKER A, BENDICHO MTNJJ, XAVIER MT, CERQUEIRA EMM, NASCIMENTO, RJM. Porphyromonas gingivalis HmuY-Induced Production of Interleukin-6 and IL-6 Polymorphism in Chronic Periodontitis. Journal of periodontology, v. 84, n. 5, p. 650-655, 2013.
129. TRIPPO KV, ALMEIDA LA, JESUS MC, NASCIMENTO MS, MOREIRA NL, OLIVEIRA MC. Concepção de acadêmicos de saúde sobre a PNPIC e sua aplicabilidade no SUS. Revista Pesquisa em Fisioterapia, v.7, n.4, p.481-488, 2017.
130. USÓ J, GIL M, GOMILA B, TIRADO MD. Endocarditis due to Micrococcus luteus. Enferm Infecc Microbiol Clin., v.21, n.2, p.116-117, 2003.
131. VALADARES SNS. Composição química, toxicidade e atividade biológica de Vatairea macrocarpa (Benth.) Ducke (Leguminosae) Feira de Santana: UEFS, 2017.
132. VALLI M, RUSSO HM, BOLZANI VS. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. An Acad Bras Cienc., v.16, n.9, supl1, p. 763-778, 2018.

133. VARELLA, PPV, FORTE, WCN. Citocinas: Revisão. Revista brasileira de alergia e imunopatologia. Vol 24(4):146-154, 2001. Disponível em: <http://www.asbai.org.br/revistas/Vol244/citocinas.htm>. Acesso em 01.08.19.
134. VETTORE MV, MARQUES RAA, PERES MA. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrasil 2010: abordagem multinível. Rev Saúde Pública, v.47, supl. 3, p. 29-39, 2013.
135. VIEIRA SPL, LIMA ML, TAVARES SJS, GUIMARÃES MV. Inter-relação entre periodontite crônica e parto prematuro / baixo peso ao nascer – revisão de literatura. Revista Bahiana de Odontologia, v,9, n.1, p. 1-11, 2018.
136. VILELA, DAD. Avaliação da atividade espasmolítica e antiasmática do óleo essencial de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (VERBENACEAE). 2018. 88f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina.
137. WANG PL, SHIRASU S, SHINOHAR M, AZUMA Y, DAITO M, YASUDA H, OHURA K. IL-10 inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. Biochem Biophys Res Commun., v.263, n.2, p. 372-377, 1999.
138. ZAWADZKI PJ, PERKOWSKI K, PADZIK M, MIERZWINSKA-NASTALSKA E, SZAFLIK JP, CONN DB, CHOMICZ L. Examination of Oral Microbiota Diversity in Adults and Older Adults as an Approach to Prevent Spread of Risk Factors for Human Infections. Biomed Res Int. v. 2017, p. 1-8, 2017.
139. ZENOBIA C, HAJISHENGALLIS G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. Periodontol 2000, v.69, n.1, p.142-159, 2015.

ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito imunomodulador de extratos e óleos essenciais de plantas nativas da região do semi-árido baiano na periodontite crônica

Pesquisador: Soraya Castro Trindade

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46267915.8.0000.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.344.223

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito imunomodulador de extratos e óleos essenciais de plantas nativas da região do semi-árido baiano na periodontite crônica", do Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), tendo por pesquisadores SORAYA CASTRO TRINDADE (Coordenadora e Pesquisadora Responsável); Laerte Oliveira Barreto Neto, Antônio Varela Cancio e Jurandi Nery Pereira Filho (Pesquisadores Colaboradores).

Consta no Resumo do Projeto que "A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, cujo fator etiológico primário constitui-se na presença de biofilme na superfície dentária, tendo a resposta do hospedeiro um papel preponderante no seu início e desenvolvimento. Seu tratamento é baseado na remoção mecânica do biofilme. O uso de adjuvantes químicos para o controle da periodontite também tem sido preconizado em diversas formas de administração, porém a utilização de fitoterápicos para este propósito é bastante restrita. Por outro lado, diversas plantas do semi-árido baiano têm sido utilizadas na medicina popular, com variados efeitos biológicos. Diante deste panorama, o presente projeto tem como objetivo avaliar o efeito imunomodulador do extrato e dos óleos essenciais das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia organoides*, *Lippia*

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-480
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



Continuação do Parecer: 1.344.223

thymoides, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia Insignis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis leucocephala* e *Hyptis macrostachys* e das raízes das cactáceas *Cereus jamacaru*, *Tacina palmadora*, *Harrisia adscendens* e *Opuntia ficus* sobre células mononucleares do sangue periférico de voluntários com e sem periodontite. A Toxicidade dos compostos para estas células será testada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Em seguida, as células serão cultivadas por 48h em presença dos compostos e os níveis das citocinas IL-6, IL-17, IL-13, TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-10 e IL-1b serão dosados por meio de ensaio imunoenzimático. Serão realizados também ensaios para a avaliação da proliferação celular, bem como ensaios para detecção de apoptose e necrose, ambos por citometria de fluxo. Após a análise da distribuição dos dados com o teste de Kolmogorov-Smirnov, os níveis das citocinas entre os indivíduos saudáveis e doentes serão comparados utilizando-se os testes T de Student ou Mann-Whitney." (Projeto Detalhado e Informações Básicas do Projeto/Plataforma Brasil)

HIPÓTESE: "Será que a utilização de compostos de plantas encontradas na região do semi-árido balano pode ser uma alternativa mais viável ao tratamento adjuvante da doença periodontal, sem os riscos de resistência bacteriana ou de poluição do meio ambiente?"

METODOLOGIA: Trata-se de um Estudo caso-controle. Os pesquisadores apresentam de forma detalhada as etapas da pesquisa: Coleta do Material Vegetal; Obtenção dos óleos essenciais e análise da composição química; Obtenção, processamento dos extratos brutos e análise química; Seleção da Amostra; Coleta de Sangue e Separação de CMSP; Cultivo Celular; Avaliação da citotoxicidade; Citometria de Fluxo para Avaliação de Proliferação Celular e Apoptose/Necrose; Ensaio Imunoenzimático ELISA para Detecção de Citocinas; e Análise Estatística. Em relação à Seleção da Amostra, "Serão convidados a compor amostra os indivíduos com boa saúde sistêmica que buscarem atendimento odontológico nos ambulatórios do curso de Odontologia da UEFS. Os critérios de não inclusão avaliados pela anamnese e considerados para este estudo serão: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e anti-inflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta. Comporão o grupo caso 30 indivíduos diagnosticados com periodontite crônica, enquanto o grupo controle será composto por 30 indivíduos sem periodontite. Os participantes receberão todas as devidas informações sobre a pesquisa e, posteriormente, serão preenchidos formulários para obtenção e assinatura do termo de consentimento informado, permanecendo uma cópia com os mesmos. A

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br

Página 02 de 08



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



Continuação do Protocolo: 1.044.223

avaliação da condição periodontal será realizada por um único examinador devidamente calibrado utilizando como referência os descritores clínicos periodontais propostos por GOMES-FILHO et al. (2007). O registro será feito na ficha de exame bucal formulada para este projeto." No que diz respeito à Coleta de Sangue e Separação de CMSP, "Um volume de 30mL de sangue dos participantes será coletado por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo tipo Vacutainer estéril (BDSP)[...]."

Apresenta Cronograma atualizado e Orçamento com a descrição da contrapartida da UEFS.

A pesquisadora coordenadora/responsável do Projeto tem experiência na área da pesquisa a ser desenvolvida, de acordo com o currículo lattes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar o efeito imunomodulador das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia origanoides*, *Lippia thymoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, *Lippia alba*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis leucocephala* e *Hyptis macrostachys* e das raízes das cactáceas *Cereus jamacaru*, *Tacinga palmadora*, *Harrisia adscendens* e *Opuntia ficus* sobre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humanas.

Objetivos Secundários:

- Investigar o papel dos óleos essenciais e dos extratos brutos das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia origanoides*, *Lippia thymoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, *Lippia alba*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis leucocephala*, *Hyptis macrostachys*, *Cereus jamacaru*, *Tacinga palmadora*, *Harrisia adscendens* e *Opuntia ficus* na proliferação e/ou na morte de CMSP de pacientes com e sem periodontite crônica;

- Estudar a capacidade destes óleos e extratos na inibição ou indução da produção de citocinas IL-6, IL-17, IL-13, TNF α , IFN- γ , IL-8, IL-10 e IL-1b em CMSP de pacientes com e sem periodontite crônica;

- Determinar as concentrações imunomoduladoras dessas substâncias;

- Identificar aqueles extrato com maior potencial imunomodulador para ser(em) usada(s) em um dentífrico ou colutório." (formulário simplificado Plataforma Brasil)

Endereço: Avenida Trezenove de Abril, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-480
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br

Página 03 de 08



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



Continuação do Parecer: 1.344.223

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

"Os riscos serão mínimos, pois todas as normas de biossegurança serão seguidas durante o atendimento e coleta de sangue dos indivíduos portadores ou não de periodontite. Além disso, a confidencialidade e anonimato dos participantes será realizada." (Informações Básicas do Projeto/Plataforma Brasil)

"Durante a coleta de sangue do seu braço, você poderá sentir dor. A intensidade da dor varia entre cada indivíduo, porém é uma dor suportável. Quanto mais tranquilo (a) você estiver, menos doloroso será o procedimento. Após a coleta, pode-se formar um hematoma (ficar um pouco roxo) ou ficar dolorido, mas o (a) dentista que realizará a coleta dispõe de meios para contornar esses efeitos indesejáveis." (TCLE).

BENEFÍCIOS:

"Espera-se que o extrato bruto e os óleos essenciais das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia origanoides*, *Lippia thymoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis leucocephala*, *Hyptis macrostachys*, *Cereus jamacaru*, *Tacinga palmadora*, *Harrisia adscendens* e *Opuntia ficus* apresentem efeito imunomodulador em células humanas, principalmente aquelas provenientes de indivíduos portadores de periodontite. Havendo esta capacidade imunomoduladora, é possível que algumas destas espécies possam ser utilizadas como adjuvantes no tratamento da periodontite. Assim, presente projeto pretende apontar as espécies e formas de apresentação (óleo e extrato) com maior potencial para ser utilizada em veículos como dentifrícios e/ou colutórios para a prevenção e tratamento da periodontite. Com a aquisição dos equipamentos, espera-se a adequação do Laboratório de Imunologia do Curso de Odontologia da UEFS, fortalecendo o referido laboratório e o grupo de pesquisa. O fortalecimento da linha de pesquisa, com a obtenção de recursos e dos dados esperados, fortalecerá também o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS, que poderá contar com a duas teses de doutorado e três dissertações de mestrado, além dos esforços na obtenção de produtos, revertendo o conhecimento científico produzido em tecnologia que favoreça a comunidade." (Informações Básicas do Projeto/Plataforma Brasil)

"Os resultados desta pesquisa nos ajudarão a ter uma melhor compreensão da Periodontite e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a esse tema, inclusive influenciando na

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-480
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br

Página 04 de 08

forma de prevenir e tratar a doença aqui estudada. [...] Os resultados dessa pesquisa podem ajudar no desenvolvimento, pelos

serviços públicos de saúde, de ações voltadas para prevenção da Periodontite; as quais trarão benefícios futuros para você, sua família e sua comunidade." (TCLE)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui relevância social e acadêmica, bem como viabilidade ética.

A pesquisadora responsável afirma que: "Não será executado procedimento novo, sem experimentação prévia, nos participantes da pesquisa. Todas as técnicas propostas já são bastante utilizadas e bem estabelecidas na literatura relacionada ao estudo do perfil de resposta Imune contra diversos fatores, como agentes infecciosos, células, drogas, etc." (ofício resposta de pendências)

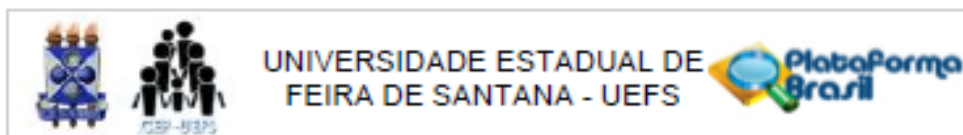
Os pesquisadores demonstram compromisso ético com os participantes da pesquisa, incluindo o retorno dos resultados e acompanhamento necessário diante da identificação de necessidade de saúde bucal, conforme comprova-se com o TCLE: "A divulgação dos resultados da pesquisa para os participantes voluntários será feita por meio de palestras agendadas previamente, a serem realizadas na sala de espera, antes do atendimento odontológico. Se você já tiver concluído o tratamento, será convidado (a) por telefone a comparecer na data indicada, na qual será também realizada uma revisão da sua saúde bucal, por meio do exame clínico periodontal, acompanhada de terapia de manutenção, caso necessária."

Vale ressaltar que foi questionado pelo comitê quem seria o responsável pela punção venosa para coleta de amostra de sangue e em relação a isso a pesquisadora apresentou que: "De acordo com o Conselho Federal de Odontologia (Resoluções 157/2015 e 158/2015), o cirurgião-dentista está apto a executar punção venosa." (ofício resposta de pendências) Esta permissão está descrita na Resolução CFO 158/2015 que "Regulamenta o uso de Agregados Plaquetários Autólogos para fins não transfusionais no âmbito da Odontologia." A referida resolução descreve que: "§ 1º. Fica autorizada a realização de venopunção para obtenção de Agregados Plaquetários Autólogos para uso exclusivo em Odontologia pelo cirurgião-dentista, devidamente habilitado ou de profissional de saúde devidamente habilitado em conjunto e corresponsabilidade com o cirurgião-dentista."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Protocolo completo.

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3181-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 1.344.223

Consta declaração de parceria com o Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON-UEFS) para a realização dos procedimentos de obtenção e análise dos extratos e óleos essenciais das espécies vegetais, assinado pela profa. Dra. Angélica Lucchese, coordenadora do LAPRON.

O TCLE contempla os elementos exigidos pelo Resolução 466/2012, após ajustes sugeridos pelo CEP-UEFS.

No TCLE consta que: "Os dentistas envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão o seu tratamento periodontal." Destaca-se que, se novos colaboradores estudantes forem inseridos na equipe de pesquisa do projeto, deve ser feita EMENDA anexando à Plataforma Brasil a declaração de compromisso com a Resolução 466/2012 deles.

Recomendações:

Recomenda-se rever soma dos valores apresentados no orçamento do projeto completo e formulário simplificado da Plataforma Brasil, visto que estão divergentes e este será submetido a edital de financiamento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após o atendimento das pendências, o Projeto está aprovado para execução, pois atende aos princípios bioéticos para pesquisa envolvendo seres humanos, conforme a Resolução nº 466/12 (CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Tenho muita satisfação em informar-lhe que seu Projeto de Pesquisa satisfaz às exigências da Res. 466/12. Assim, seu projeto foi Aprovado, podendo ser iniciada a coleta de dados com os participantes da pesquisa conforme orienta o Cap. X.3, alínea a - Res. 466/12. Relembro que conforme Institui a Res. 466/12, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída. Em nome dos membros CEP/UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano, este CEP aguardará o recebimento dos referidos relatórios.

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-480
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3181-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 1.344.223

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	TcleSorayareformulado.doc	30/11/2015 17:54:31	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Outros	AutorizacaoIapron.jpg	30/11/2015 17:45:37	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Outros	ProjetoImunoplantasCEP2Soraya.doc	30/11/2015 17:42:56	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Outros	ofcioCEPrespostependencias.doc	30/11/2015 17:40:11	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_520501.pdf	21/10/2015 21:48:45		Aceito
Outros	Jurandi.pdf	17/06/2015 21:56:22		Aceito
Outros	Termo de Compromisso- LEI 466 Laerte.pdf	17/06/2015 21:55:14		Aceito
Outros	soraya.pdf	17/06/2015 21:54:55		Aceito
Outros	Antonio.pdf	17/06/2015 21:53:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Imuno plantas-SCT2.docx	17/06/2015 21:53:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	01/06/2015 21:39:07		Aceito
Folha de Rosto	Doc Profª Soraya.pdf	01/06/2015 21:37:48		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FEIRA DE SANTANA, 30 de Novembro de 2015

Assinado por:

Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza
(Coordenador)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-480
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



Continuação do Parecer: 1.344.223

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br

Página 02 de 08

APÊNDICE A - FICHA DE ANAMNESE

INFORMAÇÕES GERAIS

Número do cadastro do paciente:										
Endereço:										
Telefone:										
Data de nascimento:			Idade:			Sexo:				
Ocupação atual:					Local de trabalho:					
Ocupação anterior:					Tempo de atividade:					
HABITOS DE VIDA										
Fumo	Sim		Não		Tipo		Nº cigarros/dia		Meses	
Alcool	Sim		Não		Tipo				Anos	
Drogas	Sim		Não		Tipo					

ANTECEDENTES MÉDICOS

Alergias	Sim		Não		Tipo				Anos	
Anemia	Sim		Não		Tipo				Anos	
Hipertensão arterial	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Hipotensão Arterial	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Válvulas Artificiais	Sim		Não		Tipo					
Problemas Valvares	Sim		Não		Tipo					
Endocardite Bacteriana	Sim		Não							
Ponte Safena	Sim		Não							
Infarto do Miocárdio	Sim		Não							
Marcapasso	Sim		Não		Anos					
Angina	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Diabete Tipo I	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Diabete Tipo II	Sim		Não		Compensada	Sim		Não	Anos	

Hepatite	Sim		Nao		Compensada	Sim			Nao	
Epilepsia	Sim		Nao		Compensada	Sim			Nao	
Distúrbio de coagulação	Sim		Nao		Compensado	Sim		Nao	Anos	
Leucemia	Sim		Nao		Compensada	Sim			Nao	
Tuberculose	Sim		Nao		Compensada	Sim			Nao	
Arteriosclerose	Sim		Nao		Compensada	Sim		Nao	Anos	
Osteoporose	Sim		Nao		Compensada	Sim			Nao	
Portador HIV	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim			Nao	
Portador HTLV	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Neoplasias	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim			Nao	
Radioterapia	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim			Nao	
Transplantado	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Leishmaniose	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Equistossomose	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Hipertireoidismo	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Hipotireoidismo	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Lupus eritematoso	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Artrite Reumatóide	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Febre Reumática	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Doença de Crhon	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Colite Ulcerativa	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim		Nao	Anos	
Malária	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim			Nao	
Herpes	Sim		Nao		Em Tratamento	Sim			Nao	
Já se submeteu a alguma destas cirurgias?										
Amigdalectomia	Sim		Nao			Anos				
Adenoidectomia	Sim		Nao			Anos				
Apendicectomia	Sim		Nao			Anos				
Esplenectomia	Sim		Nao			Anos				
Já fez uso destes medicamentos pelo menos um mês/ano. Se sim, qual a idade de início e qual a duração do uso?										
Fenilbutazona	Sim		Nao			Idade-anos			Duração-anos	
Corticóide	Sim		Nao			Idade-anos			Duração-anos	
Indometacina	Sim		Nao			Idade-anos			Duração-anos	

Cloranfenicol	Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos	
Imunossupressor	Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos	
Amoxicilina	Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos	
Metronidazol	Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos	
Hormônios	Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos	
Última vez que foi ao Dentista			O que realizou?					
Já fez Tratamento Periodontal?	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Não
Já fez Tratamento Ortodôntico?	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Não
Família com Doença Periodontal	Sim		Não					

HÁBITOS DE HIGIENE ORAL

Quantas vezes escova seus dentes ao dia?	1 vez		2 vezes		3 vezes ou +			
Além da escova, usa outro tipo de instrumento para limpar os dentes?	Fio		Palito		Escova interdental		Escova bitufo	Bochechos
O que você acha da sua condição bucal?	Ótima		Boa		Ruim		Não está preocupado com ela	

Assinatura do Paciente:

Assinatura do Entrevistador:

APÊNDICE B – PERIOGRAMA

FICHA DE EXAME CLINICO

Nº

Data de coleta

Nome:

Diagnóstico da doença periodontal:

Data de nascimento

Examinador

Idade aprox em anos

DENTE	E	IR-H						Profundidade de Sondagem						Índice de Sangramento						NIC						IP			
		disto-v	médio-v	mésio-v	disto-l	médio-l	mesio-l	disto-v	médio-v	mésio-v	disto-l	médio-l	mesio-l	disto-v	médio-v	mésio-v	disto-l	médio-l	mesio-l	disto-v	médio-v	mésio-v	disto-l	médio-l	mesio-l	V	L	M	D
17																													
16																													
15																													
14																													
13																													
12																													
11																													
21																													
22																													
23																													
24																													
25																													
26																													
27																													
37																													
36																													
35																													
34																													
33																													
32																													
31																													
41																													
42																													
43																													
44																													
45																													
46																													
47																													

Nomenclatura dentária segundo o sistema FDI.

Nota: A aproximação da idade segue o seguinte critério: até 6 meses aproxima para a idade anterior; acima de 6 meses aproxima para a idade seguinte.

E: existência de dentes: x= presente

IR-H: índice de recessão (+)ou hiperplasia(-) (mm)

Profundidade de sondagem nas faces disto-vestibular, médio-vestibular, méso-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e méso-lingual (mm)

Índice de sangramento nas faces disto-vestibular, médio-vestibular, méso-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e méso-lingual : 0=ausente; 1=presente

NIC: nível de inserção clínica nas faces disto-vestibular, médio-vestibular, méso-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e méso-lingual (mm)

IP: índice de placa nas faces vestibular, lingual, mesial e distal: 0=ausente; 1=presente

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**PROJETO: AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS NATIVAS DA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO NA PERIODONTITE CRÔNICA.
PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Soraya Castro Trindade**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para ser lido para/por todos os participantes do estudo

As informações a seguir descrevem o estudo e os seus direitos como participante. Além do que for aqui esclarecido, o entrevistador poderá responder qualquer questão que você tenha referente ao estudo. Por favor, leia ou ouça com atenção e, sempre que achar necessário, interrompa para perguntar.

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Avaliação do efeito imunomodulador de extratos e óleos essenciais de plantas nativas da região do semi-árido baiano na periodontite crônica”. Antes de decidir participar, é importante que você entenda o porquê da realização desta pesquisa e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e, se preferir, converse com seus familiares, amigos ou com seu médico. Se você desejar, pode levar este material para casa para pensar melhor. Pergunte-nos se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

A Periodontite é uma doença que se caracteriza por uma inflamação do osso que envolve os dentes, levando à perda dos dentes, ao mau hálito e ao comprometimento da saúde geral do doente. O estudo das células e moléculas envolvidas no processo inflamatório é importante para compreender melhor a atividade dessa doença e seus fatores de risco. Os resultados desta pesquisa nos ajudarão a ter uma melhor compreensão da Periodontite e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a esse tema, inclusive influenciando na forma de prevenir e tratar a doença aqui estudada.

O objetivo desse estudo é avaliar a ação dos extratos de algumas espécies vegetais - manjerição (*Ocimum basilicum*), salva-de-marajó (*Lippia organoides*), alecrim do campo (*Lippia thymoides*), alecrim de vaqueiro (*Lippia alnifolia*), *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, erva cidreira (*Lippia alba*), angelim do cerrado (*Vatairea macrocarpa*), alecrim-de-tabuleiro (*Hyptis fruticosa*), *Hyptis leucocephala* e alfavaca branca (*Hyptis macrostachys*) e das raízes das cactáceas mandacaru (*Cereus jamacaru*), quipá-de espinho (*Tacinga palmadora*), rabo de raposa (*Harrisia adscendens*) e figueira da Índia (*Opuntia ficus*) sobre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humanas, de pacientes com e sem periodontite.

Com isso, buscamos dados que contribuam para a compreensão da influência do extrato dessas plantas no tratamento da Periodontite, bem como para o entendimento dos mecanismos de resposta do homem diante da infecção por esse micro-organismo.

Para tanto, serão realizados a) preenchimento de questionário com perguntas sobre sua saúde e seus hábitos de higiene da boca; b) exame bucal, realizado por um (a) dentista, utilizando instrumentos apropriados para avaliar a gengiva; e c) coleta de uma amostra de sangue do seu braço (exame de sangue comum), realizada por um (a) dentista capacitado (a) e treinado (a) para a coleta.

Durante o questionário de saúde, caso seja identificada alguma doença sistêmica, como hipertensão, diabetes ou distúrbio de coagulação, você não participará das etapas seguintes da pesquisa, mas continuará sendo atendido nas atividades de extensão do curso de Odontologia da UEMS.

Os exames bucais que serão realizados são exames rotineiramente efetuados por dentistas em consultórios ou serviços odontológicos. Todo o material coletado será, depois de feitos os exames

necessários para este projeto, jogado fora. Solicitamos aqui a sua autorização para coleta e utilização do seu sangue durante o período desta pesquisa.

Durante a coleta de sangue do seu braço, você poderá sentir dor. A intensidade da dor varia entre cada indivíduo, porém é uma dor suportável. Quanto mais tranquilo (a) você estiver, menos doloroso será o procedimento.

Após a coleta, pode-se formar um hematoma (ficar um pouco roxo) ou ficar dolorido, mas o (a) dentista que realizará a coleta dispõe de meios para contornar esses efeitos indesejáveis. Podem ocorrer, durante e após a coleta, complicações como: punção acidental de uma artéria e infecção, as quais são evitadas através de medidas de segurança, capacitação e treinamento do profissional. O (a) dentista está capacitado (a) para contorná-las caso ocorram. Lembre-se que o (a) profissional está capacitado (a) para o procedimento e para evitar tais complicações. Faça perguntas sobre essas complicações para o (a) profissional a fim de se tranquilizar.

Participando desta pesquisa, você não receberá nenhum tipo de benefício material, como dinheiro, mas estará contribuindo para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Os dentistas envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão o seu tratamento periodontal.

A divulgação dos resultados da pesquisa para os participantes voluntários será feita por meio de palestras agendadas previamente, a serem realizadas na sala de espera, antes do atendimento odontológico. Se você já tiver concluído o tratamento, será convidado (a) por telefone a comparecer na data indicada, na qual será também realizada uma revisão da sua saúde bucal, por meio do exame clínico periodontal, acompanhada de terapia de manutenção, caso necessária.

Os resultados dessa pesquisa podem ajudar no desenvolvimento, pelos serviços públicos de saúde, de ações voltadas para prevenção da Periodontite; as quais trarão benefícios futuros para você, sua família e sua comunidade.

Vale ressaltar que, a qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que serão respondidas. Tem a liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si, podendo entrar em contato com os pesquisadores desta pesquisa para pedir que os seus dados sejam retirados da mesma, sem qualquer prejuízo para o seu atendimento em qualquer das atividades de extensão do curso de Odontologia da UEFS.

Os dados obtidos neste estudo, bem como fotografias que possam ser tiradas, serão apresentados em congressos e encontros da comunidade científica e serão publicados em revistas especializadas. No entanto, a sua identidade nunca será revelada e seu rosto nunca será mostrado nas fotografias, apenas sua boca.

Caso ocorram danos à saúde causados diretamente pela pesquisa, o participante tem direito a indenização, o procedimento será interrompido e os pesquisadores farão os encaminhamentos necessários. Nenhum custo será cobrado a você, pois será coberto pelo orçamento da pesquisa. Vale ressaltar que o risco de danos causados pela sua participação na pesquisa é baixo, pois serão realizados procedimentos de Odontologia que já seriam realizados na sua avaliação clínica. Da mesma forma, a coleta do seu sangue é semelhante àquela realizada quando você faz exame de sangue no laboratório.

Para o esclarecimento de dúvidas sobre o projeto, você pode entrar em contato com o pesquisador, ligando para (75) 3161.8112 (NUPPIIM- UEFS).

Estando de acordo, assinam:

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Local e Data: _____

**Pesquisadora responsável: Soraya Castro Trindade.
NUPPIIM - UEFS. Campus Universitário, Feira de Santana - Bahia.
BR-116, quilômetro 3, avenida Universitária, sem número.**

ATENÇÃO: a sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de denúncia pelo não cumprimento do que foi acordado ligue (75) 3161. 8067 (CEP-UEFS).

1ª via do participante da pesquisa
2ª via da pesquisadora responsável

APÊNDICE D

Tabela suplementar 1: Descrição das medidas de tendência central e dispersão das concentrações de citocinas (IL-1 β , IL-13, IFN- γ , IL-6 e IL-10) no sobrenadante das culturas de células dos indivíduos dos grupos com periodontite (P) e sem periodontite (SP), de acordo com a condição de estímulo empregada.

CITOCINAS	CLASSIFICAÇÃO DA PERIODONTITE Gomes-Filho <i>et al.</i> , 2007		
	Com periodontite (CP)	Sem periodontite (SP)	P
IL-1β			
Sem estímulo	N=09	N= 15	
Mediana (IQ)	-2,24 (-13,97-0,12)	-0,29 (-3,75-13,41)	0,089
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=09	N= 15	
Mediana (IQ)	1023,18 (133,14-1418,03)	1784,51 (1392,42-1940,97)	0,007*
Pokeweed	N=08	N=12	
Mediana (IQ)	1369,22 (400,66-1437,12)	1676,27 (1183,03-1978,87)	0,176
<i>Lippia alnifolia</i>	N=08	N=13	
Mediana (IQ)	0,14 (0,10-0,28)	0,52 (0,15-0,83)	0,082
<i>L. alnifolia</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=07	N=13	
Mediana (IQ)	3,02 (2,39-3,23)	2,94 (2,48-3,02)	0,393
IL-13			
Sem estímulo	N=12	N=20	
Mediana (IQ)	-1,81 (-9,93-30,23)	-4,69 (-11,87-4,28)	0,626
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=23	N=20	
Mediana (IQ)	9,85 (-7,43-46,51)	-1,24 (-4,62-11,43)	0,386
Pokeweed	N=5	N=6	
Mediana (IQ)	103,22 (61,76-267,80)	87,05 (14,61-278,28)	0,584
<i>Lippia alnifolia</i>	N=06	N=13	
Mediana (IQ)	-17,69 (-24,20--0,09)	-11,52 (-20,43-5,16)	0,335
<i>L. alnifolia</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=06	N=13	
Mediana (IQ)	-18,60 (-27,29--0,09)	-13,35 (-17,46--1,69)	0,313
IFN-γ			
Sem estímulo	N=05	N=11	
Mediana (IQ)	11,92 (8,68-26,65)	32,35 (19,09-72,06)	0,062
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=05	N=11	
Mediana (IQ)	835,74 (297,62-957,04)	163,91(95,42-1034,37)	0,691
Pokeweed	N= 04	N=05	
Mediana (IQ)	1061,07 (256,83-1116,67)	1067,26(505,50-1165,72)	0,624
<i>Lippia alnifolia</i>	N=04	N=06	
Mediana (IQ)	0,11 (0,09-0,23)	0,13 (0,10-3,18)	0,522
<i>L. alnifolia</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=04	N=06	
Mediana (IQ)	0,38 (0,25-0,53)	0,29 (0,10-4,32)	0,670

IL-6			
Sem estímulo	N=08	N=08	
Mediana (IQ)	33,68 (14,78-64,36)	56,66 (18,09-928,25)	0,431
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=08	N=08	
Mediana (IQ)	1085,02(997,81-1337,05)	1146,58(820,91-1353,04)	1,000
Pokeweed	N=05	N=06	
Mediana (IQ)	1094,94 (1062,08-1176,83)	1238,11(973,23-1313,30)	0,408
<i>Lippia alnifolia</i>	N=05	N=08	
Mediana (IQ)	0,12 (0,08-0,21)	0,15 (0,13-1,40)	0,213
<i>L. alnifolia</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=05	N=08	
Mediana (IQ)	2,62 (1,34-2,88)	0,94 (0,07-2,42)	0,107
IL-10			
Sem estímulo	N=04	N=06	
Mediana (IQ)	101,44 (-54,82-494,24)	139,61(-10,49-321,89)	0,593
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=04	N=05	
Mediana (IQ)	719,71 (675,31-1130,89)	716,29 (11,63-1393,48)	1,000
Pokeweed	N=03	N=04	
Mediana (IQ)	686,60 (224,36)	427,01 (32,91-699,61)	0,480
<i>Lippia alnifolia</i>	N=03	N=04	
Mediana (IQ)	0,09 (0,06)	0,15 (0,27-0,08)	0,289
<i>L. alnifolia</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=03	N=03	
Mediana (IQ)	0,095 (0,086)	0,07 (0,004-0,08)	0,077

APÊNDICE E

Tabela suplementar 2: Descrição das medidas de tendência central e dispersão das concentrações de citocinas (IL-1 β , IL-13, IFN- γ , IL-6 e IL-10) no sobrenadante das culturas de células dos indivíduos dos grupos com periodontite (P) e sem periodontite (SP), de acordo com a condição de estímulo empregada.

CITOCINAS	CLASSIFICAÇÃO DA PERIODONTITE Gomes-Filho <i>et al.</i> , 2007		
	Com periodontite (CP)	Sem periodontite (SP)	P
IL-1β			
Sem estímulo	N=09	N= 15	
Mediana (IQ)	-2,24 (-13,97-0,12)	-0,29 (-3,75-13,41)	0,089
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=09	N= 15	
Mediana (IQ)	1023,18 (133,14-1418,03)	1784,51 (1392,42-1940,97)	0,007*
Pokeweed	N=08	N=12	
Mediana (IQ)	1369,22 (400,66-1437,12)	1676,27 (1183,03-1978,87)	0,176
<i>Vaitarea macrocarpa</i>	N=08	N=13	
Mediana (IQ)	0,23 (0,10-1,19)	0,42 (0,20-1,16)	0,311
<i>V. macrocarpa</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=08	N=13	
Mediana (IQ)	2,95 (2,22-3,33)	2,48 (1,54-3,17)	0,469
IL-13			
Sem estímulo	N=12	N=20	
Mediana (IQ)	-1,81 (-9,93-30,23)	-4,69 (-11,87-4,28)	0,626
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=23	N=20	
Mediana (IQ)	9,85 (-7,43-46,51)	-1,24 (-4,62-11,43)	0,386
Pokeweed	N=5	N=6	
Mediana (IQ)	103,22 (61,76-267,80)	87,05 (14,61-278,28)	0,584
<i>Vaitarea macrocarpa</i>	N=06	N=13	
Mediana (IQ)	-22,26 (-26,14—6,03)	-12,43(- 21,35-6,07)	0,148
<i>V. macrocarpa</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=06	N=13	
Mediana (IQ)	--22,26 (-22,94—7,98)	-11,97 (-21,12-19,32)	0,428
IFN-γ			
Sem estímulo	N=05	N=11	
Mediana (IQ)	11,92 (8,68-26,65)	32,35 (19,09-72,06)	0,062
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=05	N=11	
Mediana (IQ)	835,74 (297,62-957,04)	163,91(95,42-1034,37)	0,691
Pokeweed	N= 04	N=05	
Mediana (IQ)	1061,07 (256,83-1116,67)	1067,26(505,50-1165,72)	0,624
<i>Vaitarea macrocarpa</i>	N=02	N=05	
Mediana (IQ)	0,95 (0,95)	0,14 (0,12-6,21)	0,053

<i>V. macrocarpa</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=02	N=04	
Mediana (IQ)	0,15 (0,19)	0,68 (0,19-4,90)	0,355
IL-6			
Sem estímulo	N=08	N=08	
Mediana (IQ)	33,68 (14,78-64,36)	56,66 (18,09-928,25)	0,431
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=08	N=08	
Mediana (IQ)	1085,02(997,81-1337,05)	1146,58(820,91-1353,04)	1,000
Pokeweed	N=05	N=06	
Mediana (IQ)	1094,94 (1062,08-1176,83)	1238,11(973,23-1313,30)	0,408
<i>Vatairea macrocarpa</i>	N=05	N=08	
Mediana (IQ)	0,15 (0,12-0,26)	0,16 (0,11-0,40)	0,796
<i>V. macrocarpa</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=05	N=08	
Mediana (IQ)	2,62 (1,67-2,67)	0,21 (0,06-2,11)	0,107
IL-10			
Sem estímulo	N=04	N=06	
Mediana (IQ)	101,44 (-54,82-494,24)	139,61(-10,49-321,89)	0,593
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=04	N=05	
Mediana (IQ)	719,71 (675,31-1130,89)	716,29 (11,63-1393,48)	1,000
Pokeweed	N=03	N=04	
Mediana (IQ)	686,60 (224,36)	427,01 (32,91-699,61)	0,480
<i>Vatairea macrocarpa</i>	N=02	N=03	
Mediana (IQ)	0,07 (0,06)	0,27 (0,15)	0,083
<i>V. macrocarpa</i> + <i>Porphyromonas gingivalis</i>	N=01	N=03	
Mediana (IQ)	0,17 (0,17)	0,20 (0,05)	0,655

APÊNDICE F

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA PRINCÍPIA IFPB

Avaliação do potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke na periodontite.

Laerte Oliveira Barreto Neto¹, Angélica Maria Lucchese², Rebeca Pereira Bulhosa³, Thais Brito de Oliveira Moura⁴, Ellen Karla Nobre dos Santos⁵, Soraya Castro Trindade⁶

¹ Dentist. PhD student in Biotechnology, State University of Feira de Santana.

² PhD in Organic Chemistry. Full Professor at Feira de Santana State University.

³ Biomedic. Master in Immunology, Federal University of Bahia.

⁴ Biologist. PhD student in Immunology, Federal University of Bahia.

⁵ Dentist. PhD in Immunology, Federal University of Bahia

⁶ PhD in Immunology. Full Professor at Feira de Santana State University.

Resumo

Experiência. A periodontite é uma doença inflamatória crônica induzida por microrganismos, que pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças sistêmicas. A transição do periodonto saudável para o doente depende da disbiose microbiana sinérgica e da resposta imune do hospedeiro, sendo que, neste contexto, *Porphyromonas gingivalis* pode ser considerado um patógeno-chave. Considerando o contexto da prevalência da periodontite no Brasil, país de grande biodiversidade e várias espécies com potencial biotecnológico, o uso de plantas medicinais pode se tornar uma alternativa importante para o controle desta doença a custos mais baixos, beneficiando a população

Objetivo. Avaliar o potencial imunomodulador do extrato das folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke na periodontite.

Métodos. Os grupos de comparação consistiram em um grupo teste, formado por indivíduos com o diagnóstico de periodontite (P) e um grupo controle, com indivíduos sem periodontite (SP). A produção das citocinas nos sobrenadantes da cultura de sangue total foi quantificada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA).

Constatações e principais conclusões. O extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (VM) inibiu a produção de IL-13 (p=0,002), IL-6 (p=0,000) e IFN- γ (p=0,000) em comparação com a produção basal das células (não estimuladas). A utilização do extrato de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke juntamente com o extrato de *P. gingivalis* no cultivo promoveu uma redução nos níveis de IL-1 β (p=0,000), IL-13 (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN- γ (p=0,000), IL-10 (p=0,005) e IL-17 (p=0,003), em relação às concentrações induzidas pelo extrato de *P. gingivalis* isoladamente. O extrato da *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke tem efeito modulador da produção das citocinas induzidas em resposta à presença de antígenos de *Porphyromonas gingivalis*.

Palavras Chave: Citocinas, Doenças Periodontais, Plantas medicinais.

Abstract

Introduction. Periodontitis is a chronic inflammatory disease induced by microorganisms that may contribute to the development of various systemic diseases. Since the transition from healthy to

diseased periodontal tissues depends on synergistic microbial dysbiosis and host immune response, *Porphyromonas gingivalis* can be considered a key pathogen. Considering the prevalence of periodontitis in a country with large biodiversity of species with biotechnological potential such as Brazil, the use of medicinal plants can become a low cost alternative to control periodontitis, benefiting the population.

Objective. To evaluate the immunomodulatory potential of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke leaf extract on periodontitis.

Methods. The comparison groups consisted of a test group, consisting of individuals diagnosed with periodontitis (P) and a control group, with individuals without periodontitis (WP). Cytokine production in whole blood culture supernatants was quantified using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

Considerations and conclusion. *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (VM) extract inhibited IL-13 ($p=0,002$), IL-6 ($p=0,000$) and IFN- γ ($p=0,000$) production compared to basal cell production (unstimulated). The use of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract along with *P. gingivalis* extract in cell cultures promoted a reduction in IL-1 β ($p=0,000$), IL-13 ($p=0,000$), IL-6 ($p=0,000$), IFN- γ ($p=0,000$), IL-10 ($p=0,005$) and IL-17 ($p=0,003$) levels, compared to the concentrations induced by *P. gingivalis* extract alone. *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract has a modulating effect on the production of induced cytokines in response to the presence of *Porphyromonas gingivalis* antigens.

Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease of periodontal tissues induced by microorganisms present in the subgingival biofilm, which may contribute to the development of various systemic diseases, such as asthma (SOLEDADE-MARQUES *et al.*, 2018), metabolic syndrome (GOMES-FILHO *et al.*, 2015), cardiovascular diseases (GOMES-FILHO *et al.*, 2017), low birth weight (CRUZ *et al.*, 2009) and diabetes (GALVIS, ZULUAGA, SALDARRIAGA, 2012). The transition from healthy periodontal to periodontal inflammatory disease depends on the onset of microbial dysbiosis and the host immune response (LUNDMARK *et al.*, 2019), *Porphyromonas gingivalis* being considered a key microorganism (CARLOS *et al.*, 2018).

According to SB Brasil 2010, last national oral health epidemiological survey conducted in Brazil, about a quarter of 12-year-olds, a third of 15- to 19-year-olds, approximately half of 35-44-year-olds and less than a fifth of the elderly presented gingival bleeding. The presence of dental calculus increased with age, reaching the highest prevalence among adults, approximately 64%. Periodontal conditions in the North and Northeast regions were worse at all ages and age groups when compared to the other regions (BRASIL, 2012).

The absence of adequate treatment of periodontitis can lead to tooth loss, having physical, biological and psychic changes as consequences, negatively impacting the quality of life of individuals, impairing daily activities (PASSOS-SOARES *et al.*, 2018).

The most important factor in maintaining periodontal health is proper biofilm control (DIAS, SILVA, LIMA, 2015) by mechanical methods (brushing, flossing, scraping and root straightening) and chemicals such as the use of mouthwashes and antibiotics (GONÇALVES, PINTO, 2013). However, due to resistance to conventional antibiotic therapy and oral antiseptics (JUIZ, ALVES, BARROS, 2010). It is necessary to look for alternatives for the development of an effective and less aggressive chemical medium for biofilm control (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

In a country with large biodiversity of species with biotechnological potential such as Brazil⁽¹²⁾, the implementation of actions and services of homeopathy, medicinal plants and herbal medicine is contemplated by the National Policy of Integrative and Complementary Practices in SUS (PNPIC), approved in 2006 (BRASIL, 2006). Thus, considering the panorama of periodontitis in the country, the use of medicinal plants may become a low cost alternative to control (CORDEIRO *et al.*, 2006) periodontitis, benefiting the population (JUIZ, ALVES,

BARROS, 2010). In this perspective, this work aimed to evaluate the immunomodulatory potential of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) *Ducke* leaf extract in periodontitis.

Material and methods

Ethical aspects

This study has been presented to Ethics Committee in Research of the State University of Feira de Santana (UEFS) and approved by the opinion number 1.344.223 (2015). All research participants signed the written informed consent.

Selection of the research participants

The sample was composed by healthy individuals who sought dental care in the outpatient department of the UEFS Dentistry course, from August 2016 to December 2018.

The exclusion criteria assessed by anamneses and considered for this study were: history of hypertension, diabetes, autoimmune diseases, pregnancy, prior periodontal treatment, smoker, use of antibiotic and anti-inflammatory in the previous 6 e 2 months, respectively, before the blood collection.

The participants were divided into two groups: test group, composed by individuals whit periodontitis (P), and control group, composed by individuals without periodontitis (WP).

Sample size

For the calculation of the sample size, a pilot study was performed for determination of the minimum error rate and standard deviation, for a significance level of 5% and test power of 80%, to be considered for measuring of interleukin-6 (IL-6) produced in response to the *Vatairea macrocarpa* (Benth.)*Ducke* stimulus. Therefore, considering the standard deviation of 1.260 pg/mL for IL-6 levels, and a minimum error rate of 950 pg/mL, the total number of participants for each group was 28. 10% were added to this total, due to possible losses. The total sample size calculated was 31 participants with periodontitis and 31 participants without periodontitis.

Periodontal examination

A previously trained dental surgeon (Kappa index = 0,83 for probing depth measurements and 0,74 for recession /hyperplasia) was responsible for assessing the periodontal condition of the participants. All measurements were performed using a Williams probe and recorded on the periogram. During the periodontal examination, the bleeding upon probing index, furrow depth and gingival recession/hyperplasia were measured and the insertion level values were obtained for the whole oral cavity. These observations were obtained in six different surfaces for each dental unit (distobuccal, mesiobuccal, mid-buccal, distolingual, mid-lingual, mesiolingual), except for the visible plaque index which was evaluated in only 4 surfaces (mesial, distal, buccal and lingual).

Periodontitis diagnosis

Selected participants for P group were diagnosed with periodontitis when meeting the criteria of moderate or severe severity of the disease, according to Gomes-Filho et al., 2018. Thus, the diagnosis of periodontal was established by the presence of at least four teeth with at least one site with depth of probing greater than or equal to 4 mm, loss of insertion greater than or equal to 3 mm and bleeding upon probing on the same site (GOMES-FILHO *et al.*, 2007).

Cell culture

Collection of 30mL of venous blood was performed in vacuum tubes with heparin for culture of whole blood cells.

Cultures were performed in laminar flow using 2 mL of blood from each participant onto 24-well culture plates (COSTAR, Nova Iorque, EUA). For each participant, 2 mL of blood was placed in each well, totaling five wells: one only with whole blood, representing the negative control, the other with 2.5 µg/ml Pokeweed Mitogen (PWM), as the positive control, and the remaining three were added *P. gingivalis* ATCC 33277 extract antigens (0.5 µg/mL) (TRINDADE *et al.*, 2006), *Vatairea macrocarpa* (Benth.) *Ducke* extract (10 µg/mL) or both extracts concomitantly.

Cells were grown in a greenhouse with 5% CO₂ at 37°C. After 48h, the cultures were collected from the wells and centrifuged in a microtubes centrifuge to obtain the supernatant, which was stored at -20°C until analysis.

Acquisition of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke leaf extract

The leaves of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke were collected and taken to the UEFS Laboratory of Chemistry of Natural and Bioactive Products (LAPRON), dried at room temperature and protected from light and then pulverized in a knife mill. Afterwards, the material was three consecutively extracted by maceration with methanol. Thereafter the crude extract was concentrated on rotary evaporators under reduced pressure and at a temperature between 40° and 45°C. The solvent residues were removed by evaporation in an exhaust hood.

Protein measurement

Aliquots of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke leaf extract were diluted in 3% methanol (Synth)/DMSO (Synth) and filtered with a sterile membrane of 0.22µm diameter to obtain the protein concentration. The protein measurement was performed using the modified Lowry technique, according to the manufacturer's instructions (DC™ ProteinAssay da Biorad, CA, USA) and the result was obtained by spectrophotometer reading.

Evaluation of cellular cytotoxicity

To evaluate the cell viability of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke leaf extract, the blood of three participants was processed to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (TRINDADE *et al.*, 2011), which were cultured under the same conditions as the whole blood cell culture. The extract was applied to different wells at the following concentrations: 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL. The colorimetric test that evaluates the conversion of MTT – [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium] bromide to formazan (Sigma, St. Louis, MI, USA) was employed following the instructions

of the manufacturer, using the wavelength of 570 nm to obtain the optical density.

Evaluation of Cytokine Production

The production of cytokines IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 (Biolegend, CA, USA) and IL-1 β (Invitrogen, CA, USA) in supernatants from whole blood culture was quantified using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, according to the manufacturer's instructions. ELISA were performed using 96-well flat bottom adsorption polystyrene plates (COSTAR, Coornig Life Science, Tewksbury, MA, EUA). After signal development with tetramethylbenzidine (TMB) and addition of stop solution (H₂SO₄2N), the optical density was determined in ELISA Reader (ELx 800 - Bio-Tek) at 450 nm.

Statistical analysis

Variables distribution of age, number of teeth in the mouth, periodontal clinical descriptors and cytokine concentration was verified by Kolmogorov-Smirnov test. Comparison between P and WP groups was done by T de Student test for age, chi-square test for gender and Mann-Whitney test for other variables.

To compare cytokine concentrations between stimuli employed in cell culture, the Kruskal-Wallis test was used; For the combination between stimulus pairs, the Mann-Whitney test with Bonferroni correction was used. All analyzes were performed using SPSS v.22 software and differences were considered statistically significant if *p* value ≤0.05.

Results

Vatairea macrocarpa (Benth.) Ducke concentrate extract showed a protein concentration of 3.64 mg/ml. In the analysis of cellular cytotoxicity, it was observed that the cells remained viable when the extract was tested at 1 µg/mL, 5 µg/mL and 10 µg/mL, therefore the concentration of 10 µg/mL was chosen for the experiments.

The study consisted of 58 individuals, 17 with periodontitis (P), with mean age of 43,18±11,01 years old, and 41 without

periodontitis (WP), with mean age of 38,44±12,80 years old. Both groups, P and WP, demonstrated homogeneity regarding the covariates age and number of teeth present in the mouth (Table 1), since no statistically significant difference was observed. However,

statistically significant difference in the percentage of sites with bleeding on probing (p=0,001), percentage of sites with probing depth ≥ 4mm (p=0,000) and percentage of sites with clinical insertion level ≥ 3mm (p=0,000), demonstrating the worst periodontal condition

Table 1: Clinical characteristics of the groups with periodontitis (P) and without periodontitis (WP), diagnosed according to the criteria of Gomes-Filho et al., (2007).

DESCRITORES CLÍNICOS	CLASSIFICAÇÃO DA PERIODONTITE Gomes-Filho et al, 2007				
	With periodontitis (P)		Without periodontitis (SP)		P
Gender	N	%	N	%	
Male	10	58,8	10	24,4	
Female	07	65,1	31	66,7	
Total	17	100	41	100	
Age	N=17		N= 41		0,165
Mean ±SD	43,18±11,01		38,44±12,80		
No of teeth	N=17		N= 41		0,450
Median (IQ)	22,00 (19,00-26,00)		24,00 (19,50-27,00)		
% of bleeding sites	N=17		N= 41		0,001
Median (IQ)	45,65 (28,55-69,77)		9,52 (3,66-32,40)		
% of sites with probing depth ≥4mm	N=17		N= 41		0,000
Median (IQ)	16,66 (8,27-38,48)		0,00 (0,00-3,77)		
% of sites with CIL ≥ 3mm	N=17		N= 41		0,000
Median (IQ)	51,85 (15,06-76,05)		7,63 (2,15-18,37)		

there was no difference between the groups regarding gender (p=0,012). There was

in the P group, as can be seen from table .

P: significance level ≤ 0,05.

The cells of individuals from the WP group cultured with *Porphyromonas gingivalis* extract produced higher concentrations of IL-1β than cells from the P group cultured under the same conditions, with median of 1784,52 (IQ: 1,392,42-1940,97) pg/mL and 1023,18 (IQ: 133,15-1418,04) pg/mL, respectively (p=0,007). On the other hand, higher IL-6 production was observed by P group cells (2,624; IQ: 1,68-2,67) co-stimulated with *Vaiterea macrocarpa* e *Porphyromonas gingivalis* extracts than by WP group cells (0,211; IQ:0,07-2,11), with statistical significance (p=0,013).

By comparing cytokine levels between culture conditions, it was possible to detect higher concentrations of IL-1β (p=0,000), IL-6

(p=0,000), IFN-γ (p=0,000), IL-10 (p=0,004) and IL-17 (p=0,006) in cultures of cells cultured with *Porphyromonas gingivalis* extract (PG) than from those unstimulated cells (B). *Vatairea macrocarpa* (Benth.) *Ducke* (VM) extract inhibited IL-13 (p=0,002), IL-6 (p=0,000) and IFN-g (p=0,000) production, keeping these levels low even when cells were co-cultured with *Vatairea macrocarpa* and *P. gingivalis* extracts (VM + PG).

Higher concentrations of IL-1β (p=0,000), IL-13 (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN-g (p=0,000), IL-10 (p=0,003) and IL-17 (p=0,003) were produced by cells cultivated with *P. gingivalis* extract than by cells cultivated with *Vatairea macrocarpa* (Benth.) *Ducke* extract. In addition, the combination of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) *Ducke* and *P.*

gingivalis extracts in culture promoted a reduction in IL-1 β (p=0,000), IL-13 (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN- γ (p=0,000), IL-10 (p=0,005) and IL-17 (p=0,003) levels compared

to the concentrations induced by *P. gingivalis* extract alone, and an increase in IL-1 β levels (p = 0.000) compared to the use of *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*) *Ducke* extract alone.

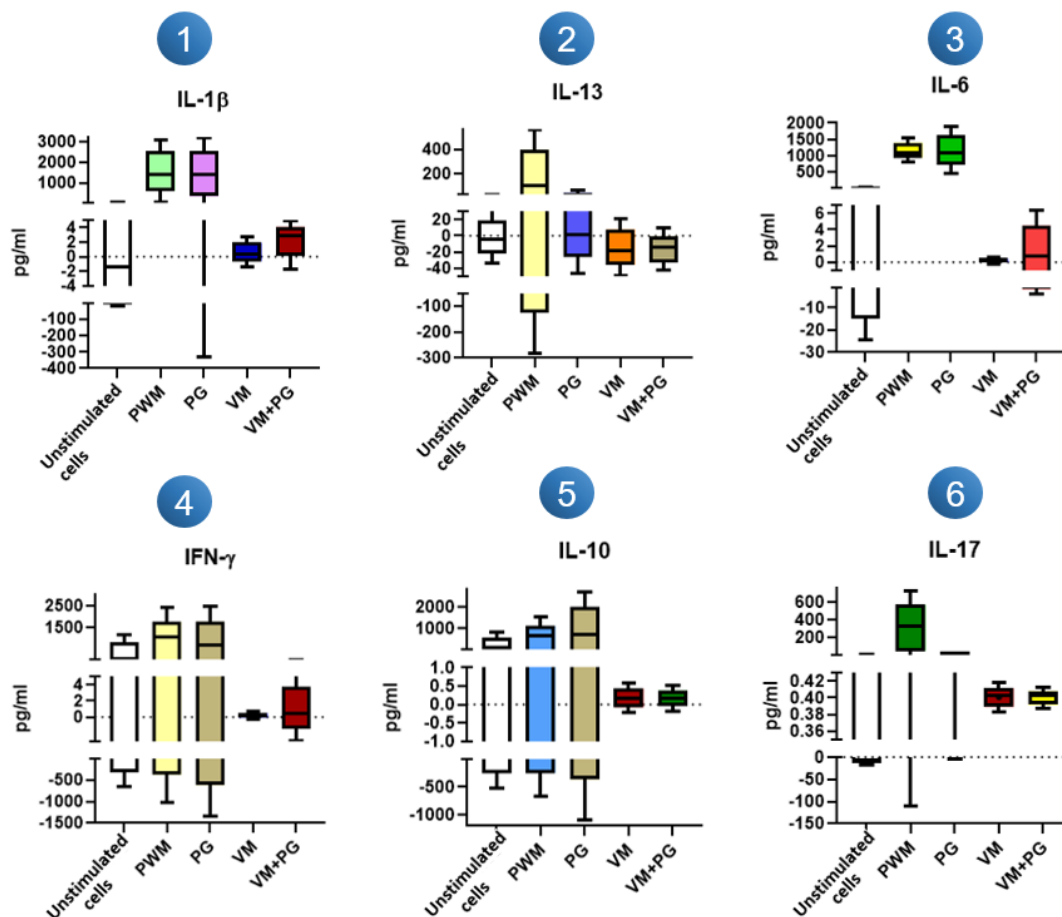


Figure 1: Concentration of cytokines (pg / mL) in human peripheral blood cell culture supernatant cultured without antigen stimulation (Unstimulated cells) with pokeweed mitogen (PWM), *P. gingivalis* extract (PG), *Vatairea macrocarpa* (*Benth.*) *Ducke* (VM) extract and with both extracts concomitantly (VM + PG). 1: interleukin 1 β (IL-1 β); 2: interleukin 13 (IL-13); 3: interleukin 6 (IL-6); 4: interferon γ (IFN- γ); 5: interleukin 10 (IL-10) and 6: interleukin 17 (IL-17).

Discussion

According to the findings in this study, *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract has the ability to inhibit *in vitro* production of IL-13 and IFN- γ by human peripheral blood cells. In addition, it appears to promote down-regulation of IL-1 β , IL-13, IL-6, IFN- γ , IL-10 and IL-17 production, as opposed to antigenic stimulation by *Porphyromonas gingivalis* extract, a bacterium considered key pathogen in periodontal dysbiosis (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2011), related to the onset and progression of periodontitis (JUIZ *et al.*, 2016).

IL-1 β and IL-6 are proinflammatory innate immunity cytokines found in large quantities in periodontal tissues and gingival fluid of sites with periodontitis (MENEGATI *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2008). They act to recruit leukocytes to the site of infection, stimulate the release of other inflammatory mediators, and unbalance the RANK-RANKL-OPG axis (SINGH *et al.*, 2012; KWAN *et al.*, 2004), leading to bone resorption. Several *P. gingivalis* antigens have been shown to stimulate their production, which may partially explain the pathogen-host interaction in the pathogenesis of the disease. This reveals the potential of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract in controlling periodontitis.

Although considered an immunoregulatory cytokine, IL-10 is also related to the response to *Porphyromonas gingivalis* infection (LIU *et al.*, 2017; TRINDADE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 1999). It is known that the production of this cytokine is triggered to regulate the production of IFN- γ , characteristic of the Th1 response (HERRERO *et al.*, 2003), as well as can positively or negatively control the production of Th2 profile cytokines, such as IL-4 and IL-13 (KOSAKA *et al.*, 2011). As *Porphyromonas gingivalis* is a facultative intracellular pathogen, thus surviving both inside and outside the cell (LI *et al.*, 2008), it can trigger different types of response in the host. Consequently, there will be a greater or lesser tissue destruction depending on the combination of mediators produced. The possibility of the *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract acting on the inhibition of cytokines of several profiles supports its use in the management of periodontal inflammation.

Regarding IL-17, cytokine signature of the Th17 profile, it is characterized by an intense neutrophilic response (NORMATON, MARTI, 2013). It is worth noting that neutrophils are the most described cells in the pathogenesis of periodontitis, whose defective functionality and mobility are strongly related to the pathogenesis of the disease (GAUDILLIERE *et al.*, 2019). It is also suggested that IL-17 is involved in the bone resorption of periodontitis (RUIZ-GUTIERREZ *et al.*, 2014). These considerations may suggest that the TH17 profile can be induced in periodontitis and that its regulation is necessary for the return to tissue homeostasis.

Vatairea macrocarpa (Benth.) Ducke belongs to the family Leguminosae (or Fabaceae). It is a native savanna tree and widely distributed throughout the Brazilian territory, popularly used in individuals with diabetes (SANTOS *et al.*, 2016). *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke has antimicrobial (VALADARES, 2017; MATOS *et al.*, 1988), antiulcerogenic (JESUS *et al.*, 2007), hypoglycemic (OLIVEIRA *et al.*, 2008) properties, however studies that have evaluated its biological properties continue to be scarce, mainly related to inflammatory and infectious conditions of the mouth.

Thus, important aspects about the administration of this extract, such as the vehicle, the ideal concentration to be employed and its side effects are not yet known. In this study, the cytotoxicity of the extract at 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 20 $\mu\text{g/mL}$ concentrations was tested *in vitro*, demonstrating low aggressiveness to host cells. The concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ was chosen for antigenic stimulation and cytokine concentration determination, as it was also tested in a previous pilot study with *Artemia salina* (data not show), being the highest non-cytotoxic rate found. In addition, lower concentrations could not guarantee the antigenic stimulation needed for the evaluations.

It is important to note that the stimulation of the peripheral blood cells was performed *in vitro*, which makes it difficult to extrapolate the results. Another important limitation was the small sample size, which may

have interfered with the power of the analysis and, consequently, the results of the comparisons intergroup.

However, it is important to note that there were no studies that investigated the regulation of the production of cytokines by *L. alnifolia* extract, mainly in the context of periodontal infection by *Porphyromonas gingivalis*. Thus, efforts should be made to investigate the biological properties of this extract *in vivo* to determine whether this extract may be used in the adjuvant treatment of periodontitis.

Conclusion

The *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke extract regulates the production of cytokines produced in response to the presence of *Porphyromonas gingivalis* antigens.

Referências

1. Soledade-Marques KR, Gomes-Filho IS, da Cruz SS, Passos-Soares JS, Trindade SC, Cerqueira EMM, Coelho JMF, Barreto ML, Costa MDCN, Vianna MIP, Scannapieco FA, Cruz AA, Souza-Machado A. Association between periodontitis and severe asthma in adults: A case-control study. *Oral Dis.*, v.24, n.3, p. 442-448, 2018.
2. Gomes-Filho IS, Mercês MC, Passos-Soares JS, Cruz SS, Teixeira AML, Trindade SC, Cerqueira EMM, Coelho JMF, Monteiro FMM, Barreto ML, Vianna MIP, Costa MCN, Seymour GJ, Scannapieco FA. Severity of Periodontitis and Metabolic Syndrome: Is There an Association? *J Periodontol.*, v.87, n.4, p. 357-366, 2016.
3. Gomes-Filho IS, Farias NSA, Santos CAST, Passos-Soares JS, Barreto ML, Cruz SS, Barbosa PJB, Marques-Neto J, Coelho JMF, Cerqueira EMM, Hintz AM, Coelho AF, Figueiredo ACG, Santos PNP, Buischi YP, Trindade SC. Periodontal Disease as a Risk Factor for Acute Myocardial Infarction. *Periodontal Disease as a Risk Factor for Acute Myocardial Infarction. EC Dental Science*, v. 10.2, p. 62-71, 2017.
4. Cruz SS, Costa MC, Gomes-Filho IS, Rezende EJ, Barreto ML, Dos Santos CA, Vianna MI, Passos JS, Cerqueira EM. Contribution of periodontal disease in pregnant women as a risk factor for low birth weight. *Community Dent Oral Epidemiol.*, v.37, n.6, p. 527-533, 2009.
5. Galvis MM, Zuluaga YPM, Saldarriaga AS. Diabetes y enfermedad periodontal: hacia un modelo clínico bidireccional. *Rev. Nac. de Odontología*, v.14, n.8, p.76-87, 2012.
6. Lundmark A, Hu YOO, Huss M, Johannsen G, Andersson AF, Yucel-Lindberg T. Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* v.21, p. 1-32, 2019.
7. Carlos JC, Sete MRC, Sztajn bok FR, Figueredo CMS. Infecção periodontal por *Porphyromonas gingivalis*: de uma inflamação oral a um possível “gatilho” para a autoimunidade via citrulinização de proteínas. *Braz J Periodontol.*, v.28, n.04, p.48-56, 2018.
8. Brasil. Projeto SB 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde [2012]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf. Acesso em 05 mar 2019.
9. Passos-Soares JS, Gomes-Filho IS, Santos LPS, Santos PNP, Silva, ICO, Balinha ISCE, Trindade SC. Impacto da perda dentária na qualidade de vida relacionada a saúde bucal de adultos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v.17, n.2, p.158-163, 2018.
10. Dias JN, Silva MPCF, Lima IPC. O uso de fitoterápicos à base de aroeira como coadjuvante no tratamento da gengivite: Revisão Sistemática. *Rev. Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, p. 1187-1191, 2015.
11. Gonçalves EA; Pinto PF. Avaliação da eficácia antimicrobiana dos enxaguatórios bucais contendo como princípios ativos o triclosan, cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais. *HU Revista Juiz de Fora*, v.39, n.03, p.45-50, 2013.
12. Juiz PJJ; Alves RJC; Barros TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no

- tratamento da doença periodontal. Rev. bras. farmacogn, v.20, n.01, p.134-139, 2010.
13. Oliveira TB, Souza JS, Gomes-Filho IS, Moura D, Pereira-Filho JN, Trindade SC. O uso da Lippia no tratamento das doenças periodontais. J Dent Pub H., v. 09, n. 03, p.227-237, 2018.
 14. Brasil. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília: Poder Executivo [2006]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em 03 mai 2019.
 15. Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. Rev. Bras. Cienc. Farm., v.42, n.03, p. 395-404, 2006.
 16. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, Dos Santos CA, Soledade KR, Magalhães MA, Azevedo AC, Trindade SC, Vianna MI, Passos JS, Cerqueira EM. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. [J Clin Periodontol., v.34, n.11, p. 957-963, 2007.](#)
 17. Trindade SC, Gomes-Filho IS, Meyer RJ, Vale VC, Pugliese L, Freire SM. Serum antibody levels against Porphyromonas gingivalis extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. J Int Acad Periodontol., v.10, n.02, p.50-58, 2008.
 18. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by Porphyromonas gingivalis HmuY in humans. [J Periodontal Res., v.47, n.01, p.27-32, 2011.](#)
 19. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskandari MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, Darveau RP, Curtis MA. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. Cell Host & Microbe, v. 10, n.05, p. 497-506, 2011.
 20. Juiz, P JL, Silva, F, Campos MJA, Uetanabaro APT, Campos RJ, Alves, AML. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Ocimum americanum e Ocimum basilicum sobre periodontopatógenos. Braz J Periodontol., v.26, n.04, p. 07-14, 2016.
 21. Menegat J, Brito F, Barros F, Pedreira R, Fischer RG, Figueiredo CMS. Níveis elevados de IL-6 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica e retrocolite ulcerativa idiopática. Periodontia, v.20, n.02, p. 61-68, 2010.
 22. Lima V, Bezerra MM, Leitão RFDC, Brito GADC, Rocha, FACD, Ribeiro RDA. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da Periodontite–Papel de Moduladores Farmacológicos. R Periodontia, v.18, n.03, p.07-19, 2008.
 23. Singh A, Mehdi AA, Srivastava RN, Verma NS. Immunoregulation of bone remodelling. Int J Crit Illn Inj Sci., Mai, v.02, n.02, p.75-81, 2012.
 24. Kwan TS, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev., v.15, n.01, p.49-60, 2004.
 25. Liu Z, Hu Y, Yu P, Lin M, Huang G, Kawai T, Taubman M, Wang Z, Xiaozhe H. Toll-like receptor agonists Porphyromonas gingivalis LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells. J Appl Oral Sci, v.25, n.01, p. 90-100, 2017.
 26. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, de Moura-Costa LF, Vale VC, Galdino-Neto M, Alves Dos Santos H, de Carvalho Filho PC, Stocker A, Bendicho MT, Xavier MT, de Moraes Marcílio Cerqueira E, Meyer R. Porphyromonas gingivalis HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. J Periodontol., v.84, n.05, p.650-655, 2012.

27. Wang PL, Shirasu S, Shinohar M, Azuma Y, Daito M, Yasuda H, Ohura K.. IL-10 inhibits Porphyromonas gingivalis LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.263, n.02, p.372-377, 1999.
28. Herrero C1, Hu X, Li WP, Samuels S, Sharif MN, Kotenko S, Ivashkiv LB. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN- γ . *J Immunol.*, v.171, n.10, p.5034-5041, 2003.
29. Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology*, v.216, n.07, p. 811-20, 2011
30. Li L, Michel R, Cohen J, Decarlo A, Kozarov E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of Porphyromonas gingivalis. *BMC Microbiol.*, v.06, n.08, p.01-11, 2008.
31. Normaton M, Marti LC. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. *Einstein*, v.11, n.02, p.237-246, 2013.
32. Gaudilliere DK, Culos A, Djebali K, Tsai AS, Ganio EA, Choi WM, Han X, Maghaireh A, Choisy B, Baca Q, Einhaus JF, Hedou JJ, Bertrand B, Ando K, Fallahzadeh R, Ghaemi MS, Okada R, Stanley N, Tanada A, Tingle M, Alpagot T, Helms JA, Angst MS, Aghaeepour N, Gaudilliere B. Systemic Immunologic Consequences of Chronic Periodontitis. *J Dent Res.*, v.21, p.01-11, 2019.
33. Ruíz-Gutiérrez AC, Herrera-Mora MC, Zamora-Pérez AL, Meléndez-Ruíz, JL, Martínez-Rodríguez VC, Guerrero-Velázquez C. Determinación de los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva. *Rev Mex Periodontol*, v.05, n.02, p.45-50, 2014.
34. Santos JA, Graciani FS, Kassuaya CAL, Salvador JM, Cardoso CAL. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das cascas de *Vatairea macrocarpa* (Benth) Ducke em camundongos pelo modelo de pleurisia. *Rev Ciên Farm Básica Apl.*, Araraquara, v.37, n.1, 2016. Disponível em: <http://seer.fcfar.unesp.br/rcfba/index.php/rcfba/article/view/507/312>. Acesso em: 04.06.2019.
35. Valadares SNS. Composição química, toxicidade e atividade biológica de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Leguminosae) Feira de Santana: UEFS, 2017.
36. Matos FJA, Aguiar LMBA, Silva M. Gorette V. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana de *Vatairea macrocarpa* Ducke. *Acta Amazônica*, v.18, n.01, p.351-352, 1988.
37. Jesus NZT. Levantamento etnobotânico e triagem antiúlcera e antiedematogênica de plantas medicinais do distrito de Pirizal-MT: avaliação da atividade antiúlcera do extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. Cuiabá: UFMT, 2007.
38. Oliveira HC, Santos MP, Grigulo R, Lima LL, Martins DT, Lima JC, Stoppiglia LF, Lopes CF, Kawashita NH. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. *J Ethnopharmacol.*, v.115, n.03, p. 515-519, 2008.

APÊNDICE G

SUBMISSÃO À REVISTA PRINCÍPIA IFPB



Capa > Usuário > Autor > Submissões > #3267 > Avaliação

#3267 Avaliação

RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO

Submissão

Autores	Laerte Oliveira Barreto Neto
Título	Evaluation of the immunomodulatory potential of Vatairea macrocarpa (Benth.) Ducke leaf extract in periodontitis
Seção	Multidisciplinar
Editor	María Clara Meroja Revista Príncipe Hanne Bakke

Avaliação

Rodada 1

Versão para avaliação	3267-0142-1-RV.PDF 2019-08-13
Incluído	—
Última alteração	—
Arquivo enviado	Nenhum(a)

Decisão Editorial

Decisão	—
Notificar editor	Comunicação entre editor/autor Sem comentários
Versão do editor	Nenhum(a)
Versão do autor	Nenhum(a)
Transferir Versão do Autor	<input type="button" value="Escolher arquivo"/> <input type="button" value="Nenhum arquivo selecionado"/> <input type="button" value="Transferir"/>

ISSN 1517-0306



Este periódico está licenciado com uma Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial 4.0 Internacional.

Com essa licença, é permitido acessar, baixar (download), copiar, imprimir, compartilhar, reutilizar e distribuir os artigos desde que para fins não comerciais e com a citação da fonte, conferindo os devidos créditos de autoria e menção à Revista Príncipe. Ao submeter artigos à Revista Príncipe, os autores concordam em tornar seus textos legalmente disponíveis segundo essa licença. Usos comerciais do material publicado na revista só serão permitidos após autorização por escrito da revista e do(s) autor(es).

APÊNDICE H

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Immunomodulatory effects of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer on periodontitis.

Laerte Oliveira Barreto Neto¹, Angélica Maria Lucchese², Rebeca Pereira Bulhosa³,
Thais Brito de Oliveira Moura⁴, Ellen Karla Nobre dos Santos⁵, Soraya Castro Trindade⁶

¹ Dentist. PhD student in Biotechnology, State University of Feira de Santana.

² PhD in Organic Chemistry. Full Professor at Feira de Santana State University.

³ Biomedic. Master in Immunology, Federal University of Bahia.

⁴ Biologist. PhD student in Immunology, Federal University of Bahia.

⁵ Dentist. PhD in Immunology, Federal University of Bahia

⁶ PhD in Immunology. Full Professor at Feira de Santana State University.

Abstract

Background. Periodontitis is multifactorial disease, initiated by a synergistic and dysbiotic subgingival biofilm. If it is not properly treated, tooth loss may occur, generating negative repercussions on the individuals' quality of life. Considering the adjuvant role of chemical control of biofilm, medicinal plants can represent a source of effective and accessible treatment for the population.

Objectives. To evaluate the immunomodulatory potential of the leaf extract of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer on periodontitis.

Methods. A test group was composed by individuals with periodontitis (P) and a control group, with individuals without periodontitis (SP). Cytokine production in supernatants from whole blood culture was quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Findings and main conclusions. *L. alnifolia* Mart. & Schauer (LA) inhibited the production of IL-13 (p = 0.024), IL-6 (p = 0.000) and IFN-g (p = 0.000). This inhibition was maintained even when *P. gingivalis* extract was added to the culture (LA + PG), with levels still reduced compared to unstimulated cells at IL-13 (p = 0.003), IL-6 (p = 0.000) and IFN-g (p = 0.000). The extract of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer regulates the production of cytokines produced in response to the presence of *Porphyromonas gingivalis* antigens.

Keywords: Cytokines, Periodontal Diseases, Plants, Medicinal.

Introduction

Periodontitis is a multifactorial disease in which bacterial factors, environmental and host immune responses are involved⁽¹⁾. It begins with a biofilm consisting of a synergistic and dysbiotic microbial community. Some bacteria, denominated "key pathogens", are found in low amounts, but have an effect on throughout the community, being critical for the development of dysbiosis. The best example is *Porphyromonas gingivalis*⁽²⁾.

Presenting a high worldwide prevalence, periodontitis is the leading cause of dental loss in adults⁽³⁾. Due to methodological heterogeneity existing in current studies, conclusions about the incidence and global prevalence of periodontitis cannot be consolidated⁽⁴⁾. In Brazil, according to an epidemiologic survey conducted in 2010, the prevalence of periodontal disease among adults is 15,3% for "moderate to severe" and 5,8% for and "severe" condition, with significant variations between municipalities and regions. Male white adults in advanced age, on low income and schooling are more likely to develop into investigated periodontal conditions⁽⁵⁾.

In cases in which the proper treatment is not performed, tooth loss may occur. Thus, there are negative impacts over the quality of life of the individual, jeopardizing performance in daily activities. The daily routine is affected by speech difficulties, difficulties in chewing and behavior changes with implications on the self-esteem and social skills⁽⁶⁾.

Considering the high prevalence of the periodontal diseases ahead of the existence of the National Policy for Integrative and Complementary Practices in the Single Health System (PNPIC), published in the Ordinance no. 971 of 3 May 2006 and no. 1600 of 17 July 2006⁽⁷⁾, researches of new alternatives for periodontitis control may significantly impact oral health public policies.

It is well known that medicinal plants are an important therapeutic resources in the treatment of several diseases, including oral diseases(8). In a country rich in biodiversity such as Brazil, medical plants represents a potential source of effective and affordable treatment(9). In this perspective, the present study aimed to evaluate the immunomodulatory potencial of *Lippia alnifolia Mart. & Schauer* leaf extract on periodontitis.

Material and methods

Ethical aspects

The Project was approved by the Ethics Committee in Research of the State University of Feira de Santana (UEFS), presenting the opinion number 1.344.223 (2015). The consent forms obtained from the individuals who participated in the study were written in clear and accessible terms about the procedures used and their purposes.

Selection of the research participants

The sample was composed by [healthy individuals](#) who sought dental care in the outpatient department of the UEFS Dentistry course, from August 2016 to December 2018, and with at least four teeth in their mouth. The exclusion criteria assessed by anamneses and considered for this study were: history of hypertension, diabetes, autoimmune diseases, pregnancy, prior periodontal treatment, smoking habit use of antibiotic and anti-inflammatory in the previous 6 e 2 months, respectively, before the blood collection.

Individuals were divided into two groups: test group, composed of individuals with periodontitis (P), and control group, composed of individuals without periodontitis (WP).

Sample size

To evaluation of the immunomodulatory effect of *Lippia alnifolia* extract on the chronic periodontitis, was proposed an experimental study in peripheral blood cells of the participants. For the calculation of the sample size, a pilot study was performed for determination of the minimum error rate and standard deviation, for a significance level of 5% and test power of 80%. Therefore, considering the standard deviation of 1.260 pg/mL for IL-6 levels, and a minimum error rate of 950 pg/mL, the total number of participants for each group was 28. 10% were added to this total, due to possible losses. The total sample size calculated was 31 participants with periodontitis and 31 participants without periodontitis.

Researcher calibration for periodontal examination

Due to its high degree of subjectivity of oral diseases, the examiners calibration is crucial for uniformity of diagnosis⁽¹⁰⁾.

The evaluation of periodontal condition was performed by a dentist, previously trained. The results obtained during the calibration process were compared whit results obtained by a Doctor in Periodontics, considered as the gold standard.

The concordance of the clinical measures was calculated by Kappa index, obtaining an inter-examiner agreement value of 0.83 and 0.74, for the measures of depth of probing and recession, respectively.

Periodontal examination

During the periodontal examination, the bleeding upon probing index, probing depth and gingival recession/hyperplasia were measured and the insertion level values were obtained for the whole oral cavity. These observations were obtained in six different surfaces for each tooth (distobuccal, mesiobuccal, mid-buccal, distolingual, mid-lingual, mesiolingual), except for the visible plaque index which was evaluated in only four

surfaces (mesial, distal, buccal and lingual). All measurements were performed using a Williams probe and recorded on the periogram.

Periodontitis diagnosis

The diagnosis of periodontal was established by the presence of at least four teeth with at least one site with depth of probing greater than or equal to 4 mm, loss of insertion greater than or equal to 3 mm and bleeding upon probing on the same site⁽¹¹⁾.

Cell culture

Collection of 30mL of venous blood was performed of blood in heparin vacuum tubes for culture of whole blood cells.

Cultures were performed in laminar flow using 2 mL of blood from each participant onto 24-well culture plates (COSTAR, Nova Iorque, EUA). The cells were cultivated either with 0,5 µg/mL of the immunogenic extract of *P. gingivalis* ATCC 33277⁽¹²⁾, or 10 µg/mL of the *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer extract, or both stimuli, ou com ambos os estímulos, concomitantly. For the negative control, whole blood was used without stimulus, and 2.5 µg/ml of Pokeweed (PWM) was used as negative control.

Cells were grown in a greenhouse with 5% CO² at 37°C. After 48h, the cultures were collected from the wells and centrifuged in a microtubes centrifuge to obtain the supernatant, which was stored at -20°C until the analysis.

Acquisition of leaf extract of Lippia alnifolia Mart. & Schauer

The leaves of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer were collected and taken to the UEFS Laboratory of Chemistry of Natural and Bioactive Products (LAPRON), dried at room temperature and protected from light and then pulverized in a knife mill. Afterwards, the material was three consecutively extracted by maceration with methanol. Thereafter the crude extract was concentrated on rotary evaporators under reduced

pressure and at a temperature between 40° and 45°C. The solvent residues were removed by evaporation in an exhaust hood.

Protein measurement

Aliquots of leaf extract of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer were diluted in 3% methanol (Synth)/DMSO (Synth) and filtered with a sterile membrane of 0.22µm diameter to obtain the protein concentration. The protein measurement was performed using the modified Lowry technique, according to the manufacturer's instructions (DC™ ProteinAssay da Biorad, CA, USA) and the result was obtained by spectrophotometer reading.

Evaluation of cellular cytotoxicity

To evaluate the cell viability of leaf extract of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer, the blood of three participants was processed to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)⁽¹³⁾, which were cultured under the same conditions as the whole blood cell culture. The extract was applied to different wells at the following concentrations: 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL. The colorimetric test that evaluates the conversion of MTT – [3-(4,5- dimethylthiazol -2yl)-2,5- diphenyltetrazolium] bromide to formazan (Sigma, St. Louis, MI, USA) was employed following the instructions of the manufacturer, using the wavelength of 570 nm to obtain the optical density.

Evaluation of Cytokine Production

The production of cytokines IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 (Biolegend, CA, USA) and IL-1 β (Invitrogen,CA, USA) in supernatants from whole blood culture was quantified using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, according to the manufacturer's instructions.

After 48 hours of culture, in presence of PWM (2.5 µg/mL); of the antigen, extract of *P. gingivalis* (0.5 µg/mL); *Lippia alnifolia* extract (10 µg/mL) and *Lippia alnifolia*

extract (10 µg/mL) in addition to the extract of *P. gingivalis* (0.5 µg/mL) the cytokines were measured by enzyme immunoassay using commercially available kits. ELISA were performed using 96-well flat bottom adsorption polystyrene plates (COSTAR, Coornig Life Science, Tewksbury, MA, EUA). All steps were performed according to the manufacturer's instructions. After signal development with tetramethylbenzidine (TMB) and addition of stop solution (H₂SO₄2N), the optical density was determined in ELISA Reader (ELx 800 - Bio-Tek) at 450 nm.

Statistical analysis

Initially, a descriptive analysis of the clinical characteristics of the individuals was carried out to characterize the study groups. Then, the distribution of data referring to the main variables of the study was verified using the chi-square test for categorical variables or with the Kolmogorov-Smirnov test for continuous variables.

The comparisons between the stimuli were made with the Kruskal-Wallis test, and between-groups was done with the Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant if values of $p \leq 0.05$.

Results

Clinical descriptors

The concentrated extract of *Lippia alnifolia* demonstrated a protein concentration of 4.53 mg/ml. In the analysis of cellular cytotoxicity, it was observed that the cells remained viable at 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL extract concentration. The extract concentration of 10 µg/mL was chosen for the experiments.

58 individuals were selected to participate in the study, of which 17 comprised the group with periodontitis (P), and 41 the one without periodontitis (WP). The mean standard deviation of age was 43,18±11,01 for P group, and 38,44±12,80 for WP group.

The evaluation of the clinical data investigated, demonstrated in table 01, showed that both groups were homogeneous regarding to age ($p=0,165$) and number of teeth present in the mouth ($p=0,450$). Nevertheless, a statistically significant difference was observed between the groups regarding to gender ($p=0,012$). As for the periodontal clinical descriptors, there was a statistically significant difference in the percentage of sites with SS ($p=0,001$), probing depth $\geq 4\text{mm}$ ($p=0,000$) and clinical attachment level (CAL) $\geq 3\text{mm}$ ($p=0,000$), ratifying the worst condition in the group with the diagnosis of periodontitis.

Cytokines

We could notice that there was no statistically significant difference between IL- 1β , IL-13, IFN- γ , IL-6 and IL-10 levels in the culture supernatant in either of the two groups. There wasn't sufficient sample in the P group for comparison in IL-17 levels.

Observing the production of cytokines by human cells independently of the periodontal condition (figure 1) it could be verify that the cells cultured with the extract of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) produced higher levels of IL- 1β ($p=0,000$), IL-6 ($p=0,000$), IFN- γ ($p=0,000$), IL-10 ($p=0,004$) and IL-17 ($p=0,006$) than the non-stimulated cells (B), whereas *L. alnifolia* extract (LA) inhibited IL-13 ($p=0,024$), IL-6 ($p=0,000$) and IFN-g ($p=0,000$) production. This inhibition was remained even with the addition of the *P. gingivalis* extract to the culture (LA + PG), with still reduced levels of IL-13 ($p=0,003$), IL-6 ($p=0,000$) and IFN-g ($p=0,000$) compared to unstimulated cells. Cells cultured with *P. gingivalis* extract induced higher concentrations of IL- 1β ($p=0,000$), IL-13 ($p=0,002$), IL-6 ($p=0,000$), IFN-g ($p=0,003$), IL-10 ($p=0,001$) and IL-17 ($p=0,003$) than those that cultivated only with *L. alnifolia* extract. Whereas, when compared with concentrations induced by *P. gingivalis* extract alone, the presence of the *L. alnifolia* extract in conjunction with the *P. gingivalis* extract decreased IL- 1β

(p=0,000), IL-13 (p=0,000), IL-6 (p=0,000), IFN-g (p=0,000), IL-10 (p=0,001) and IL-17 (p=0,003) production. The combination of the extracts resulted in IL-1b levels greater than those observed with the use of the *L. alnifolia* extract separately.

Discussion

According to the findings of this study, the *L. alnifolia* Mart. & Schauer extract is able to inhibit the *in vitro* production of IL-13 and IFN- γ by human peripheral blood cells. Furthermore, the *L. alnifolia* Mart. & Schauer extract seem to promote downregulation of IL-1 β , IL-13, IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-17 production, in opposition to the antigen stimulation by the extract of *Porphyromonas gingivalis*, a key pathogen in periodontal dysbiosis⁽¹⁴⁾, related to the onset and progression of periodontitis⁽¹⁵⁾.

IL-1 β and IL-6 are proinflammatory cytokines of innate immunity found in high amounts in periodontal tissues and in the gingival fluid of sites with periodontitis^(16,17). They act in the recruitment of leukocytes to the site of infection, stimulation of the release of other inflammatory mediators, and unbalance the RANK-RANKL-OPG axis^(18,19), leading to bone resorption. Several antigens of *P. gingivalis* have demonstrated the capacity to stimulate IL-1 β and IL-6 production, which may partially explain the pathogen-host interaction in the pathogenesis of the disease. This reveals the potential of the *Lippia alnifolia* Mart & Schauer extract in the control of periodontitis.

Although considered an immunoregulatory cytokine, IL-10 is also related to the response to infection by *Porphyromonas gingivalis*⁽²⁰⁾. It is known that the production of this cytokine is triggered to regulate the production of IFN- γ , characteristic of Th1 response⁽²¹⁾, as well as may influence the production of Th2 profile cytokines, such as IL-4 and IL-13⁽²²⁾. As *Porphyromonas gingivalis* is a facultative intracellular pathogen, thus surviving both inside and outside the cell⁽²³⁾, can trigger different types of response

in the host. Consequently, there will be a greater or lesser tissue destruction depending on the combination of mediators produced. The possibility of the *Lippia alnifolia* extract acting on the inhibition of cytokines of several profiles supports its use in the management of periodontal inflammation.

Regarding IL-17, cytokine signature of the Th17 profile, it is characterized by an intense neutrophilic response⁽²⁴⁾. It is worth noting that neutrophils are the most described cells in the pathogenesis of periodontitis, whose defective functionality and mobility are strongly related to the pathogenesis of the disease⁽²⁵⁾. It is also suggested that IL-17 is involved in the bone resorption of periodontitis⁽²⁶⁾. These considerations may suggest that the TH17 profile can be induced in periodontitis and that its regulation is necessary for the return to tissue homeostasis.

The plants of the genus *Lippia* are shrubs belonging to the family Verbenaceae⁽²⁷⁾, and are used as antiseptics, as well as in the treatment of infectious diseases⁽²⁸⁾, including disorders of the oral cavity⁽²⁹⁾. *Lippia alnifolia* has antiseptic and antimicrobial properties⁽²⁸⁾, antitussive and expectorant⁽³⁰⁾, however studies that have evaluated its biological properties continue to be scarce, mainly related to inflammatory and infectious conditions of the mouth.

Thus, important aspects about the administration of this extract, such as the vehicle, the ideal concentration to be employed and its side effects are not yet known. In this study, the cytotoxicity of the extract at 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL concentrations was tested *in vitro*, demonstrating low aggressiveness to host cells. The concentration of 10µg / mL was chosen for antigenic stimulation and cytokine concentration determination, as it was also tested in a previous pilot study with *Artemia salina* (data not show), being the highest non-cytotoxic rate found. In addition, lower concentrations could not guarantee the antigenic stimulation needed for the evaluations.

It is important to note that the stimulation of the peripheral blood cells was performed *in vitro*, which makes it difficult to extrapolate the results. Another important limitation was the small sample size, which may have interfered with the power of the analysis and, consequently, the results of the comparisons intergroup.

However, it is important to note that there were no studies that investigated the regulation of the production of cytokines by *L. alnifolia* extract, mainly in the context of periodontal infection by *Porphyromonas gingivalis*. In this regard, efforts should be made to investigate the biological properties of this extract *in vivo* to determine whether this extract may be a tool in the adjuvant treatment of periodontitis.

Conclusion

The *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer extract regulates the production of cytokines produced in response to the presence of *Porphyromonas gingivalis* antigens.

References

1. Corrêa, JD, Calderaro DC, Ferreira GA, Mendonça SM, Fernandes GR, Xiao E, Teixeira AL, Leys EJ, Graves DT, Silva TA. Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: association with periodontal status. *Microbiome*,2017; Mar 20;5(1):34. DOI: 10.1186/s40168-017-0252-z
2. Hajishengallis G; Lamont, RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol*. 2014 Fev 44(2):328-38. DOI: 10.1002/eji.201344202.
3. Vieira SPL, Lima ML, Tavares SJS, Guimarães MV. Inter-relação entre periodontite crônica e parto prematuro / baixo peso ao nascer – revisão de literatura.

Revista Bahiana de Odontologia. 2018; Mar 9(1):1-11. DOI: 10.17267/2238-2720revbahianaodonto.v9i1.1719.

4. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol* 2017; Mar 44 (Suppl.18): S94–S105. DOI: 10.1111/jcpe.12677.

5. Vettore MV, Marques RAA, Peres MA. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrasil 2010: abordagem multinível. *Rev Saúde Pública* 2013; Dez 47(Supl 3):29-39. DOI:10.1590/S0034-8910.2013047004422.

6. Passos-Soares JS, Gomes-Filho IS, Santos LPS, Santos PNP, Silva, ICO, Balinha ISCE, Trindade SC. Impacto da perda dentária na qualidade de vida relacionada a saúde bucal de adultos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 2018; 17(2): 158-163. DOI: <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v17i2.24734>.

7. Brasil 2006. Presidência da República. Decreto no. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006.

8. Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2006. Jul/Set 42(3), 395-404. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000300008>.

9. Juiz, P JL; Alves, RJC; Barros, TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Rev. bras. farmacogn* 2010; Jan./Mar 20(1): 134-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100026>.

10. Oliveira AGRC, Unfer B, Costa ICC, Arcieri RM, Guimarães LOC, Saliba NA. Levantamentos epidemiológicos em saúde bucal: análise da metodologia proposta pela

Organização Mundial da Saúde. Rev. bras. epidemiol. 1998; Ago. 1(2), 177-189. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X1998000200008>.

11. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, Dos Santos CA, Soledade KR, Magalhães MA, Azevedo AC, Trindade SC, Vianna MI, Passos JS, Cerqueira EM. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. J Clin Periodontol. 2007 Nov;34(11):957-63. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2007.01141.x

12. Trindade SC, Gomes-Filho IS, Meyer RJ, Vale VC, Pugliese L, Freire SM. Serum antibody levels against Porphyromonas gingivalis extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. J Int Acad Periodontol. 2008; Abr 10(2):50-8.

13. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by Porphyromonas gingivalis HmuY in humans. J Periodontal Res. 2011, Fev 47(1):27-32. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2011.01401.x.

14. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, Darveau RP, Curtis MA. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. Cell Host & Microbe 2011; Nov ;10(5):497-506. DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.006.

15. Juiz, PJJ, Silva, F, Campos MJA, Uetanabaro APT, Campos RJ, Alves, AML. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Ocimum americanum e Ocimum basilicum sobre periodontopatógenos. Braz J Periodontol 2016; Dez. 26(04).

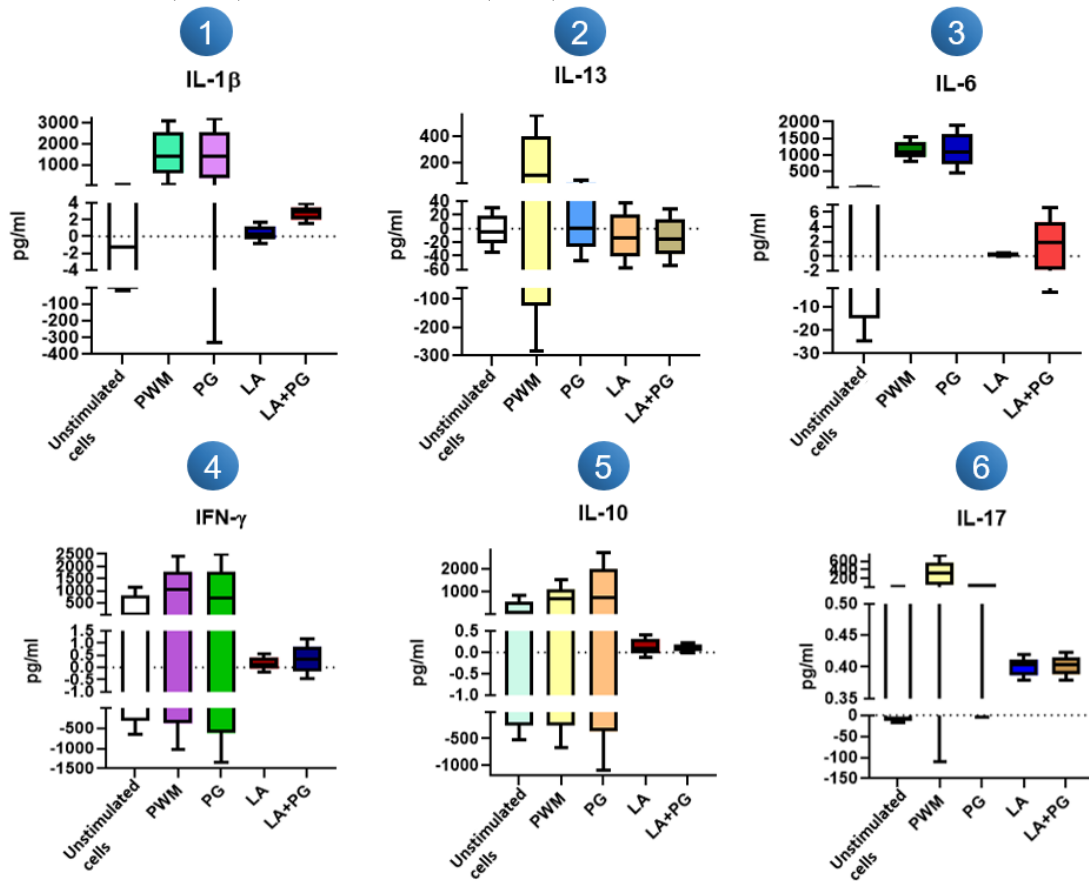
16. Menegat J, Brito F, Barros F, Pedreira R, Fischer RG, Figueiredo CMS. Níveis elevados de IL-6 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica e retrocolite ulcerativa idiopática. *Periodontia* 2010; 20(2):61-68.
17. Lima V, Bezerra MM, Leitão RFDC, Brito GADC, Rocha, FACD, Ribeiro RDA. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da Periodontite–Papel de Moduladores Farmacológicos. *R Periodontia* 2008; 18(3): 7-19.
18. Singh A, Mehdi AA, Srivastava RN, Verma NS. Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2012; Mai 2(2):75-81. DOI 10.4103/2229-5151.97271.
19. Kwan TS, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; Feb 15(1):49-60.
20. Liu Z, Hu Y, Yu P, Lin M, Huang G, Kawai T, Taubman M, Wang Z, Xiaozhe H. Toll-like receptor agonists *Porphyromonas gingivalis* LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells. *J Appl Oral Sci* 2017; 25(1):90-100. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-77572016-0277>.
22. Herrero C1, Hu X, Li WP, Samuels S, Sharif MN, Kotenko S, Ivashkiv LB. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN- γ . *J Immunol.* 2003; Nov 15;171(10):5034-41. DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.5034.
23. Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology* 2011; Jul 216(7):811-20. DOI: 10.1016/j.imbio.2010
24. Li L, Michel R, Cohen J, Decarlo A, Kozarov E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.* 2008; Feb 6(8):26. DOI: 10.1186/1471-2180-8-26.

25. Normaton M, Marti LC. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. *Einstein* 2013; Apr-Jun 11(2):237-46.
26. Gaudilliere DK, Culos A, Djebali K, Tsai AS, Ganio EA, Choi WM, Han X, Maghaireh A, Choisy B, Baca Q, Einhaus JF, Hedou JJ, Bertrand B, Ando K, Fallahzadeh R, Ghaemi MS, Okada R, Stanley N, Tanada A, Tingle M, Alpagot T, Helms JA, Angst MS, Aghaeepour N, Gaudilliere B. Systemic Immunologic Consequences of Chronic Periodontitis. *J Dent Res.* 2019; Jun 21: 1-11. DOI: 10.1177/0022034519857714.
27. Ruíz-Gutiérrez AC, Herrera-Mora MC, Zamora-Pérez AL, Meléndez-Ruíz, JL, Martínez-Rodríguez VC, Guerrero-Velázquez C. Determinación de los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva. *Rev Mex Periodontol* 2014; 5(2): 46-50.
28. CNCFlora. *Lippia alnifolia* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia_alnifolia>. Acesso em 12 julho 2019.
29. Pinto CP, Rodrigues VD, Pinto FP, Pinto RP, Uetanabaro AP, Pinheiro CS, Gadea SF, Silva TR, Lucchese AM Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 1-5 DOI: 10.1155/2013/614501.
30. Oliveira TB, Souza JS, Gomes-Filho IS, Moura D, Pereira-Filho JN, Trindade SC. uso da *Lippia* no tratamento das doenças periodontais. *J Dent Pub H.* 2018; 9(3):227-237.
31. VILELA, DAD. Avaliação da atividade espasmolítica e antiasmática do óleo essencial de *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer (VERBENACEAE). [monograph] [internet]. Petrolina: Universidade Federal do Vale do São Francisco; 2018. [Acesso em 10 Jul 2019]. Disponível em:

Table 1: Clinical characteristics of the groups with periodontitis (P) and without periodontitis (WP), diagnosed according to the criteria of Gomes-Filho et al. (2007).

CLINICAL PARAMETERS	CLASSIFICATION OF PERIODONTITIS Gomes-Filho et al, 2007				
	With periodontitis (P)		Without periodontitis (WP)		P
	N	%	N	%	
Gender					
Male	10	58,8	10	24,4	0,012
Female	07	65,1	31	66,7	
Total	17	100	41	100	
Age	N=17		N= 41		
Mean ±SD	43,18±11,01		38,44±12,80		0,165
Number of teeth	N=17		N= 41		
Median (IQ)	22,00 (19,00-26,00)		24,00 (19,50-27,00)		0,450
% sites with bleeding	N=17		N= 41		
Median (IQ)	45,65 (28,55-69,77)		9,52 (3,66-32,40)		0,001
% sites with probing depth ≥4mm	N=17		N= 41		
Median (IQ)	16,66 (8,27-38,48)		0,00 (0,00-3,77)		0,000
% sites with CAL ≥ 3mm	N=17		N= 41		
Median (IQ)	51,85 (15,06-76,05)		7,63 (2,15-18,37)		0,000

Figure 1: Concentration of cytokines (pg/mL) in culture supernatant of human peripheral blood cells cultured without antigenic stimulation (Unstimulated Cells), with Pokeweed mitogen (PWM), with extract of *P. gingivalis* (PG), with extract of *Lippia alnifolia* (LA) and with both extracts concomitantly (LA + PG). A: interleukin 1 β (IL-1 β); B: interleukin 13 (IL-13); C: interleukin 6 (IL-6); D: interferon γ (IFN- γ); E: interleukin 10 (IL-10) and F: interleukin 17 (IL-17).



APÊNDICE I

SUBMISSÃO À REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



Immunomodulatory effects of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer on periodontitis

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	MIOC-2019-0276
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	29-Jul-2019
Complete List of Authors:	Oliveira Barreto Neto, Laerte; UEFS, Lucchese, Angélica; Universidade Estadual de Feira de Santana, DEXA; Bulhosa, Rebeca; UFBA BRITO, THAIS Santos, Eilen; UFBA Trindade, Soraya ; Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Saúde
Keyword:	Cytokines, Periodontal Diseases, Plants, Medicinal
Theme:	Immunology

SCHOLARONE™
Manuscripts