



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

Inês Filipa Jesus Fernandes

**Avaliação de péptidos no controlo antiplaca
- *Revisão Sistemática e Projeto de Investigação* -**

Orientador:

Professor Doutor Sérgio Miguel Andrade de Matos

Coorientador:

Dr. Daniel Luís Ramalho Abegão

Coimbra, 2017

“Tudo tem que ser uma criança para poder crescer.”

Avaliação de péptidos no controlo antiplaca

- Revisão Sistemática e Projeto de Investigação -

Fernandes, Inês¹; Matos, Sérgio²; Abegão, Daniel³

- 1) Aluna de Mestrado Integrado em Medicina Dentária, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- 2) Professor Doutor Auxiliar FMUC, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- 3) Mestre em Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra;

Endereço:

Área da Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas
3000-075 Coimbra
Telefone: +351 239484183 Fax: +351 2394029104

Endereço de e-mail: ines_jfernandes@hotmail.com

Sumário

- I. Introdução
- II. Revisão Sistemática
 - A. Materiais e Métodos
 - B. Resultados
- III. Projeto de Investigação
 - A. Materiais e Métodos
 - B. Resultados
- IV. Discussão
- V. Conclusão
- VI. Bibliografia
- VII. Anexos
- VIII. Agradecimentos
- IX. Índice

Resumo

Introdução: A cavidade oral caracteriza-se por ser um ambiente que suporta o desenvolvimento de microbiotas que aderem e se coagregam estrutural e tridimensionalmente formando o que se designa de biofilme. O controlo deste biofilme é crucial para a prevenção e tratamento da gengivite e doenças periodontais. A clorhexidina é o antimicrobiano que apresenta mais evidência como agente antiplaca. Neste contexto é importante reconhecer o conceito de eficácia comparativa dos vários agentes na ação do controlo da placa bacteriana e gengivite. Novas metas devem ser ultrapassadas com base na eficácia dos colutórios existentes, a fim de alcançar a diminuição da adesão da placa bacteriana.

Objetivos: O presente estudo tem como objetivo a realização de uma revisão sistemática e de um projeto de investigação. A revisão sistemática pretende realizar uma avaliação do estado da arte sobre a eficácia comparativa da clorhexidina com outros antimicrobianos, enquanto agente preventivo da formação de placa bacteriana. O projeto de investigação pretende apresentar o desenho de uma metodologia experimental para avaliação de um novo produto composto por péptidos sintéticos, complementares a segmentos específicos das proteínas-alvo da saliva e potencialmente bloqueadores da formação de placa bacteriana.

Materiais e Métodos: Foram utilizadas três bases de dados eletrónicas: Biblioteca Nacional de Medicina, Washington, DC (MEDLINE-PubMed), Cochrane-CENTRAL e LILACS. A equação da pesquisa foi efetuada com os seguintes *Mesh Terms* “gingivitis”, “dental plaque”, “chlorhexidine” e “mouthwashes” interligando com os conectores booleanos “AND” e “OR”. A pesquisa foi feita segundo uma questão PICOT, obedecendo a critérios de inclusão e de exclusão. Relativamente ao projeto de investigação destacam-se a caracterização da saliva, os péptidos previamente sintetizados e a interação destes com culturas bacterianas de *Streptococcus mutans*.

Resultados: Após pesquisa nas bases de dados obtiveram-se 385 artigos, dos quais 25 para leitura integral. Foram incluídas 14 publicações (5 revisões sistemáticas e 9 meta-análises). A clorhexidina é o antimicrobiano com melhor eficácia para os índices de placa e de inflamação gengival. Nos estudos anti-adesão dos péptidos, apesar das limitações inerentes, verificou-se uma aparente tendência em algumas concentrações para a inibição da criação de aglomerados bacterianos.

Conclusões: A revisão sistemática concluiu que a clorhexidina continua a ser o *gold standard* para o controlo químico do biofilme. Os óleos essenciais apresentam menor eficácia que a CHX em estudos de curta duração, sendo mais indicados a longo prazo. Os trabalhos *in vitro* revelaram algumas limitações que pretendem ser ultrapassadas em estudos futuros.

Palavra-chave: *gingivite, placa dentária, clorhexidina e colutórios*

Abstract

Introduction: The oral cavity is characterized by an environment that supports the development of microbiotes that adhere and coaggregate structurally and three-dimensionally forming what is called a biofilm. The control of this biofilm is crucial for the prevention and treatment of gingivitis and periodontal diseases. Chlorhexidine is the antimicrobial agent with the most evidence as an anti-plaque agent. In this context, it is important to recognize the concept of comparative effectiveness of several agents in bacterial plaque and gingivitis control. New targets should be provided based on the efficacy of mouthwashes in order to decrease plaque adhesion.

Objectives: The aim of this work is to perform a systematic review and a research project. The systematic review intends to evaluate the state of the art on a comparative efficacy of chlorhexidine with other antimicrobial agents, as preventive agents for bacterial plaque formation. The research project intends the development of an experimental methodology to evaluate a new product composed of synthetic peptides, complementary to target salivary proteins and blocking plaque formation.

Materials and Methods: Three electronic databases were used: National Library of Medicine, Washington, DC (MEDLINE-PubMed), Cochrane-CENTRAL and LILACS. The research equation was carried out with the following Mesh Terms "gingivitis", "dental plaque", "chlorhexidine" and "mouthwashes", connecting with the boolean connectors "AND" and "OR". The search was established according to a PICOT question, following inclusion and exclusion criteria. Regarding the research project, the characterization of saliva, previously synthesized peptides and the interaction of these with bacterial cultures of *Streptococcus mutans* should be highlighted.

Results: After searching the databases, we obtained 385 articles, 25 of which were for integral reading. A total of 14 publications (5 systematic reviews and 9 meta-analyzes) were included. Chlorhexidine is the most effective antimicrobial agent for plaque indices and gingival inflammation. The anti-adhesion peptide studies revealed an apparent tendency in some concentrations for an inhibition of bacterial aggregates.

Conclusions: The systematic review concluded that chlorhexidine is still the gold standard for biofilm chemical control. Essential oils have less efficacy than chlorhexidine in short term studies, but improve in long term periods. *In vitro* evaluation revealed some limitations that are intended to be overcome in future studies.

Keywords: “gingivitis”, “dental plaque”, “chlorhexidine” e “mouthwashes”

I. Introdução

1. Formação do biofilme

O desenvolvimento de microbiotas de matriz incorporada que se agregam estrutural e tridimensionalmente entre si e às superfícies formam o que se designa de biofilme.¹ A placa dentária define-se como uma comunidade microbótica complexa que se traduz num biofilme aderido à superfície dentária através de adesinas e matriz de polissacarídeos.² Os *Streptococcus* representam cerca de 20% do total de bactérias salivares e são uma das espécies pioneiras na ligação à película adquirida.^{1,3}

A formação da placa é um processo em que complexos proteicos, sinalização celular e metabolismo microbiano são fatores envolvidos na cascata de crescimento bacteriano.⁴ Um número considerável de bactérias patogénicas desenvolveram diversas estratégias de adquirir na sua superfície moléculas adesivas – as designadas adesinas – que permitem a interação com o hospedeiro e posterior adesão. Para além de terem a capacidade de desenvolver mecanismos que lhes permitem aderir ao esmalte, possuem uma capacidade de interação bacteriana, que desencadeia uma coagregação traduzindo-se numa multiplicação do biofilme supra e sub gengival.^{1,5}

Assim, é de grande relevância entender como este fenómeno bacteriano se desenrola. Inicia-se com a formação de uma película constituída, maioritariamente, por componentes salivares. Os colonizadores primários aderem à superfície do dente através de interações específicas entre as adesinas bacterianas e a superfícies dos recetores. De notar que, as espécies microbianas, raramente colonizam em esmalte limpo, pois mesmo após a higienização, em segundos, a superfície dentária está revestida por moléculas e proteínas resultantes da saliva e do sulco crevicular. Pelo que, as bactérias interagem diretamente com a película salivar e não com uma superfície dentária rigorosamente limpa.^{1,5} Sendo esta uma das problemáticas que conduz ao objetivo da realização do projeto de investigação do presente trabalho. Segundo Boss *et al.*, as primeiras bactérias colonizadoras têm a capacidade de aderirem à película através de ligações reversíveis, de forças fracas e de longo alcance. Os colonizadores pioneiros são *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*.^{3,6}

Posteriormente a esta colonização primária, há uma interação entre moléculas específicas da superfície celular microbiana com os recetores presentes na película que são caracterizadas por ligações permanentes. O fenómeno de co-adesão permite que outros colonizadores secundários (*Actinomyces spp.*, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Haemophilus spp.* e *Capnocytophaga spp.*)⁶ adiram aos recetores de bactérias já ligadas, conduzindo ao aumento da diversidade microbiana (Fig. 1). Há, assim, um aumento da

biomassa bacteriana pela multiplicação das células aderidas e o destacamento destas para promover a colonização noutra lugar da cavidade oral.^{1,3} Ainda, podemos caracterizar os colonizadores tardios, que dependem das modificações desencadeadas pelos colonizadores primários e secundários, que incluem bactérias anaeróbicas estritas, como as do género *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Actinobacillus* e *Treponema*⁶. Segundo Kubiwa e Lamont, o único mecanismo responsável pela capacidade de formação de biofilmes subgingivais é a acomodação inter-espécies que vivem em comunidade microbióticas.⁵

É importante reconhecer que existe um mecanismo específico pelo qual as bactérias orais são capazes de interagir umas com as outras, coagregarem-se e estabelecerem padrões que lhes permitem desenvolver uma sinergia nutricional que leva à maturação do biofilme e ao seu crescimento celular através de cooperações metabólicas entre uma enorme variedade de espécies microbianas.⁷ Este mecanismo é designado de *quorum sensing* (QS).^{1,7} O *quorum sensing* compreende processos através dos quais as células bacterianas comunicam entre si, libertando e destacando sinais celulares, respondendo através de pequenas moléculas que se difundem. Esta capacidade pode também justificar a virulência e o potencial patogénico de determinadas espécies.¹

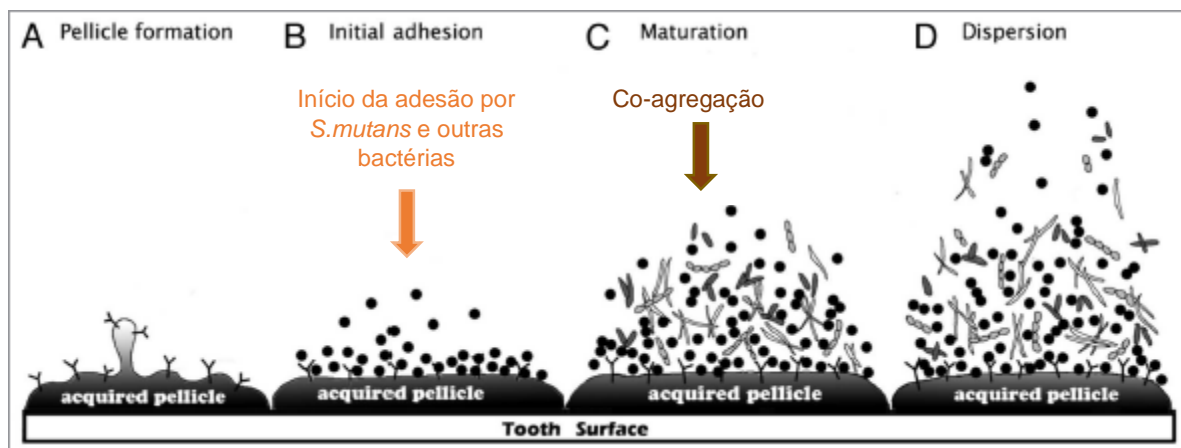


Fig.1. Formação do biofilme. A – Formação da película adquirida; B – Adesão inicial pelos colonizadores primários como *Streptococcus mutans*; C – Fenómeno de co-agregação e consequente maturação do biofilme; D – Dispersão das colónias bacterianas para outros locais da cavidade oral. Imagem adaptada de ⁸

2. Produtos orais terapêuticos e preventivos

2.1. Agentes terapêuticos e preventivos

Numa perspectiva histórica, a prática dos colutórios por humanos é reportada há mais de 2000 anos e este início é atribuído à civilização chinesa.^{9,10} Hipócrates, fundador da medicina moderna, recomendava uma mistura de sal, alume e vinagre para o tratamento de doenças das gengivas.¹¹ Na época romana, eram obcecados pela higiene oral, no sentido do combate à halitose. Plantas como o nardo, verbera, meimendo e mirra eram utilizadas para perfumar o hálito. A boca era considerada o vestíbulo da alma.¹²

Atualmente, sabe-se que o biofilme é considerado o fator etiológico da gengivite e este facto providencia uma justificação para o uso de colutórios antimicrobianos e sua investigação.⁹ Do ponto de vista terapêutico, apesar da panóplia de métodos mecânicos disponíveis, há elevada prevalência de inflamação gengival na população mundial.⁴ As limitações de destreza manual dos doentes e a complexidade anatômica dentária, condicionam a eficácia do controlo mecânico da placa bacteriana; assim, estes agentes terapêuticos têm sido desenvolvidos como complemento aos métodos de referência.^{1,9}

Neste contexto é importante reconhecer o conceito de eficácia comparativa dos vários agentes na ação do controlo da placa bacteriana e gengivite durante uma utilização clínica de curto e longo prazo. Os mecanismos de ação dos antissépticos podem ser alcançados quantitativa e/ou qualitativamente, segundo atuação em quatro vertentes: 1 - prevenção da adesão bacteriana na interface dentária, via película adquirida; 2 - antimicrobiano; 3 - alteração da patogenicidade do biofilme; 4 - eliminação do biofilme já formado. Para tal, é necessário ter presente que os colutórios podem ser constituídos por vários agentes ativos: antibióticos, enzimas, aminoálcoois como o delmopinol (DEL), detergentes, agentes oxigenantes, sais de metais e fluoretos, óleos essenciais (OE), triclosan (TRI), clorhexidina (CHX), cetilpiridínio (CPC), hexitidina (HEX), entre outros.¹

A clorhexidina, atualmente considerada o *gold standard*, é uma bisbiguanida catiónica que tem um amplo espectro de ação, atuando como um bactericida e bacteriostático.⁹ É o antimicrobiano que apresenta maior evidência como agente antiplaca, sendo usado frequentemente em concentrações de 0,12% e 0,2% e com uma substantividade (tempo de permanência na cavidade oral) entre 8 e 12h, revelando-se, por isso, o antisséptico com maior poder de ação disponível.^{9,13,14,15}

A clorhexidina é caracterizada por moléculas simétricas com dois anéis clorofenólicos e dois grupos biguanidas ligados por uma ponte central de hexametileno.¹ Possui um amplo espectro de ação, abrangendo bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e alguns vírus.^{1,16} Apresenta um efeito antimicrobiano que é dependente da dose, ou seja, a

reduzidas doses a CHX aumenta a permeabilidade da membrana plasmática e atua como bacteriostático e a altas doses, induz a precipitação de proteínas citoplasmáticas e promove a morte celular apresentando assim um efeito bactericida.¹⁶ Para além deste efeito antimicrobiano, apresenta um efeito inibitório da placa pois, adere à superfície do dente e interfere com a formação do biofilme.¹ Isto é justificado, devido à sua natureza catiónica, que permite que adsorva compostos aniônicos como as glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme, como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película salivar e macromolécula presentes na mucosa oral.¹⁶

Considera-se que o digluconato de CHX é seguro, estável e eficaz na prevenção e controle da formação de placa, inibindo a formação da placa e reduzindo o desenvolvimento da gengivite.^{1,15} A evidência sugere que não existe diferença na inibição da placa se os indivíduos bochecharem por 15, 30 ou 60 segundos com 0,2% de diglucanato de CHX. A literatura, refere também que, a diminuição da concentração de bochechos com CHX de 0.2% para 0.12% aumentando, respetivamente, o volume de 10 para 15 ml traduz-se nos mesmo efeitos anti-placa.¹⁰ No entanto, vários são os efeitos adversos citados na literatura associado ao seu uso prolongado, sendo que o mais predominante e referido é a pigmentação dos dentes e língua; porém são também descritos outros, tais como, alterações do paladar (gosto metálico), erosão das mucosas, reações de hipersensibilidade, tumefação da parótida e aumento da formação de cálculos.^{1,14} Como a molécula de CHX é mal absorvida pelo trato intestinal, carece de toxicidade sistémica; além disso, não apresenta resistência bacteriana nem alterações teratogénicas por uso prolongado.⁹

Neste sentido, surge a necessidade de introduzir novas formulações que acompanhem os resultados da clorhexidina, mas que possibilitem uma alternativa com um mecanismo de ação sem efeitos adversos a longo prazo, obtendo um impacto a nível mundial significativo e podendo alcançar uma elevada melhoria na saúde oral.

Relativamente à classificação das formulações, esta não é unânime, pelo que, segundo Lang e Newman (1997), podem ser agrupadas tendo por base as características das suas propriedades. Assim, podemos ter quatro categorizações: agentes antimicrobianos, agentes inibidores de placa, os agentes antiplaca e por fim, os agentes anti-gengivite.¹

Os agentes antimicrobianos caracterizam-se por propriedades bacteriostáticas e bactericidas, como a CHX; os agentes inibidores de placa promovem uma redução da placa que pode ser suficiente ou não para evitar o desenvolvimento de gengivite; os agentes anti-placa atingem efeitos eficazes na sua redução, promovendo benefícios a nível da inflamação gengival e na redução de lesões de cáries e, os agentes anti-gengivite, que atuam na redução da inflamação gengival, afetando simultaneamente a placa dentária.¹ Esta é a classificação mais aceite a nível Europeu. Por outro lado, a literatura apresenta uma outra categorização, baseada numa vertente mais pedagógica e mais simplificada. Assim, segundo John

M.Moran¹⁰ podemos incluir no grupo A os agentes que atuam como antiplaca, que por definição, são agentes ativos que inibem a formação da placa e, conseqüentemente, previnem a gengivite. Dentro deste grupo apresentam-se a clorhexidina, cloreto de sódio acidificado, salifluor e delmopinol. No grupo B estão incluídos o cetilpiridínio e o triclosan que são mais direcionados como adjuvantes a métodos mecânicos, como os métodos de escovagem, denominando-se como inibidores de placa. E, por fim, o grupo C que representa colutórios com baixo ou nenhum grau de efeito antiplaca e numa vertente mais cosmética, como por exemplo, o combate à halitose, como os extratos de *sanguinaire*, agentes oxigenantes e colutórios que contêm hexitidina.¹⁰ No entanto, alguns estudos isolados equivalem a eficácia da clorhexidina à hexitidina, assim como acontece com outros agentes ativos, pelo que esta classificação pode ser alvo de adaptações.¹⁰

No intuito de sistematizar as várias formulações existentes e respetivos mecanismos de ação é apresentado, de seguida, um quadro resumo (Tabela I).

Tabela I – Quadro resumo dos principais antissépticos orais

Grupo	Agente ativo	Ação	Produto
Antibióticos	Penicilina, tetraciclina, vancomicina, metranidazol	Efeito antiplaca limitado.	Não são recomendados.
Enzimas	Dextranase, mutases, proteases, lipases	Interrupção do biofilme.	Não são recomendadas.
	Glucose oxidase e amiloglucosidase	Melhoram defesas do hospedeiro.	Evidência limitada.
Amino-alcoois	Delmopinol	Inibição ou rutura do biofilme	Colutório (Decapinol®).
Detergentes	Laurilsulfato de sódio	Efeito antimicrobiano e antiplaca limitado.	Presente em pastas dentífricas e colutórios, mas não como agente isolado.
Agentes oxigenantes	Peroxiborato de sódio, peroxicarbonato e o peróxido de hidrogénio	Efeito antimicrobiano através da libertação de oxigénio.	Peróxido de hidrogénio único com estudos a longo prazo (Rembrant®)
Sais de Metais	Sais de zinco (lactato de zinco, citrato de zinco, sulfato de zinco e cloreto de zinco)	Como agentes isolados têm efeito limitado, mas quando combinados com outros agentes ativos melhoram a substantividade.	As combinações mais comumente utilizadas são com a clorhexidina e CPC.
Fluoreto estanoso (SnF₂)	Fluoreto estanoso com fluoreto de amina	Redução de lesões de cáries e efeito antimicrobiano.	SnF ₂ é difícil de formular em colutórios (Meridol®)
	Fluoreto de sódio e monofluorofosfato de sódio	Redução de lesões de cáries.	Pastas dentífricas
Extracto de Sanguinarina	Alcalóide obtido da planta <i>Sanguinaria Canadensis</i>	Reduzida capacidade bactericida <i>in vitro</i> . Estudos clínicos contraditórios.	Pastas dentífricas (Colgate-Palmolive®; Paradontax®).

Óleos essenciais	Eucaliptol (0,092%), mentol (0,042%), salicilato de metilo (0,060%), timol (0,064%), e álcool (26,9%)	Efeito antimicrobiano e antiplaca.	Elixir (Listerine®).
Triclosan	Composto aromático clorado não iônico que possui grupos representativos de éteres e fenóis.	Efeito antimicrobiano e antifúngico.	Combinado com sulfato de zinco ou com um copolímero. Pastas dentífricas (Colgate Total®) ou colutórios.
Bisbiguanida	Digluconato de clorhexidina	Efeito antiplaca e antimicrobiano.	Pastas dentífricas (Elgydium®), géis (Elugel®) elixires (Eludril®) ou colutórios (Bexident®)
Compostos de amónio quaternário	Cloreto de cetilpiridínio (CPC)	Efeito antimicrobiano.	Colutórios (Cepacol®) ou em associação com CHX (Paroex®)
Hexetidina	Derivados da pirimidina	Efeito antimicrobiano, mas com baixa retenção oral.	Colutórios (Hexalen®, Hextril®)
Iodeto de povidona	Iodeto combinado com um polímero sintético de povidona	Antibacteriano.	Soluções orais (Betadine®, Perimed®)
Outros produtos	Cloreto de sódio acidificado	Sugere ter atividade similar à CHX.	-
	Dióxido de Cloro	Utilização contra halitose.	-
	Salifluor	Antimicrobiano.	-
	Produtos herbáceos	Limitada evidência.	-
Abordagens futuras	Inibição de transcrição de genes	Identificar genes envolvidos na formação dos biofilmes e inibi-los.	-
	Probióticos	Diminuição de espécies patogénicas.	-
	Sinalização molecular	Inibição sistema quorum (<i>quorum-sensing systems</i>).	-

3. Métodos de avaliação da eficácia das formulações

Os produtos de aplicação oral neste âmbito têm que ser validados a nível de estudos *in vitro*, *ex vivo* e estudos em humanos. Neste sentido, para avaliar a atividade antiplaca de compostos químicos existem fases consecutivas a serem realizadas antes de chegar aos ensaios clínicos randomizados, como estabelecido pela *American Dental Association (ADA)*.¹

Assim, seguindo uma linha temporal, iniciam-se os estudos *in vitro*. Estes estudos baseiam-se na medição da concentração mínima inibitória (CIM) e na concentração

bactericida mínima (MBC) contra as espécies bacterianas a serem estudadas. Logicamente, estes resultados são limitados pois, a forma padrão em que estes estudos são realizados não mimetiza as condições reais, como por exemplo, a organização dos biofilmes e todos outros fatores que influenciam o crescimento e os efeitos *in vivo* das bactérias. No entanto, é de notar que, são estudos essenciais numa fase preliminar. Como exemplos de estudos *in vitro* temos os estudos de absorção que avaliam a adsorção dos produtos em diferentes superfícies. A espectrofotometria, que também se enquadra no presente trabalho, é aplicada para avaliar parâmetros necessários nesta primeira fase de investigação.¹

Segundo Xu *et al.*¹ e Socransky e Haffajee¹, existem modelos de biofilmes pré-definidos para que as formulações sejam estudadas *in vitro*, simulando as condições reais do biofilme. No entanto, não existe nenhum modelo padronizado e universalmente aceite, mas a proposição de vários modelos *in vitro* possível.¹⁷

No âmbito neste projeto de investigação, pretende-se também avaliar as interações bactérias-película adquirida e/ou péptidos. Segundo a literatura, existem várias técnicas disponíveis para esse efeito, mas as que mais se adequam são o QCM (*Quartz Crystal Microbalance*) e SPR (*Surface Plasmon Resonance*).^{2,3,18,19} O QCM é um dispositivo composto por uma microbalança de cristal de quartzo que mede em tempo real a acumulação de massa durante a formação do biofilme.^{2,18} Outra técnica atualmente disponível é o SPR que fornece análise interativa em tempo real de bactérias e componentes salivares, através de fenómenos de refração.^{3,19}

Na sequência desta avaliação, seguem-se os estudos *in vivo*.¹ Estes baseiam-se na avaliação dos efeitos em diferentes materiais como discos de esmalte, dentina e/ou outros materiais que podem ser avaliados em meios de cultura (*ex vivo*) ou inseridos na cavidade oral dos pacientes e recuperados *à posteriori* para poderem proceder à sua avaliação (*in vivo*).

Após os estudos *in vivo* serem ultrapassados com qualificação positiva, desenvolve-se o patamar dos ensaios clínicos. Segundo a ADA, a eficácia de um produto para o controlo da gengivite deve ser demonstrada em estudos clínicos com duração de 6 meses, enquanto que a mesma associação para produtos de controlo para o índice de placa, recomenda um período de avaliação de, pelo menos, 4 semanas.¹⁴

Para estudos de curta duração, tem sido amplamente utilizado um desenho de estudo que consiste num estudo cruzado, com um grupo placebo e um grupo controlo positivo, medindo a quantidade de bactérias na saliva antes e depois de um único uso da formulação a ser testada (estas medições devem ser realizadas em horas diferentes e em momentos diferentes). Em suma, estes estudos permitem fornecer informações sobre a atividade antimicrobiana e duração da sua atividade.¹

O mesmo desenho é usado para formulações que testam o controlo anti-gengivite mas, nestes estudos, são necessários períodos mais longos (12-28 dias), sendo que nenhuma higiene mecânica é permitida.¹

De seguida deve ser implementada uma avaliação de longa duração, através de ensaios clínicos randomizados com a duração de 6 meses – em que para além da eficácia avalia-se, simultaneamente, a presença ou ausência de efeitos adversos das formulações, ou seja, atesta-se nesta fase a biossegurança do produto. Estes ensaios foram propostos pelo *Council of Dental Therapeutics* (1986)²⁰ que os descrevem como sendo:

- Ensaios duplo cegos;
- Controlados;
- Mínimo 6 meses de duração;
- Avaliação microbiológica (avaliando crescimento de possíveis micro-organismos patogénicos resistentes e oportunistas);
- Avaliação das amostras microbiológicas e avaliações dos índices de placa e gengival.

4. Contextualização do nível de desenvolvimento da tecnologia

O presente trabalho insere-se num projeto de I&D (Investigação e Desenvolvimento) com o propósito de desenvolver uma ideia conceptual até um produto final com uma utilização clínica específica. Neste contexto, importa posicionar o atual nível de desenvolvimento do projeto e enquadrar os níveis futuros dos objetivos propostos. Como tal, considera-se relevante a menção da escala TRL - *Technology Readiness Level*. Esta é uma ferramenta de grande utilidade para a medição do nível de desenvolvimento de uma dada tecnologia. Foi desenvolvida nas décadas de 1970 e 1980 pela NASA, e criou um vocabulário comum para descrever graus de maturidade de tecnologia, mediando os mundos da investigação e da indústria e servindo como uma ferramenta de gestão do risco inerente à tecnologia em desenvolvimento.

Esta escala foi rapidamente adotada por diferentes instituições, incluindo os Departamentos da Defesa e da Energia dos EUA, a Agência Espacial Europeia e até a Comissão Europeia, que utiliza este conceito no âmbito do Horizonte 2020, o Programa-Quadro para a Investigação e Inovação.

A escala TRL apresentava, inicialmente, 7 níveis, contudo atualmente contempla 9 níveis, que variam entre o TRL 1 (investigação básica) e o TRL 9 (produto finalizado e pronto para lançamento no mercado) (Fig.2):

- TRL 1 - Investigação básica ou ideia em desenvolvimento;
- TRL 2 - Investigação suportada por um conceito tecnológico e/ou ideia de aplicação;
- TRL 3 - Investigação suportada por um mínimo de experimentação;
- TRL 4 - Validação dos componentes da tecnologia em ambiente de laboratório;
- TRL 5 - Validação dos componentes da tecnologia em ambiente relevante;
- TRL 6 - Demonstração do protótipo em ambiente relevante;
- TRL 7 - Demonstração do protótipo em ambiente operacional;
- TRL 8 - Sistema real completo e qualificado em ambiente operacional através de testes e demonstrações;
- TRL 9 - Sistema real finalizado e qualificado por meio de operações com êxito em missões pronto para lançamento no mercado).

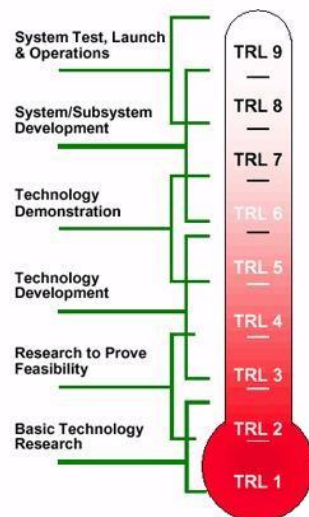


Fig.2. Escala TRL - *Technology Readiness Level*. Imagem adaptada de ²¹

Neste momento o projeto atual encontra-se num nível de desenvolvimento TLR-3 (investigação suportada por um mínimo de investigação).

5. Contextualização do propósito do projeto de investigação

Todas as condições apresentadas relativas aos colutórios existentes e à pandemia das infeções orais, tanto a nível das patologias periodontais como a nível da cárie dentária, que afeta cerca de 60-90% da população adulta,²² revelam a necessidade de refletir sobre a seguinte questão: será plausível ponderar o desenvolvimento de outras soluções mais facilmente disponíveis para a prevenção destas doenças orais?

Apesar do considerável leque de possibilidades à escolha de cada indivíduo, o controlo das doenças orais afigura-se como uma problemática de reversibilidade dificultada, como é facilmente observável pelas estimativas mundiais. Assim, surgiu uma tentativa inovadora de prevenir o desenvolvimento de doenças orais provocadas pela placa bacteriana: o Biolocker.

O Biolocker (BL) é um projeto que apresenta uma proposta de valor diferenciada para a manutenção da higiene oral promovendo o impedimento da recolonização microbiana na superfície dentária como adjuvante da escovagem mecânica. O mecanismo proposto baseia-se na complementaridade entre epítomos de proteínas de superfície bacteriana chave e proteínas salivares. Um péptido projetado e previamente sintetizado, que será semelhante ao epítomo bacteriano responsável por eventos de colonização precoce, após contacto com a superfície dos dentes e remoção de bactérias depositadas por escovagem mecânica, adere preferencialmente a essas proteínas salivares e bloqueia a possibilidade das bactérias aderirem e reiniciarem a colonização. De seguida, apresenta-se um cronograma (Diagrama 1) com os principais tópicos a serem desenvolvidos durante o projeto de investigação.

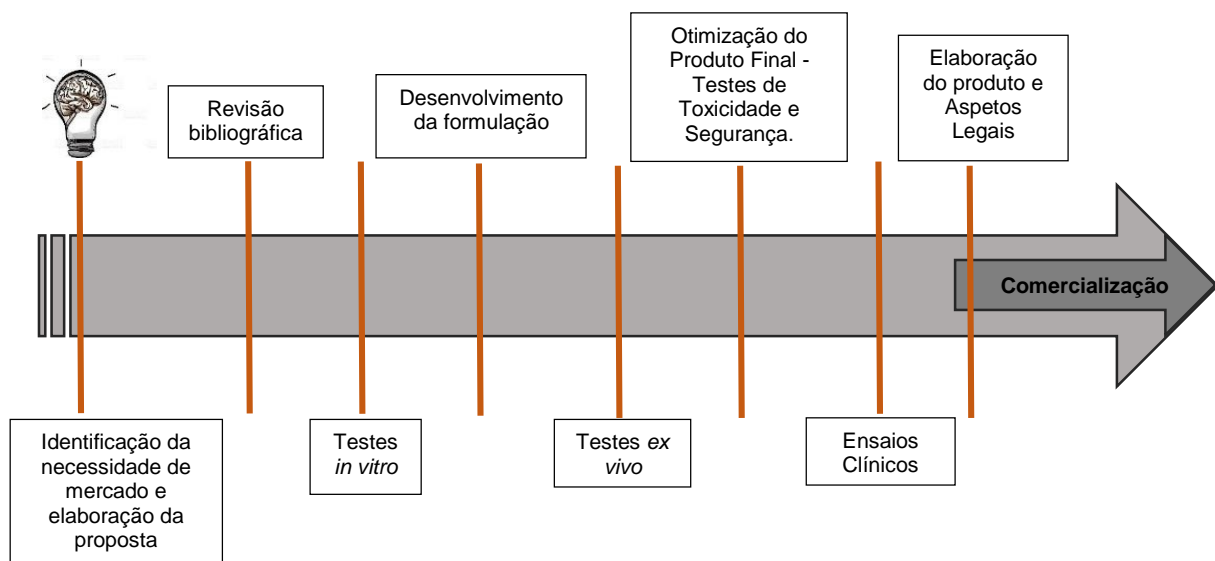


Diagrama 1. Cronograma do desenho do projeto de investigação

6. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho compreendem a realização de uma revisão sistemática e um projeto de investigação. A revisão sistemática pretende fazer uma avaliação do estado da arte sobre a eficácia comparativa da clorhexidina com outros antimicrobianos, enquanto agente preventivo da formação de placa bacteriana, a curto e a longo prazo. O

projeto de investigação pretende apresentar um desenho de uma metodologia experimental para avaliação de um novo produto composto por péptidos sintéticos bloqueadores da adesão bacteriana e preventivos da formação de placa.

II. Revisão Sistemática

A. Materiais e Métodos

A.1. Questão PICOT

A pesquisa da literatura foi direcionada com o intuito de responder a uma questão elaborada de acordo com a metodologia PICOT (*Population, Intervention, Comparison, Outcome, Time*):

P (população) – adultos saudáveis, com ou sem gengivite.

I (intervenção) – soluções orais (colutórios ou elixires) de Clorhexidina.

C (comparação) - comparação da eficácia com qualquer princípio ativo existente no mercado ou em investigação sob a forma de solução oral.

O (desfecho) – índices de placa e de hemorragia e efeitos adversos.

T (tempo) - mínimo de duração de 4 semanas (ensaios de curto prazo) e entre 4 semanas a 6 meses (ensaios de longo prazo)

Após a definição dos parâmetros definidos formulou-se a seguinte questão:

Qual a eficácia das soluções orais com clorhexidina em comparação com outros agentes antimicrobianos em relação aos índices de placa e hemorragia em doentes adultos saudáveis ou com gengivite?

A.2. Estratégia de Pesquisa

Foram utilizadas três base de dados eletrônicas, primárias e mistas, para a pesquisa de artigos: Biblioteca Nacional de Medicina, Washington, DC (MEDLINE-PubMed), Cochrane-CENTRAL e LILACS. Todas as bases de dados foram pesquisadas até março de 2017. A equação da pesquisa foi efetuada com os seguintes *Mesh Terms* “gingivitis”, “dental plaque”, “chlorhexidine” e “mouthwashes”, interligando com os conectores booleanos “AND” e “OR”, com os detalhes apresentados na Tabela II. Devido à expectável quantidade significativa de informação sobre o tema em questão, decidiu-se focar a pesquisa na inclusão de revisões sistemáticas e meta-análises com o objetivo de avaliar, principalmente, o nível mais elevado de evidência científica. Previamente foram definidos critérios de inclusão e exclusão.

A.3. Critérios de Seleção

Critérios de inclusão

- Revisões Sistemáticas e Meta-Análises.
- Artigos publicados na última década, desde 2006.
- Artigos com idioma em português, inglês e espanhol.
- Estudos conduzidos em humanos saudáveis e ≥ 18 anos, podendo incluir indivíduos com gengivite.
- Estudos com uma duração mínima de 4 semanas (ensaios de curto prazo) e máxima de 6 meses (ensaios de longo prazo).
- Estudos com avaliação de resultados a nível de índices de placa, hemorragia, ou outros índices de inflamação, e registo de efeitos adversos ou parâmetros centrados no doente.
- Aplicação de soluções orais (colutórios ou elixires).
- Aplicação de antissépticos orais em monoterapia ou como adjuvantes de métodos de higiene mecânica individual, num registo preventivo.

Critérios de exclusão

- Indivíduos com periodontite, portadores de próteses, aparelhos ortodônticos e implantes.
- Aplicação de formulações orais além das soluções, tais como géis, pastas dentífricas, vernizes e sistemas de libertação controlada de fármacos.
- Aplicação de antissépticos orais como coadjuvantes ativos do tratamento mecânico profissional (raspagem e alisamento radicular, desbridamento com ultrassons ou outros).
- Tipologia de estudos *in vitro*, pré-clínico, ensaios clínicos isolados e revisões narrativas.

Tabela II - Termos usados para a equação da pesquisa na PubMed-MEDLINE, Cochrane-CENTRAL e LILACS

PubMed-MEDLINE: (((gingivitis [MeSH Terms]) OR dental plaque [MeSH Terms]) OR chlorhexidine[MeshTerms]) AND mouthwashes[MeSHTerms]))

Cochrane-CENTRAL: (((gingivitis) OR dental plaque) OR chlorhexidine) AND mouthwashes

LILACS: (tw:(gingivitis)) OR (tw:(dental plaque)) OR (tw:(chlorhexidine)) AND (tw:(mouthwashes))

A.4. Pesquisa e seleção

Os artigos foram selecionados, inicialmente, através da leitura dos títulos e resumos. Apenas textos escritos em inglês, português e espanhol foram selecionados. Artigos com palavras-chave presentes no título e adequados ao objetivo do trabalho, foram selecionados para leitura integral. Publicações sem resumo, mas com títulos sugestivos de interesse para a pesquisa foram também incluídos na seleção inicial.

Após esta primeira seleção, os artigos foram lidos na íntegra e excluídos os que não obedeciam aos critérios de seleção.

A.5. Avaliação da qualidade metodológica

Além de uma avaliação descritiva dos estudos selecionados, foi implementada, simultaneamente, uma avaliação qualitativa. Os critérios utilizados para a avaliação da metodologia da qualidade das revisões e meta-análises selecionadas são apresentados na Tabela V. A avaliação da qualidade foi baseada na avaliação crítica de revisões sistemáticas aprovado pelo *Centre of Evidence-based Dentistry, Oxford, UK*.²³

B. Resultados

B.1. Resultados da pesquisa e seleção

A pesquisa nas bases de dados PubMed-MEDLINE, Cochrane-CENTRAL e LILACS resultaram num total de 385 artigos (Diagrama 2). A seleção por título e/ou resumos dos artigos que compreendiam palavras-chaves ou se relacionavam com o tema definido foram incluídos inicialmente obtendo-se 38 publicações. Após eliminar os artigos duplicados, 25 artigos foram selecionados para leitura integral. As justificações da exclusão dos artigos estão explícitas na Tabela III. Em suma, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão previamente definidos foram selecionados um total de 14 artigos, dos quais se destacam 5 revisões sistemáticas e 9 meta-análises.

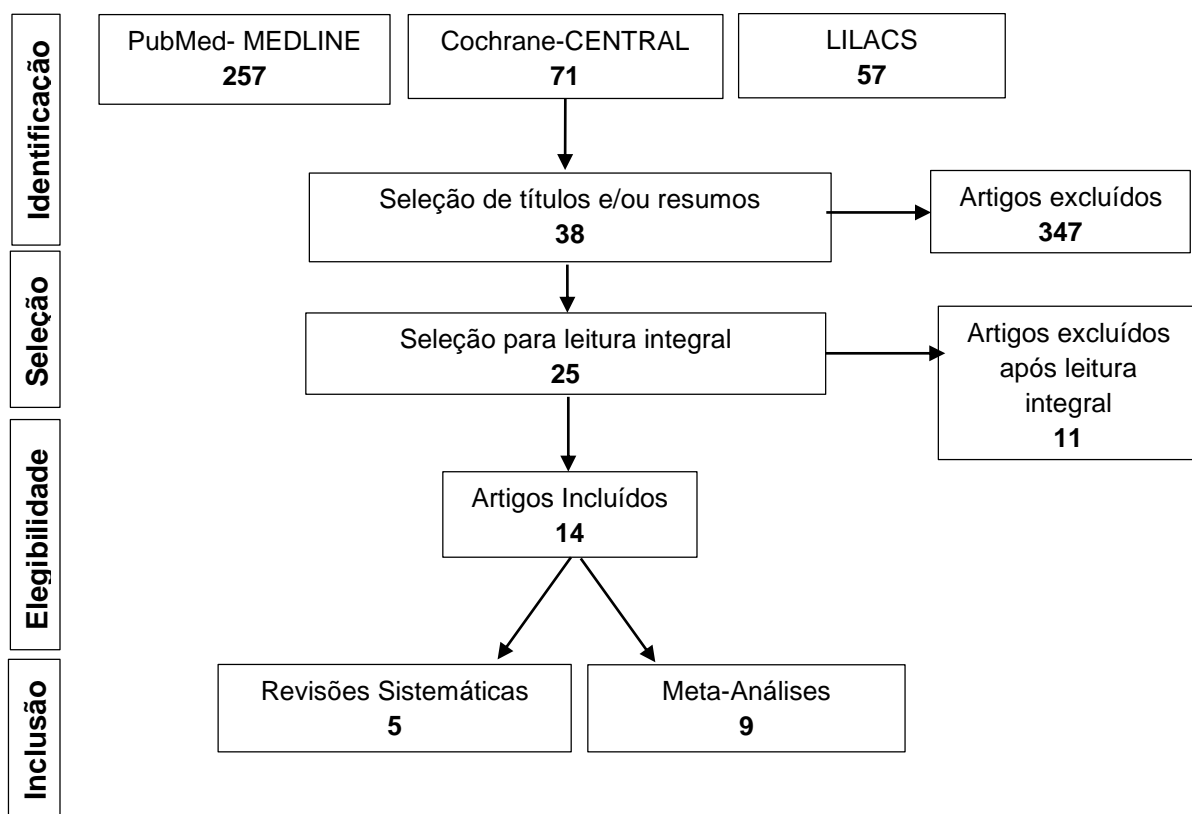


Diagrama 2. Diagrama da seleção de artigo

Tabela III – Motivos de exclusão dos artigos

Referência bibliográfica (ano)	Motivo de exclusão
Fatima Tayyaba <i>et al.</i> (2016) ²⁴	Não é revisão sistemática.
Rich SK, Slots J. (2015) ²⁵	Artigo. Inclui doentes com estomatite.
Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. (2015) ²⁶	Revisão sistemática das atividades farmaco-biológicas.
Hwu YJ1, Lin FY. (2014) ²⁷	Meta-análise que avalia vários parâmetros e quando avalia IP inclui doenças periodontais.
Supranoto SC <i>et al.</i> (2014) ¹⁴	Compara a eficácia dos dentífricos/géis de CHX com os colutórios de CHX
Varoni E <i>et al.</i> (2012) ²⁸	Revisão da literatura.
Freires IA <i>et al.</i> (2012) ²⁹	Inclui todas as idades.
Williams MI. (2011) ³⁰	Revisão da literatura.
Marsh PD. (2010) ³¹	O objetivo do artigo é descrever os componentes disponíveis e os seus mecanismos de ação.
Teles RP, Teles FR. (2009) ³²	Revisão da literatura.
Moran JM. (2000) ¹⁰	Artigo.

B.2. Avaliação descritiva dos artigos selecionados

Foi realizada uma análise descritiva dos artigos selecionados, tendo em conta a tipologia, o número de estudos englobados em cada revisão sistemática e/ou meta-análise, a metodologia experimental, parâmetros clínicos avaliados, principais resultados e conclusões. Os resultados desta avaliação estão apresentados na Tabela IV.

Tabela IV – Avaliação descritiva dos artigos selecionados

Autor (ano)	Tipologia	Nº de estudo	Tipo de Estudos	Metodologia Experimental	Parâmetros Avaliados	Follow-up	Discussão/Conclusão
Van der Weijden FA <i>et al.</i> (2015) ⁹	Revisão Sistemática	13	RS (13)	OE, CHX, H ₂ O ₂ , HEX, CPC, DEL, SnF ₂ , vários ingredientes	IP e IG	<4s - ≥4sem	CHX é a primeira escolha. A alternativa mais fiável para o controlo do IP são os OE. Sem diferenças entre a CHX e os OE a respeito da gengivite
Serrano J, <i>et al.</i> (2015) ³³	Revisão Sistemática e Meta-Análise	63	RCT (63) MA IP (42)* MA BOP (16)* MA IG (42)*	Vários agentes ativos no controlo antiplaca	IP, IG, BOP	6m	Diferenciaram as M.A. segundo diferentes índices. OE diferença significativa no Turesky e MGI. CHX em doses de 0,1-0,2% diferença significativa para o índice LS comparado com doses mais baixas. CPC diferença significativa para os índices LS, MGI e Turesky. Trip/cop melhoria no índice SL, Turesky e SPI.
Marcelo W.B. Araujo <i>et al.</i> (2015) ³⁴	Meta-Análise	29	RCT (29) MA IG (29)* MA IP (28)*	OE	IP e IG	6m	Recomenda o uso diário de OE como adjuvante da higiene oral diária. Esta combinação a longo prazo melhora os índices de placa e gengival.
Van Leeuwen MP <i>et al.</i> (2014) ³⁵	Revisão Sistemática e Meta-Análise	5	RCT (5) MA (4)*	OE com veículo-álcool vs veículo-água	IP, IG, Pigmentação dentária	3s-6m	Comparação entre OE com veículo-álcool vs veículo-água sem relevância significativa a nível de IP e IG. OE parecem fornecer um benefício significativo quando usados a longo prazo.
Boyle P <i>et al.</i> (2014) ¹³	Meta-Análise	51	RCT (51)	CHX, OE, CPC, DEL, TRI	IP, IG	1m-9m	Sugerem que CHX é mais eficaz. Os colutórios com OE também parecem ser eficazes, mas um pouco inferiores à CHX. Para o delmopinol resultados não foram sugestivos. Para TRI mais estudos são necessários para uma eficácia significativa. Para o CPC resultados não foram sugestivos.
Chen Y <i>et al.</i> (2013) ³⁶	Revisão Sistemática	11	RCT (11)	Vários componentes naturais	IP, IG, BOP	4s-24s	Não há evidência que comprove a eficácia dos NCCMs como complementares ao controlo mecânico no IP e IG. Contudo, alguns compostos podem ter benefícios para a saúde oral, mas são necessários mais estudos.
Van Strydonck DA <i>et al.</i> (2012) ¹⁵	Revisão Sistemática e Meta-Análise	30	RCT (30) MA (13)*	CHX	IP, IG, Pigmentação dentária	4s-2a	Fortes evidências para os efeitos antiplaca e anti-gengivite do colutório CHX usado como complemento da higiene oral regular na gengivite. Redução do IP de 33% e de 26% para IG nos os grupos com CHX.
Van Leeuwen MP <i>et al.</i> (2011) ³⁷	Revisão Sistemática e Meta-Análise	19	RCT (18) CCT (1) MA (6)*	CHX, OE	IP, IG, BOP, Pigmentação e Cálculos	24h-6m	Comparando OE e CHX, a CHX proporcionou melhores resultados no IP. A longo prazo para o IG, os OE não têm resultados diferentes da CHX, mas esta proporciona mais cálculos e pigmentação.

Tabela IV – Avaliação descritiva dos artigos selecionados (continuação)

Autor (ano)	Tipologia	Nº de estudo	Tipo de Estudos	Metodologia Experimental	Parâmetros Avaliados	Follow-up	Discussão/Conclusão
Hossainian N <i>et al.</i> (2011) ³⁸	Revisão Sistemática	12	RCT (7) CCT (5)	H ₂ O ₂	IP, BOP, IG	3d-6m	Resultados inconclusivos para colutório com peróxido de hidrogénio. Apenas 1 estudo a longo prazo sugere uma pequena, mas significativa redução do IG.
Afennich F <i>et al.</i> (2011) ³⁹	Revisão Sistemática	6	RCT (5) CCT (1)	Hexitidina	IP, IG, BOP	4d-6s	Colutórios com hexitidina proporcionam melhores efeitos sobre a redução da placa do que um placebo negativo. No entanto, são estatisticamente menos eficazes no controlo do IP e IG quando comparados com bochechos de clorhexidina.
Gunsolley JC (2010) ⁴⁰	Revisão Sistemática	3	RS (3)	CHX, OE, CPC	IP, IG	6m	Fortes evidências suportam que a CHX a 0.12% é o agente com maior eficácia (redução 28,7% IG e 40.4% IP), seguida dos OE (18.2% IG e 27.0% IP) e CPC (13.4% IG e 15.4% IP). A metodologia da RS é pouco clara.
Berchier CE <i>et al.</i> (2010) ⁴¹	Revisão Sistemática e Meta-Análise	10	RCT (10) MA (9)*	CHX 0.12 % vs CHX 0.2%	IP, IG	3d-3m	Comparação entre CHX 0.2% com 0.12%, a CHX 0.2% apresentou diferença pequena, mas significativa na redução do IP. No entanto, a relevância clínica desta diferença é provavelmente insignificante.
Haps S <i>et al.</i> (2008) ⁴²	Revisão Sistemática e Meta-Análise	8	RCT (8) MA (6) *	CPC	IP, BOP, IG	4s-6m	CPC como complemento da HO supervisionada ou não, os colutórios contendo CPC proporcionam um benefício significativo na redução IP e IG.
Stoeken JE <i>et al.</i> (2007) ⁴³	Revisão Sistemática e Meta-Análise	11	RCT (11) MA (8)*	OE	IP, BOP, IG	6m-9m	A evidência suporta que quando usado como complemento os OE providenciam redução dos IP e IG.

CCT - Ensaio Clínico Controlado; IP – Índice de Placa; BOP- Índice de Hemorragia à sondagem; IG- Índice de Gengivite; CHX – Clorhexidina; OE – Óleos Essenciais; TRI - Tricolosan; H₂O₂, - Peróxido de Hidrogénio; HEX – Hexitidina; CPC - Cloreto de cetilpiridínio; DEL – Delmopinol; d – dias; s – semanas; m – meses; a – anos; * - Número de estudos incluídos em cada Meta-Análise. MGI – Índice Gengival Modificado; Tuersky – Índice de Placa; LS – Índice Silness & Løe; SPI – Índice Severo de Placa

B.3. Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa dos artigos selecionados tem por base a avaliação crítica de revisões sistemáticas aprovado pelo *Centre of Evidence-based Dentistry, Oxford, UK*.⁴⁴ Apresenta-se na Tabela V os critérios que validam a qualidade dos artigos, segundo o CASP (*Critical Appraisal Skills Programme*).²³

Tabela V - Tabela CASP. (N.A – não aplicável)

Questões		Classificação	Pontuação
I.	A revisão elabora uma pergunta claramente focada?	Sim	+
		Inconclusivo	N.A.
		Não	-
II.	A revisão inclui o tipo certo de estudos?	Sim	+
		Inconclusivo	N.A.
		Não	-
Questões detalhadas			
III.	Identificam todos os estudos relevantes?	Sim	+
		Inconclusivo	N.A.
		Não	-
IV.	Avaliam a qualidade dos estudos?	Sim	+
		Inconclusivo	N.A.
		Não	-
V.	Se os resultados dos estudos forem associados e se foi razoável fazê-lo?	Sim	+
		Inconclusivo	N.A.
		Não	-
VI.	Quais os resultados globais?	Resposta descritiva	
VII.	Quão precisos são os resultados?	Resposta descritiva	
VIII.	Os resultados podem ser aplicados à população?	Sim	+
		Inconclusiva	N.A.
		Não	-
IX.	Todos os resultados importantes foram considerados?	Sim	+
		Inconclusivo	N.A.
		Não	-
X.	A prática deve ser influenciada como resultado da evidência da revisão?	Sim	+
		Inconclusivo	N.A.
		Não	-

Em seguida, elaborou-se uma tabela com a avaliação crítica, respondendo às questões CASP acima apresentadas (Tabela VI).

Tabela VI – Avaliação crítica dos artigos selecionados segundo o CASP

CASP Autores	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Van der Weijden FA <i>et al.</i> (2015) ⁹	+	+	+	+	-	CHX é a melhor alternativa no IP. Sem diferença significativa entre OE para IG.	Heterogeneidade considerável.	+	+	+
Serrano J, <i>et al.</i> (2015) ³³	+	+	+	+	+	Uso de agentes ativos no complemento da higiene diária.	Heterogeneidade considerável.	+	+	+
Marcelo W.B. Araujo <i>et al.</i> (2015) ³⁴	N.A.	+	N.A	+	+	OE devem ser utilizados como adjuvantes da higiene oral.	Heterogeneidade baixa.	+	+	+
Van Leeuwen MP <i>et al.</i> (2014) ³⁵	N.A.	+	+	+	+	M.A. revela que OE apresentam melhores resultados no IP e IG	Apresenta evidência forte e moderada para o IP e IG respectivamente.	+	+	+
Boyle P <i>et al.</i> (2014) ¹³	N.A.	+	+	+	+	CHX é o mais efetivo no IP e IG.	Heterogeneidade igual a zero.	+	+	+
Chen Y <i>et al.</i> (2013) ³⁶	+	+	+	+	-	No geral, oito estudos demonstram efeitos positivos.	Heterogeneidade considerável.	+	+	+
Van Strydonck DA <i>et al.</i> (2012) ¹⁵	+	+	+	+	+	M.A. mostrou valores significativos a favor da CHX.	M.A. com poder significativo.	+	+	+
Van Leeuwen MP <i>et al.</i> (2011) ³⁷	+	+	+	+	+	M.A. a longo prazo mostra que a CHX tem melhores resultados no IP vs OE. No IG não revela diferença significativa.	Heterogeneidade considerável.	+	+	+
Hossainian N <i>et al.</i> (2011) ³⁸	+	+	+	+	-	Seis estudos revelam que o H ₂ O ₂ não melhora o IP a curto prazo, mas a longo prazo, mostra efeito no IG.	4 com baixo risco, 2 com moderado e 4 com alto risco de viés.	+	+	+
Afennich F <i>et al.</i> (2011) ³⁹	+	+	+	+	+	Hexitidina parece não ser uma alternativa à CHX.	Heterogeneidade considerável.	+	+	+
Gunsolley JC (2010) ⁴⁰	N.A.	+	+	-	-	Evidência para CHX e OE no IP e IG. Evidência para o CPC baixa.	Heterogeneidade considerável – incluem apenas 3 RS.	+	+	+

CASP	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Autores										
Berchier .CE <i>et al.</i> (2010) ⁴¹	+	+	+	+	+	CHX 0.2% apresentou pequena diferença, mas significativa na redução do IP em relação a 0,12%.	Heterogeneidade considerável.	+	+	+
Haps S <i>et al.</i> (2008) ⁴²	+	+	+	+	+	CPC proporcionam benefício significativo na redução IP e IG.	Heterogeneidade considerável.	+	+	+
Stoeken JE <i>et al.</i> (2007) ⁴³	+	+	+	+	+	Diferença significativa quando usados como adjuvantes à escovagem. OE como à	Heterogeneidade considerável.	+	+	+

III. Projeto de Investigação

A. Materiais e Métodos

A.1. Estudo de mercado, elaboração da proposta e revisão bibliográfica

No seguimento do projeto Biolocker, como ilustrado no cronograma (Diagrama 1) pretendem-se realizar um conjunto de tarefas que levam à concretização do objetivo final: a comercialização do produto. Este estudo faz parte de um projeto de I&D que congrega uma equipa multidisciplinar, composta pelo laboratório de Coloides do Departamento de Química da FCTUC, valência de Periodontologia do Grupo de Ensino da Unidade II – MOCOP - da Área da Medicina Dentária da FMUC e do laboratório de Microbiologia da FMUC.

O Biolocker surge na tentativa de colmatar uma lacuna presente na saúde oral. As patologias orais são extremamente comuns na sociedade, além da enorme prevalência de patologias orais em crianças com idade escolar (60-90%), 92% dos adultos de 20 a 64 anos tiveram cáries dentárias nos seus dentes permanentes, bem como 26% dos adultos de 20 a 64 anos têm patologia dentária não tratada (dados relativos aos EUA). Após a cárie, as doenças periodontais, nomeadamente a gengivite, são as doenças infecciosas mais comuns em todo o mundo. Em cerca de 15% da população, a doença pode progredir para periodontite grave que leva rapidamente à perda dentária. Com a idade de 65 a 74 anos cerca de 30% das pessoas perderam todos os dentes, sendo a doença periodontal a principal causa. Essas patologias também podem estar associadas a doenças sistémicas como diabetes, doenças cardiovasculares, problemas durante a gravidez e doenças respiratórias. Uma má higiene oral pode estar relacionada com cancro oral, que é o 8º cancro mais comum em todo o mundo. Algumas das bactérias responsáveis por doenças relacionadas à placa oral também estão correlacionadas com condições de risco, como a endocardite. Numa perspetiva económica, a cavidade oral é a área corporal mais onerosa para tratamentos, influenciando de uma forma crucial o orçamento do agregado familiar. A saúde oral é, sem dúvida, um dos problemas de saúde pública mais imperiosos a serem enfrentados no século XXI.⁴⁵

Numa perspetiva de mercado, as marcas líderes de vendas de colutórios, segundo dados estatísticos relativos ao ano de 2016 nos EUA, venderam cerca de 800 milhões de euros. Adicionalmente, o valor de mercados dos antissépticos orais na Inglaterra a partir de 2016 alcançou vendas no valor de 190 milhões.⁴⁶

Prevê-se que o mercado dos produtos orais cresça 22% até 2018 (dados relativos ao ano de 2014). Os colutórios orais apresentaram um crescimento de 6% entre 2012 e 2013 o que se traduz num valor de 175 milhões de euros, representando 1/5 do mercado geral dos produtos orais.⁴⁵

Para complementar este projeto e justificar, numa vertente teórica e de análise de mercado, a necessidade de atuação deste produto realizou-se uma revisão sistemática que avalia o estado da arte dos antissépticos com o intuito de aferir a sua eficácia nesta problemática. Como já foi referido no capítulo da Introdução, o Biolocker, pretende atuar na fase primária da colonização, impedindo a recolonização bacteriana após escovagem mecânica. Este mecanismo de ação pretende prevenir a adesão microbiana e, assim, prevenir as subseqüentes etapas da formação do biofilme, o que se traduz numa menor carga bacteriana na cavidade oral afetando, positivamente, tanto a patologia dentária como gengival (Fig.3).

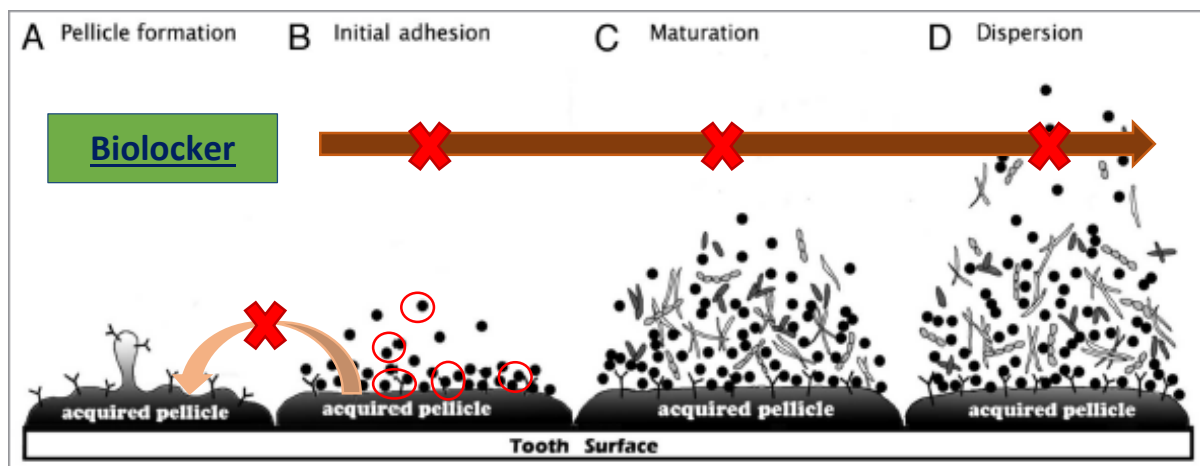


Fig.3. Mecanismo de ação do Biolocker. Imagem adaptada de ⁸

A.2. Testes *in vitro*

A.2.1. Caracterização dos péptidos

Os testes *in vitro* têm como objetivo avaliar a interação dos péptidos sintetizados com bactérias, nomeadamente, a potencial inibição qualitativa na ligação bactérias-péptido. Foram sintetizados dois péptidos pela empresa Biomatik (Canadá): péptido 1 (P1) (grau pureza >95%, por HPLC) com a sequência xxxxxxxxxxxxxx (13aa, 1.54KDa) e o péptido 2 (P2) (grau de pureza >95%, por HPLC) com a sequência xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx (21aa, 2.42KDa). A adesão do *Streptococcus mutans* é mediada por adesinas que são expressas na membrana celular destas bactérias como são exemplos o antigénio I/II (SA I/II), antigénio B, P1 ou PAC.^{6,47} Outros agentes envolvidos na formação da placa bacteriana, como o *Streptococcus gordonii*, também expressam na sua superfície moléculas responsáveis pela adesão. Identificou-se que uma das proteínas de ligação da SA I/II à película salivar é constituída por glicoproteínas e mucinas, denominando-se por complexo de aglutinina salivar. Estas glicoproteínas são de alto

(440Kda) e baixo peso molecular como a IgA.⁴⁷ Estudos *in vitro* reconheceram que um anticorpo monoclonal (mAB) é capaz de se ligar à glicoproteína de alto peso molecular e de bloquear a adesão do *S. mutans*.⁴⁷ Estes antigénios interagem com as proteínas salivares presentes na película adquirida, nomeadamente com a lisozima, amilase e aglutinina.^{47,3} Na figura 4 apresenta-se um esquema de como as adesinas SA I/II, proteínas de superfície referentes ao *Streptococcus mutans*, facilitam a adesão da bactéria à hidroxiapatite.

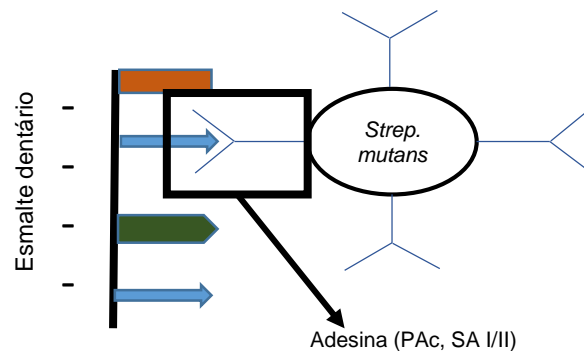


Fig.4. Esquema representativo da ligação do *Streptococcus mutans* ao esmalte

Neste trabalho foram sintetizados dois péptidos, que compreendem duas abordagens diferentes à problemática associada à deposição bacteriana na superfície do esmalte. Se, por um lado, o Péptido 1 foi sintetizado como um péptido capaz de bloquear a adesão de vários *Streptococcus* em ambiente oral, entre os quais o *S. mutans*, o Péptido 2 foi desenhado com o intuito específico de bloqueio da espécie *S. mutans*. O Péptido 1 apresenta aproximadamente 40% de homologia com a PAC, adesina importante na ligação do *Streptococcus mutans*. Apresenta também 100% de homologia com o SspB do *Streptococcus gordonii*. O objetivo é avaliar, nesta fase, se a introdução deste péptido em ambiente oral poderá ter impacto na adesão do *S. mutans*. Se tal se verificar, poderá ser um bom candidato a bloquear a adesão de outros *Streptococcus* envolvidos na cárie e/ou doença periodontal. Em relação ao Péptido 2, para determinar a sequência peptídica homóloga à SA I/II, responsável no *S. mutans* pela adesão à película salivar, Younson *et. al.* reportam a execução de um trabalho de síntese de péptidos semelhantes à sequência da Sa I/II, avaliando o seu impacto na adesão do *S. mutans* em saliva por ligação competitiva com o complexo aglutinina salivar.⁴⁷ Após este trabalho, concluiu-se que o péptido que se denomina de Péptido 2 neste projeto inibe de forma pronunciada a adesão do *S. mutans* à saliva de dadores.

A.2.2. Preparação da saliva humana

Definiu-se a utilização de saliva humana como substrato para a realização dos testes *in vitro*, em detrimento da saliva artificial, com o intuito de aumentarmos a complexidade do sistema e melhorar o grau de extrapolação dos resultados. Para tal, foi necessário otimizar a metodologia da utilização da saliva desde a sua recolha, manipulação, esterilização, até à caracterização do produto final obtido.^{3,47}

Para a recolha da saliva humana, foram usados blocos de parafina, a partir de um indivíduo saudável (indivíduo feminino, 23 anos, ausente de infeções orais, não fumador, ASA tipo I) (Fig.5). A saliva recolhida foi centrifugada - com o objetivo de remover resíduos alimentares, células mortas e partículas de maior densidade - a 5540rpm/5min (centrifugadora Universal 320R, Hettich) (Fig.6). Após centrifugação removeu-se o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur graduada descartável (Fig.7 e 8). O seguinte objetivo, após a recolha, foi a obtenção de uma saliva estéril, através do método da filtração. Nesta etapa, a saliva foi filtrada através de um sistema de seringa, em câmara de fluxo laminar com filtros de acetato de celulose 0,22 µm (VWE, Europa) (Fig.9).

Para validar a esterilidade da saliva, pipetaram-se 50 µl de saliva filtrada para uma placa de Petri (9cm de diâmetro) com os meios de cultura Columbia e YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) meios de crescimento de bactérias e fungos, respetivamente. Os meios de cultura com a saliva filtrada foram incubados numa estufa a 37° C. A validade da esterilidade foi feita por observação das placas de Petri em três momentos diferentes: 24 h, 48 h e 78 h.

Após a conclusão deste passo foi necessário verificar se a filtração removia conteúdo total proteico salivar, na medida em que a adesão dos péptidos se estabelece por adesão direta às proteínas salivares. Desta forma, procedeu-se à caracterização do produto final obtido, através da execução do Método de Bradford, que é um ensaio colorimétrico baseado na adsorção do reagente *Coomassie Brilliant* que se liga às proteínas e permite quantificar o conteúdo proteico total numa solução (Fig.11).³⁰ Neste ensaio, a proteína utilizada como padrão foi o BSA – *Bovine Serum Albumin* - (A3059, SIGMA, USA).

Previamente, prepararam-se três amostras (Fig.5):

- A1-Saliva normal
- A2-Saliva centrifugada
- A3-Saliva centrifugada e filtrada (filtros de 0.22 µm)

Preparou-se o reagente de Bradford a partir do seguinte método: dissolveram-se 50 mg de Coomassie Brillant Blue G-250 em 50 mL de metanol e, em seguida, adicionaram-se 100 mL de ácido fosfórico a 85% v/v. Adicionou-se água destilada até perfazer uma solução com um volume de 1 litro. Prepararam-se soluções aquosas de calibração com BSA, partindo

de uma solução concentrada (50 mg/l). Efetuaram-se diluições sucessivas 1:2, obtendo-se soluções padrão com 25 mg/l, 12.5 mg/l, 6.25 mg/l e 0 mg/l. Adicionou-se 1 ml de cada solução padrão a 2 ml de Reagente de Bradford e, após 10 minutos de reação, obteve-se o espectro de absorvância na gama 400-700 nm, registrando-se o valor obtido a 595 nm. Como referência, usou-se a solução de Reagente de Bradford. Os valores obtidos serviram para construir uma curva de calibração (Fig.22), representando uma relação linear entre a absorvância a 595 nm e a concentração de BSA.

Para determinar a concentração proteica das amostras de saliva, procedeu-se de forma equivalente. Fez-se reagir 1 ml de amostra com o Reagente de Bradford e determinou-se a sua absorvância a 595 nm. Tendo-se verificado que as amostras recolhidas eram demasiado concentradas para a gama de calibração, efetuou-se a diluição de todas as amostras de saliva por um fator de 10, aos quais se adicionaram 2 ml de Reagente de Bradford. Mediu-se então a absorvância destas soluções, após 10 minutos de reação. As amostras A1, A2 e A3 foram analisadas em triplicado.

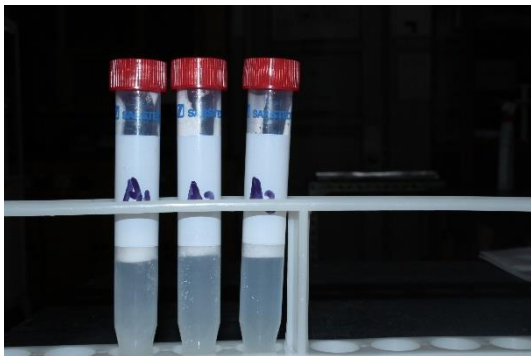


Fig.5. Recolha das amostras de saliva (A1,A2,A3)



Fig.6. Centrifugação das amostras de saliva (A2,A3)

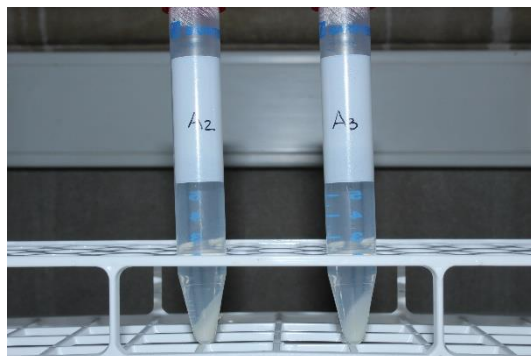


Fig.7. Amostras após centrifugação (A2,A3)

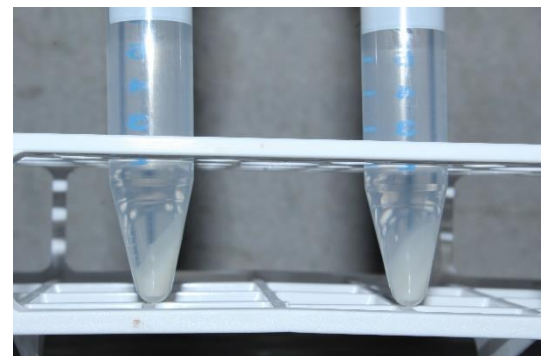


Fig.8. Pellet (A2,A3)

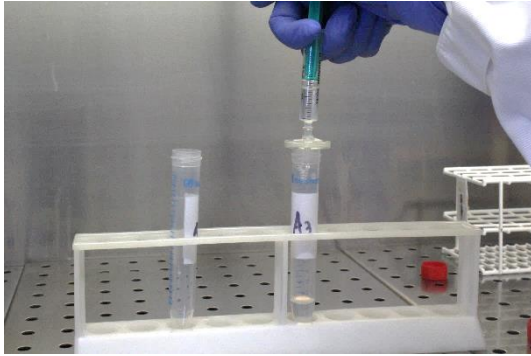


Fig.9. Filtração da amostra dentro da câmara de fluxo laminar (A3)

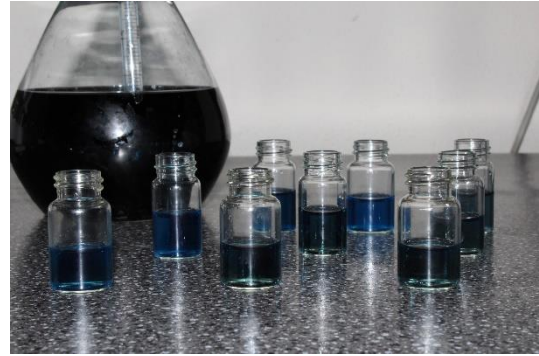


Fig.10. Quantificação proteica – Reagente de Bradford

A.2.3. Caracterização da saliva total

O método de Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) equipamento JSM-530 (Jeol Ltd, Tokyo, Japan) de 200 kV (kilovolt) foi utilizado com o objetivo de caracterizar a microestrutura dos componentes sólidos da saliva humana. Para esse efeito, a saliva humana foi recolhida e liofilizada sob vácuo a -30°C durante 48 horas. As amostras foram colocadas num porta-amostras, sobre uma fita condutora de carbono, e revestidas com uma fina camada de ouro. Foram usadas ampliações entre 200 a 13 000.

A técnica de espectroscopia vibracional, designada de FTIR-ATR (*Fourier transformed infrared spectroscopy in attenuated total reflectance mode*), que consiste numa espectroscopia de absorção na gama infravermelho com transformada de Fourier, foi utilizada para determinar a composição química das amostras de saliva liofilizada. Os espectros foram registados no intervalo dos $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ usando um espectrómetro Nicolet (Madison, WI), com uma resolução de 2 cm^{-1} e número de scans de 32.

O espectro da saliva liofilizada foi comparado com um espectro de uma proteína (colagénio tipo I) e de um polissacarídeo (dextrano).

A.2.4. Observação dos efeitos dos péptidos na adesão das bactérias a proteínas da saliva *in vitro*

Meios e condições de cultura: A bactéria utilizada para este estudo foi o *Streptococcus mutans* (ATCC25175). O meio de cultura para o seu crescimento foi o meio BHI (*Brain Heart Infusion*), Agar (CULTIMED) esterilizado e autoclavado à temperatura de 121°C , à pressão atmosférica de 1,2 atm, durante 20 minutos, e distribuído em placas de Petri. A cultura foi mantida em meio BHI e incubada à temperatura de 37°C durante 48 h.

Ensaio de adesão: Procedeu-se à recolha e filtração da saliva como acima descrito. Realizaram-se ensaios laboratoriais de forma a otimizar o protocolo posteriormente realizado.

Ensaio 1: Para a realização destes testes foram necessárias 4 lâminas para cada péptido, as concentrações utilizadas neste estudo são apresentadas no esquema da Fig.11.

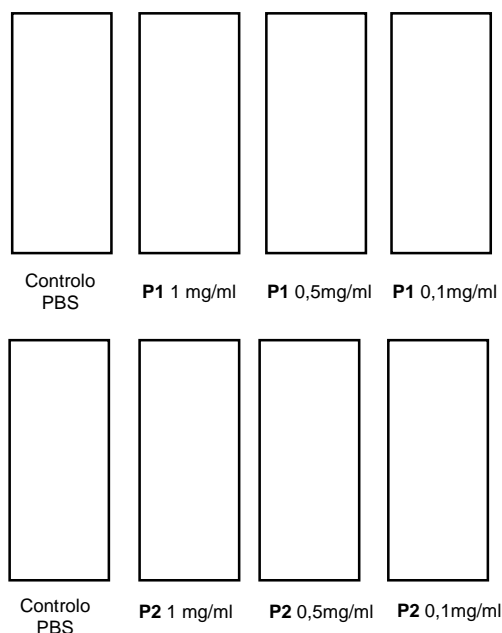


Fig.11. Lâminas de vidro (Microscópio ótico) em que realizou a adesão de saliva e bactérias na presença de várias concentrações de péptidos (P1 e P2)

Pipetaram-se 100 µl de saliva estéril em cada lamela de vidro e incubaram-se as lamelas a 37° C durante 30 minutos. Dissolveram-se os péptidos 1 e 2 com PBS (*Phosphate Buffered Saline* - 137 mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3 mM, Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) para obtenção de concentrações de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml e 0,1 mg/ml de cada péptido (Fig.12).

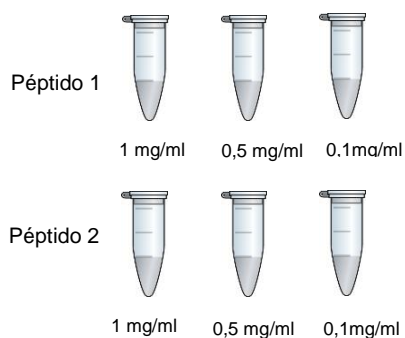


Fig.12. Diluição dos péptidos

Adicionaram-se 50 µl das respectivas concentrações dos dois péptidos nas lâminas e incubou-se durante 2 h a 37° C. Posteriormente, para remover o excesso, lavou-se por imersão as preparações das lâminas com PBS. Inocularam-se as bactérias num *ependorf* de saliva estéril e homogeneizou-se a amostra. A partir desta solução bacteriana, pipetaram-se 100 µl para cada uma das lâminas em sequência com as diferentes concentrações dos péptidos. Todas as preparações foram incubadas numa estufa a 37° C *overnight*.

Após este período de tempo, as lâminas foram observadas ao microscópio ótico com coloração monocromática. No presente caso, estando envolvido o *Streptococcus mutans* (Gram-positiva), corou-se com cristal de violeta. Compararam-se as lâminas das diferentes concentrações de péptidos com os respetivos controlos através de microscopia ótica.

Ensaio 2: Para otimizar o protocolo, no segundo ensaio, retirou-se o passo de lavagem por imersão das preparações das lâminas com PBS, removendo o excesso por ação mecânica. Utilizou-se também uma caneta hidrofóbica nas lamelas para confinar as soluções, de forma a que estas não dispersassem na altura da pipetagem (Fig.13).

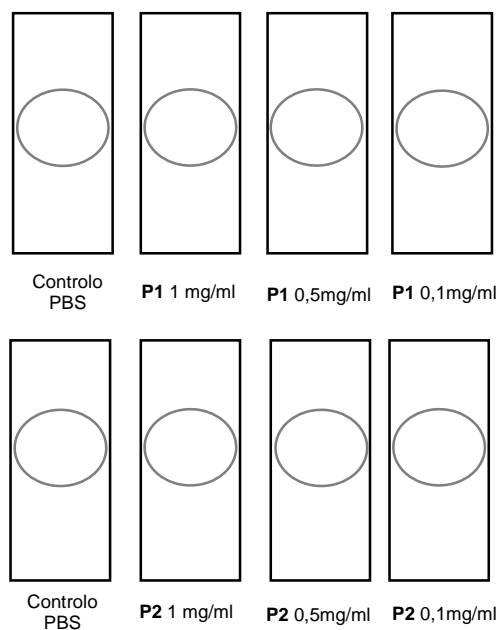


Fig.13. Lâminas de vidro com uma zona central limitada pela caneta hidrofóbica

Foi realizada uma análise histológica qualitativa das lâminas, com microscopia ótica, através de um estereomicroscópio (Nikon® SMZ 1500, Japão) com dispositivo de reforço de luz por fibra (Intralux® 5000-I, Volpi, Suíça), e num microscópio ótico de campo claro (Nikon® Eclipse 600, Japão). Ambos com capacidade de conexão a equipamento fotográfico convencional (Nikon® FDX-35, com sensor multiponto Nikon® U-III) e digital (Nikon® Coolpix 4500), bem como a câmara de vídeo digital (Optronics® DEI 750D CE, Goleta, Califórnia, Estados Unidos da América), com sinal NTSC, ligada a um monitor (Sony® Trinitron, Japão).

A.2.5. Trabalhos *in vitro* futuros

No contexto dos testes *in vitro* pretende-se, ainda, realizar outros estudos, utilizando por exemplo a tecnologia de *Surface Plasmon Resonance* (SPR). Este tem como objetivo analisar as interações bactérias-componentes salivares e bactérias-péptidos em tempo real e a nível nanomolecular, permitindo avaliar a adsorção do material em superfícies como o ouro ou prata. Pretende-se, ainda, avaliar a eficácia dos péptidos e respetiva dependência da eficácia perante a concentração.

A técnica de SPR utiliza um método ótico para medir o índice de refração próximo (dentro de 300 nm) de uma superfície de sensor. No sistema BIAcore, que é o sistema de SPR mais utilizado, esta superfície funciona como uma célula de fluxo, através do qual uma solução aquosa passa sob fluxo contínuo. Para detetar uma interação, uma molécula é imobilizada na superfície do sensor. A unidade complementar à molécula imobilizada é injetada numa solução aquosa através da célula de fluxo. À medida que o análogo ao recetor da molécula se vai ligando, a acumulação da molécula complementar na superfície resulta num aumento do índice de refração. Esta alteração no índice de refração é medida em tempo real e o resultado é representado em unidades de ressonância (RUs) em função do tempo.^{3,19}

A.3. Desenvolvimento da formulação

Diferentes formulações são passíveis de serem concretizadas. Idealmente, o produto será formulado em colutório. No entanto, hipóteses como géis, pastilhas ou outro tipo de formulações não estão, à partida, rejeitadas.

O desenvolvimento da formulação visa pontos essenciais como: facilidade de utilização, estabilidade do agente ativo, ação do agente em áreas de difícil escovagem, fácil aceitação pelo paciente e viabilidade económica, de maneira a ter o impacto significativo a nível comercial, traduzindo-se numa melhoria da saúde oral. Está em aberto a possibilidade de utilização de excipientes já testados, desde que comprovada a sua compatibilidade com os péptidos em questão, cuja vantagem seria a validação prévia da segurança toxicológica e biodisponibilidade. Desta forma a homologação do produto para comercialização sujeitar-se-ia a um processo de avaliação documental formal, sem necessidade de execução de ensaios de biossegurança, mais onerosos e prolongados. Estas características são mais direcionadas para as formulações dos colutórios, no entanto, possíveis adaptações poderão ser realizadas para que o produto possa ser desenvolvido em diferentes formulações.

A.4. Testes *ex vivo*

Na linha temporal do cronograma (Diagrama 1), após definição e desenvolvimento da formulação, seguem-se os testes *ex vivo*. Estes testes baseiam-se na avaliação da eficácia do produto no local alvo original, neste caso, em esmalte e/ou dentina, mas fora do organismo do indivíduo. Têm como vantagem, a possibilidade de avaliar o produto no substrato pretendido em condições de maior controlo de variáveis, aumentando a complexidade do sistema *in vitro* e criando condições de simulação mais próximas do real. Um desenho de estudo que pode vir a ser executado nesta etapa, engloba um grupo placebo e um grupo de controlo positivo, medindo a quantidade de bactérias antes e depois de um único uso da formulação a ser testada, fornecendo informações sobre a atividade antimicrobiana, a respetiva duração e caracterização da substantividade.¹

Uma caracterização exaustiva e minuciosa nesta fase de estudos do sistema próximo do produto final (formulação e péptidos), permite uma compreensão integrada e mais completa do seu comportamento, podendo em circunstâncias específicas evitar alguns testes de experimentação animal.

A.5. Otimização do produto final – Testes de toxicidade e segurança

O desenvolvimento de um novo produto, antes de rastreio em ensaios clínicos e posterior comercialização, implica que seja realizada uma sequência de testes pré-clínicos de segurança e toxicidade. Existem várias agências reguladoras que se adequariam a este âmbito como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e a agência norte-americana - *Food and Drug Administration* (FDA).⁴⁸

Os testes de segurança e toxicidade devem incluir o perfil toxicológico dos produtos, como o seu potencial de carcinogenicidade e mutagenicidade, além de testes geralmente reconhecidos para a segurança dos medicamentos.²⁰

A.6. Ensaio clínicos

Os ensaios clínicos mais usados para avaliação da eficácia dos antissépticos são os ensaios de curta e longa duração, descritos pela ADA (*American Dental Association*). Eficácia pode ser definida como a repercussão do uso do colutório na resposta ao controlo do crescimento da placa e na gengivite.¹³

Para avaliação de eficácia de colutórios como adjuvantes do controlo da placa e gengivite a ADA recomenda um período de avaliação de pelo menos 4 semanas.^{49,50} A eficácia de um produto para o controlo da gengivite deve ser avaliada em estudos clínicos com períodos de seguimento de pelo menos seis meses.

A.7. Elaboração do produto final e aspetos legais

A certificação de um produto é estabelecida de acordo com as regulamentações europeias para aquisição do selo CE. O símbolo CE indica que o produto está em conformidade com a legislação da União Europeia, suportado por evidência de que o produto preenche os requisitos e diretivas permitindo uma comercialização no Espaço Económico Europeu (EEE), e aferindo a conformidade com as exigências a nível de saúde, segurança dos utilizadores e proteção ambiental. O produto em estudo seria sujeito a marcação CE, dentro do grupo dos dispositivos médicos.

A marcação CE deve ser adquirida antes do produto ser comercializado, seguida do número de identificação do organismo notificado, no caso de este intervir na fase de controlo de produção.⁵¹

A.8. Comercialização

A estratégia preparatória para entrada no mercado concorrencial, após patenteamento do produto, visa o estabelecimento de parcerias com entidades do setor comercial e distribuidores já implementados no terreno, para que possam desenvolver a comercialização do produto em farmácias, supermercados e outras áreas afins.

B. Resultados

B.1. Caracterização da saliva total

Iniciam-se os resultados a partir da caracterização da saliva total, na medida em que se considerou necessário conhecer algumas das características desta solução fisiológica de relevância central no projeto. A técnica de MEV, foi utilizada para observar a estrutura microscópica da saliva liofilizada, tendo sido utilizadas diferentes ampliações, entre 200x e 13000x.

A imagem obtida com menor ampliação (Fig.14) ilustra o aspeto geral da saliva liofilizada, observando-se um material com estrutura de rede tridimensional porosa, constituída por uma mistura de filmes de paredes finas e também por filamentos homoganeamente distribuídos. Utilizando uma ampliação de 1000x (Fig.15), sobressaem alguns dos detalhes anteriormente descritos. É possível confirmar a presença de estruturas contínuas tipo filmes e de estruturas filamentosas, organizadas de forma aparentemente aleatória, criando poros de dimensão variável. Aumentado a ampliação para 3500x (Fig.16), observa-se uma zona restrita da amostra onde a estrutura dominante em primeiro plano se assemelha a um filme dobrado, no plano intermédio surge uma estrutura com carácter filamentososo, enquanto que o plano mais afastado corresponde a um fragmento de um filme. Observa-se também algumas irregularidades pontuais sobre os filamentos e sobre o filme mais afastado.

As zonas das irregularidades descritas foram observadas com maior ampliação, 13000x (Fig.17), podendo confirmar-se a existência de microestruturas com formas semelhantes entre si, sobre os fragmentos mencionados. Estas microestruturas têm aspeto de estarem aderidas ao material de substrato e pelas suas características, poderão corresponder a colónias de bactérias que naturalmente ocorrem na saliva.

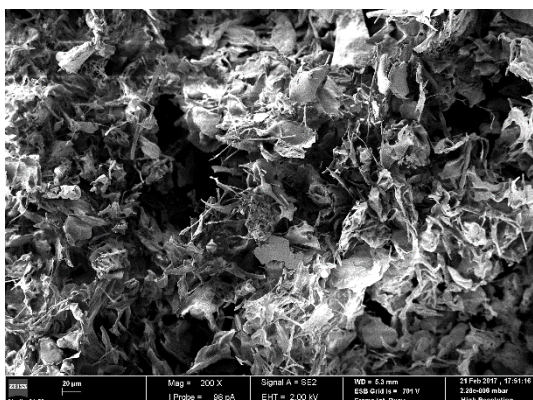


Fig.14. Imagem de saliva liofilizada observada por MEV (200x)

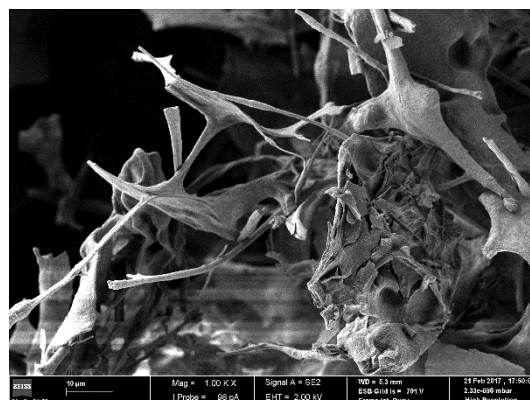


Fig.15. Imagem de saliva liofilizada observada por MEV (1000x)

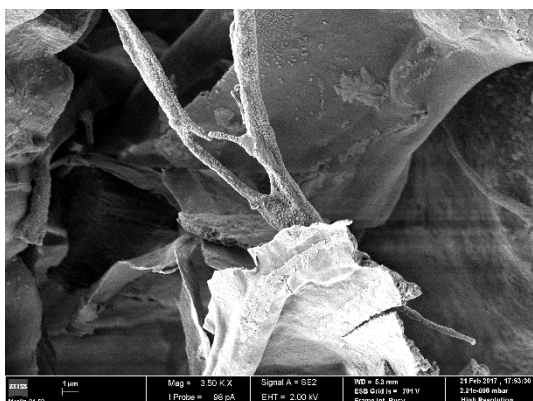


Fig.16. Imagem de saliva liofilizada observada por MEV (3500x)

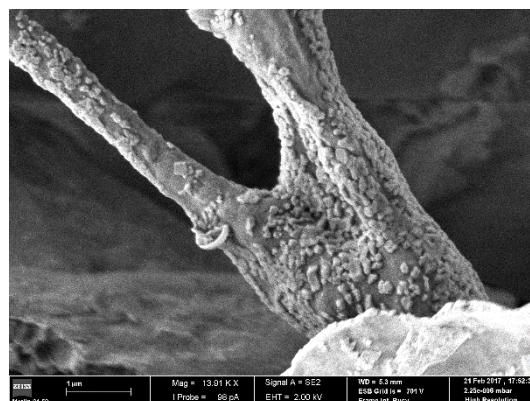


Fig.17. Imagem de saliva liofilizada observada por MEV (13000x)

FTIR-ATR: A técnica de espectroscopia vibracional foi utilizada para obter informação acerca da composição química da saliva liofilizada. A saliva líquida não foi analisada por FTIR porque sendo tipicamente composta por mais de 99% de água, o seu espectro vibracional corresponderia ao da água. Assim, com mais rigor, pode afirmar-se que o FTIR foi utilizado para determinar, de forma aproximada, a composição dos componentes sólidos da saliva. Para tal, obtiveram-se igualmente espectros de moléculas-modelo representativas de proteínas (colagénio tipo I) e de polissacarídeos (dextrano).

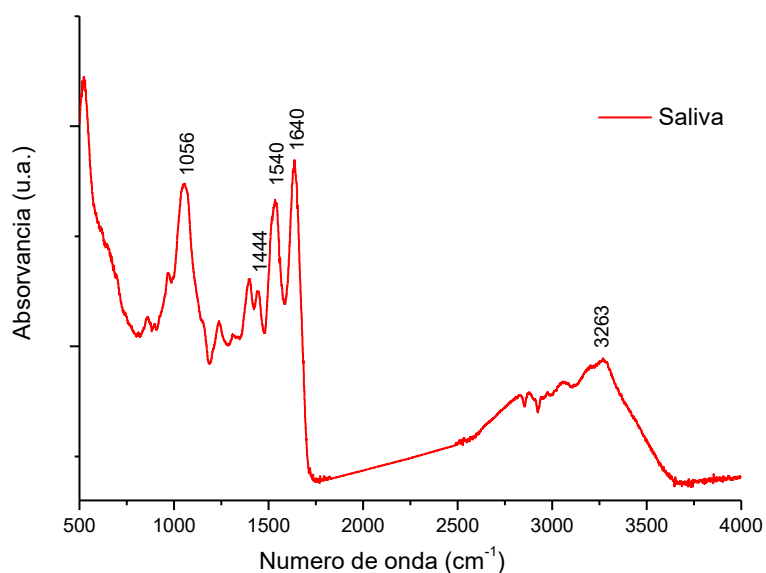


Fig.18 . Espectro de FTIR da saliva liofilizada

Relativamente ao espectro vibracional da saliva liofilizada (Fig.18) observa-se no intervalo de 500-2000 cm^{-1} , bandas estreitas e intensas a 500, 1056, 1540 e 1640 cm^{-1} .

Observa-se também um pico a 1444 cm^{-1} de menor intensidade. Esta zona espectral é frequentemente referida como “impressão digital”, uma vez que cada molécula apresenta um espectro identificador nesta gama. No caso da saliva, pode afirmar-se que as bandas a 1540 e 16640 cm^{-1} são compatíveis com vibrações típicas de proteínas, centradas nas ligações peptídicas, enquanto que a banda a 1056 cm^{-1} apresenta características normalmente associadas a sacarídeos. O intervalo de $2000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ apresenta uma banda larga de média intensidade com um máximo a 3263 cm^{-1} . Nesta região espectral, a banda observada pode ser atribuída ao modo de alongação dos grupos OH das moléculas da saliva.

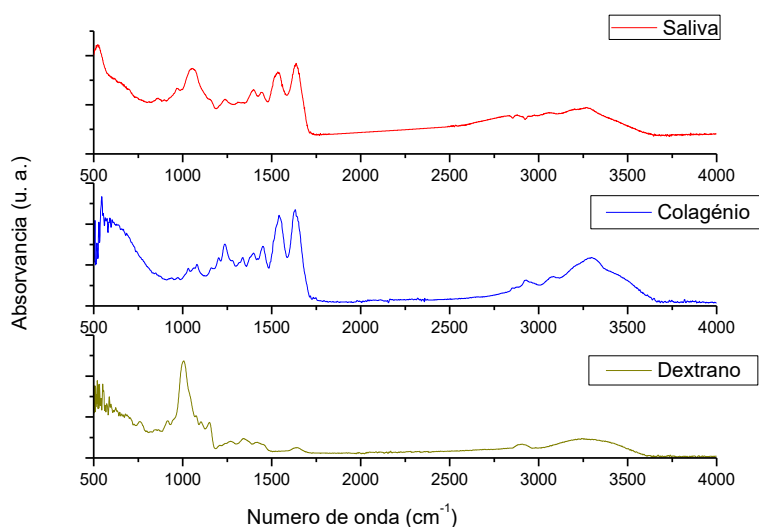


Fig.19. Espectro de FTIR da saliva liofilizada, colagénio tipo I e dextrano

Na figura 19, apresenta-se o espectro vibracional da saliva liofilizada juntamente com os espectros do colagénio tipo I e do dextrano, que servem de modelos de comparação e análise na discussão do presente trabalho. Estes espectros são também apresentados na figura 20, mas sobrepostos, para facilitar a comparação. Os resultados mostram que no espectro vibracional do colagénio os picos mais intensos ocorrem a 1645 e 1546 cm^{-1} , enquanto que no espectro do dextrano se destaca o pico a 1003 cm^{-1} . Estes picos são praticamente coincidentes com os picos a 1056 , 1540 e 1640 cm^{-1} observados no espectro da saliva.

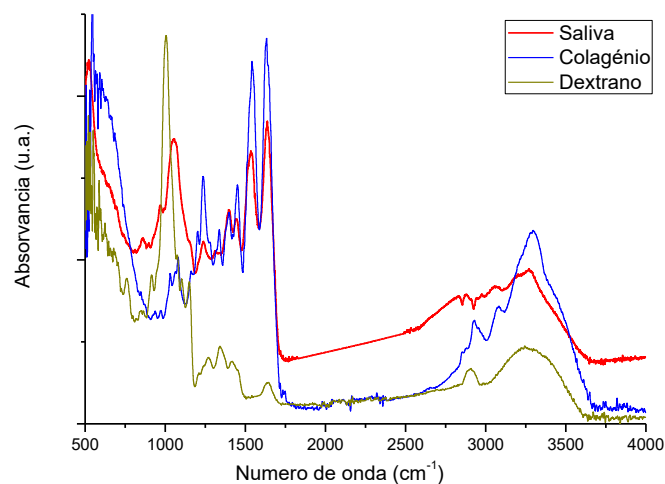


Fig.20. Espectro de comparação entre o FTIR da saliva liofilizada, colagénio tipo I e dextrano [500-4000 cm^{-1}]

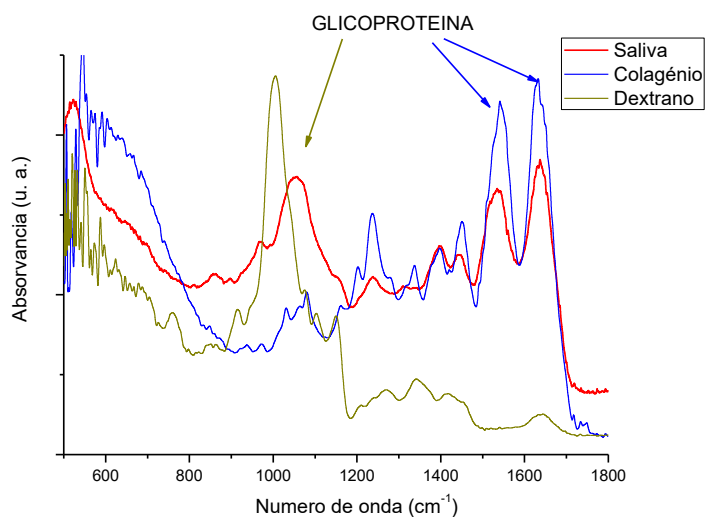


Fig.21. Espectro de comparação entre o FTIR da saliva liofilizada, colagénio tipo I e dextrano [500-1800 cm^{-1}]

Representando a região espectral 500-1800 cm^{-1} numa escala mais alargada (Fig.21), na comparação entre o espectro da saliva e do colagénio, destaca-se a coincidência entre os picos originados pelas vibrações típicas das proteínas, tanto na frequência a que ocorrem, como na forma e intensidade relativa dos mesmos. Na comparação entre a saliva e o dextrano, apesar da banda típica dos sacarídeos apresentar um desvio, existe também uma semelhança significativa a considerar.

Estes resultados mostram que a saliva liofilizada possui componentes típicos de proteínas e de derivados da glicose, podendo corresponder a glicoproteínas. Esta técnica não

permite distinguir se a amostra corresponde a uma glicoproteína ou a uma mistura de proteínas e sacarídeos.

B.2. Preparação da saliva humana

B.2.1. Filtração da saliva

Em todos os períodos temporais (24 h, 48 h e 72 h), as placas de Petri encontravam-se ausentes de crescimento bacteriano e de leveduras, o que nos permite aferir que o método utilizado para a filtração da saliva é passível de ser usado ao longo das várias etapas do projeto.

B.2.2. Quantificação da proteína

Para avaliar se a centrifugação e filtração removiam conteúdo proteico analisaram-se três amostras diferentes e em triplicado. A amostra A1 correspondente à saliva total (A1-n1, A1-n2 e A1-n3, respetivos triplicados); a amostra A2 corresponde à saliva centrifugada (A2-n1, A2-n2, A2-n3, respetivos triplicados) e a A3 à saliva centrifugada e filtrada (A3-n1, A3-n2 e A3-n3, respetivos triplicados).

A curva de calibração encontra-se representada na Figura 22 onde se indica a equação da zona linear de concentrações e o fator de correlação (R^2).

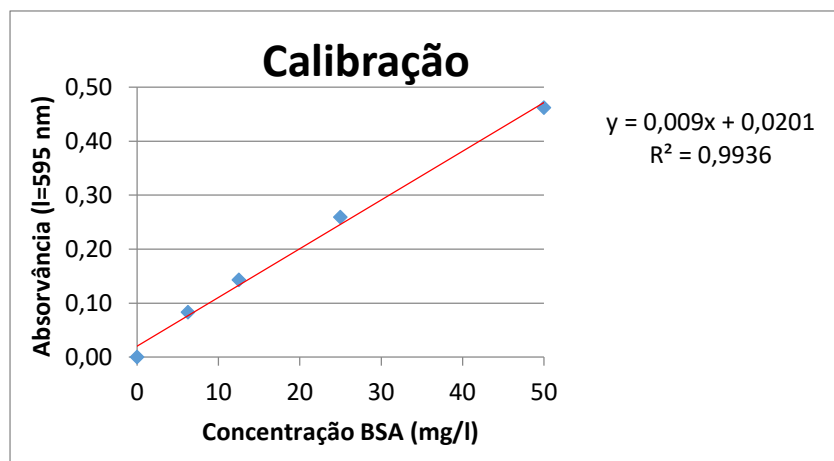


Fig.22. Curva de calibração representando a Absorvância a 595 nm em função da concentração de BSA.

O gráfico apresentado na Fig.23 representa a concentração de proteínas nas amostras de saliva A1, A2 e A3, em cada um dos três ensaios efetuados. As réplicas da amostra A1 variaram as suas concentrações entre 567 mg/l e 474 mg/l; as amostras A2 variaram entre

429 mg/l e 375 mg/l e as amostras A3 entre 345 mg/l e 315 mg/l. Estas variações foram, em cada caso, inferiores a 10% do valor médio.

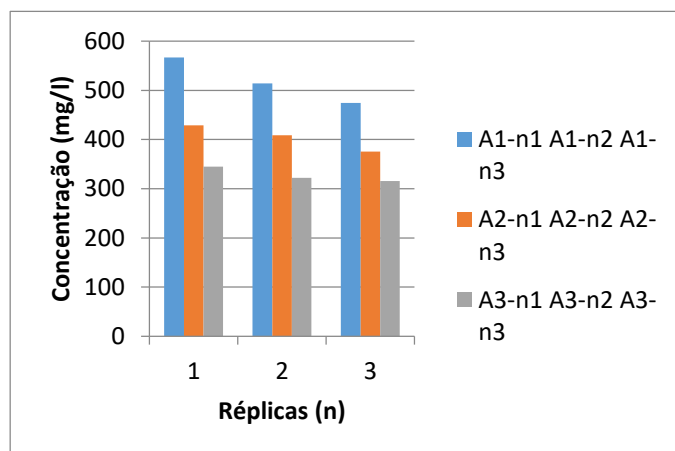


Fig.23. Representação da concentração proteica das amostras A1 (saliva total), A2 (saliva centrifugada) e A3 (saliva centrifugada e filtrada) em triplicado.

O gráfico seguinte (Fig.24) representa os valores médios de cada amostra. A média das amostras A1, A2 e A3 foi, respetivamente, 518, 404 e 327 mg/l. Convertendo para mg/ml, os valores foram 0.518, 0.404 e 0.327, respetivamente.

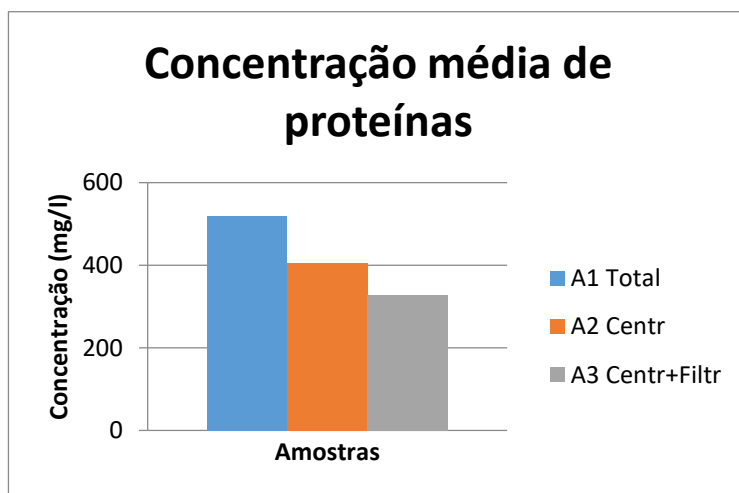


Fig.24. Concentração média de proteínas nas amostras A1, A2 e A3.

B.3. Observação dos efeitos dos péptidos na adesão das bactérias a proteínas da saliva – *in vitro*

Os ensaios preliminares *in vitro* foram realizados com o intuito de fundamentar o princípio básico fundador do conceito biológico subjacente à ideia g nese do projeto. Pretendeu-se, essencialmente, testar a metodologia experimental a nível da viabilidade das culturas com o agente bacteriano selecionado e avaliar vias alternativas de estudo com diferentes concentra es do péptido. Nestes primeiros estudos procedeu-se a uma avalia o indireta das intera es péptido-bactérias através de uma análise qualitativa da deposi o de bactérias.

Em rela o ao primeiro ensaio não foi possível retirar ila es, dado não se conseguiu confinar as amostras na lâmina, levando a uma dispersão da soluço. Não pudemos concluir que o mesmo local da lâmina em que pipet mos as bactérias, coincidiu com o local em que pipet mos a soluço de péptido. Para obviar este problema de falta de delimita o física do campo de estudo, optou-se, num segundo ensaio, por delimitar uma área circular central com caneta hidrofóbica. Nas amplia es a 100x em microscópio ótico, as imagens sugerem uma tendência de diminui o de bactérias nas lâminas com concentra es de péptidos comparativamente aos controlos, com as bactérias a apresentarem uma maior dispersão e menor aglomera o (Fig.25 a 28). Esta observa o acentuou-se, particularmente, no ensaio 2, na concentra o de 1mg/ml do péptido 2, com uma diminui o de bactérias (Fig. 28).

Ensaio 1 – Péptido 1

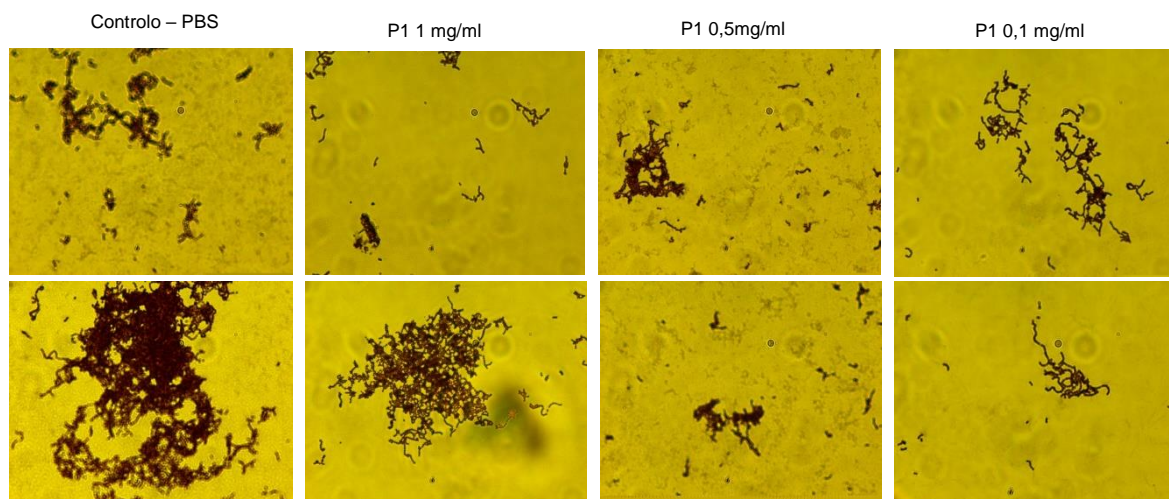


Figura 25. Imagem Microscópica 100x do ensaio 1 – P1

Ensaio 1 – Péptido 2

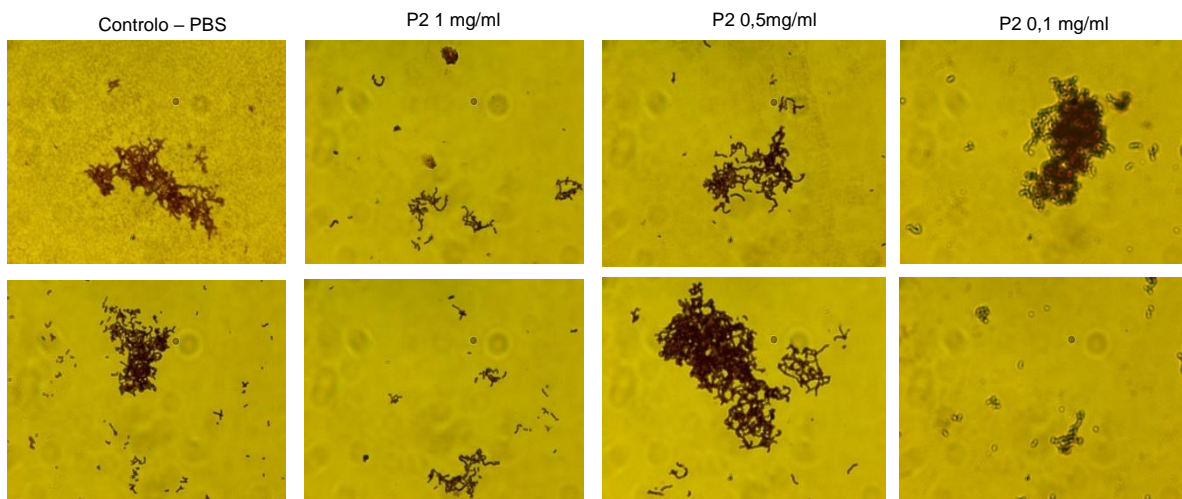


Figura 26. Imagem Microscópica 100x do ensaio 1 – P2

Ensaio 2 – Péptido 1

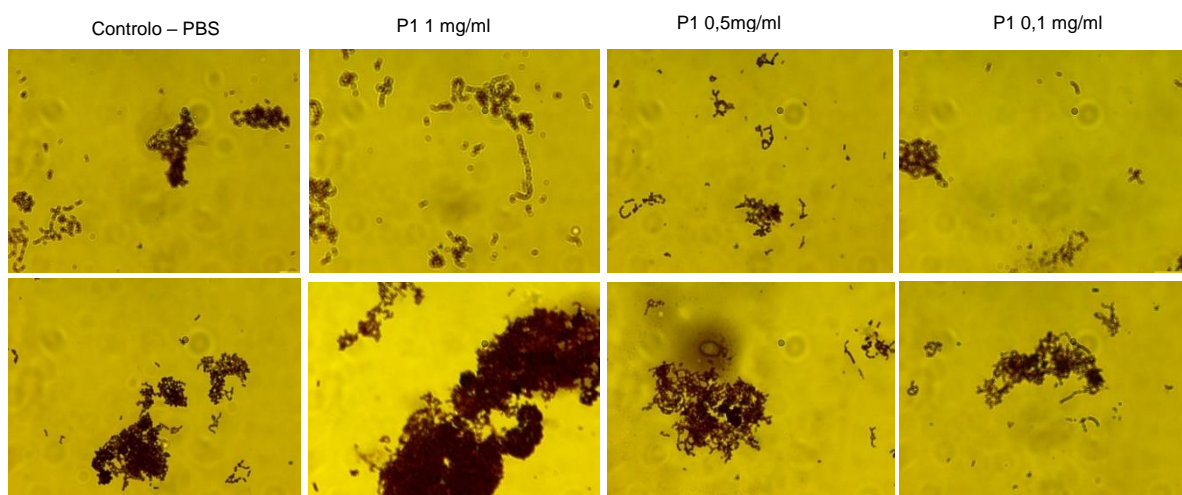


Figura 27. Imagem Microscópica 100x do ensaio 2 – P1

Ensaio 2 – Péptido 2

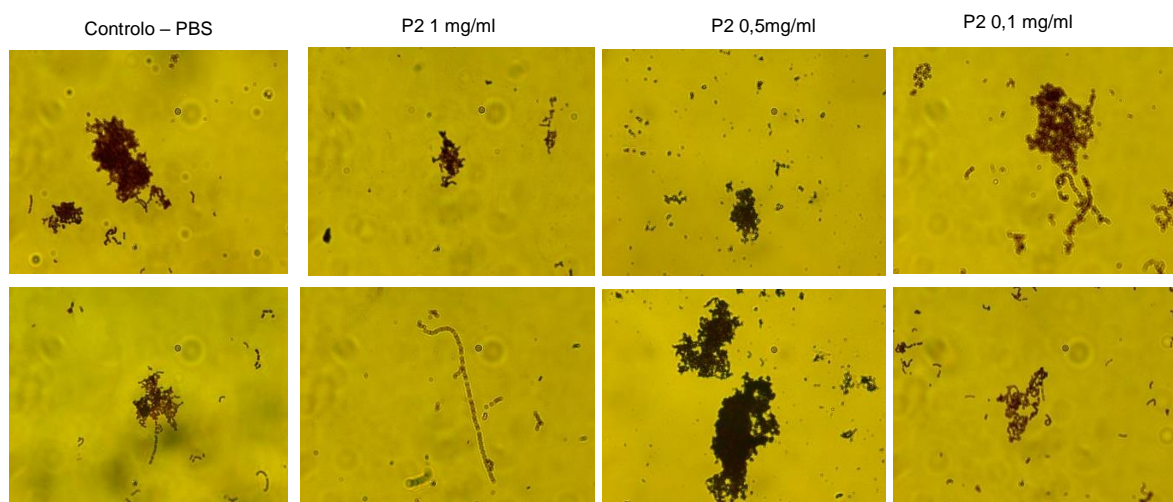


Figura 28. Imagem Microscópica 100x do ensaio 2 – P2

Na análise macroscópica, através de com aumento de 0,75xs, só se apresentam fotografias do ensaio 2 pois, é o que melhor traduz a otimização do protocolo (Fig. 29 e 30). Podemos observar que há uma tendência de aglomerados na periferia, junto ao halo da caneta hidrofóbica, e que proporcionalmente à concentração dos péptidos parece haver uma tendência de diminuição da aglomeração bacteriana. No centro também é possível observar alguma dispersão de bactérias.

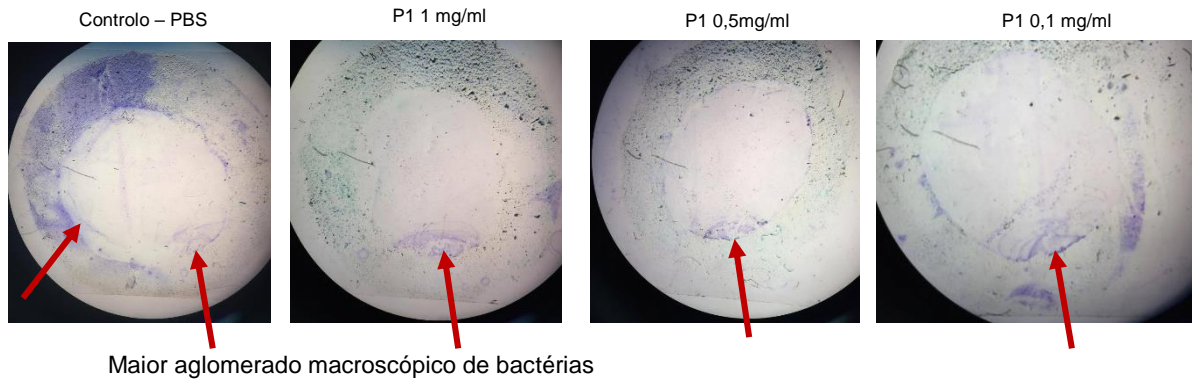


Figura.29. Imagem Macroscópica do ensaio 2 – P1

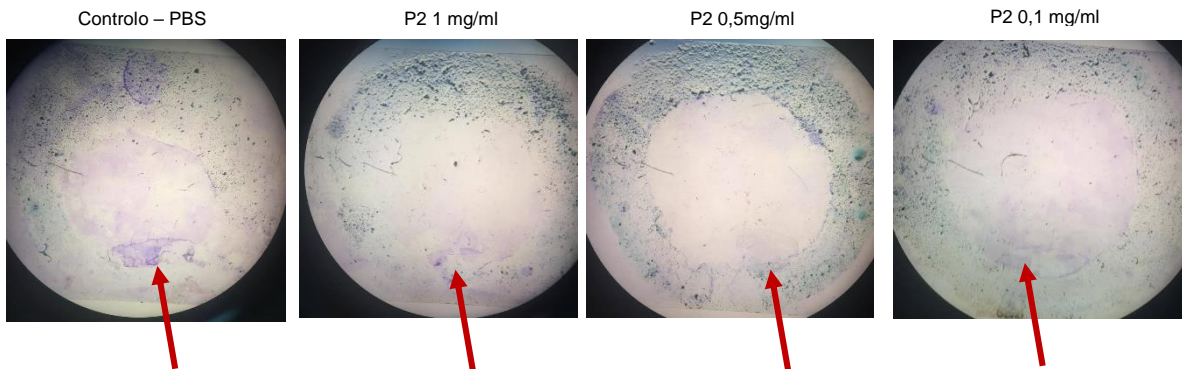


Figura 30. Imagem Macroscópica do ensaio 2 – P2

IV. Discussão

Partindo da identificação do problema que justifica a revisão do estado da arte dos antissépticos e do projeto de investigação houve a necessidade de identificar o problema presente na sociedade: o controlo da placa bacteriana é algo difícil de alcançar com rigor nos doentes e esse controlo da formação do biofilme é um desafio difícil, tanto a nível clínico, como a nível laboratorial.

Apesar de nos últimos 40, 50 anos se revelar um crescimento de conhecimento científico e industrial com introdução de novas formulações com sabores agradáveis e com combinações eficazes de vários agentes farmacológicos, a CHX continua a ser considerada o padrão de ouro na prevenção da placa e inflamação gengival e, pela avaliação do estado da arte, não se identificou nenhuma inovação de agentes terapêuticos.¹⁴ A avaliação da qualidade das revisões sistemáticas pode ser entendida como um parâmetro relativamente subjetivo. Várias são as guidelines disponíveis para realizar uma revisão sistemática e/ou meta-análise como o PRISMA, QUORUM, o Manual do Cochrane.^{23,52} No entanto, segundo o Centro de Medicina Dentária baseada na Evidência existem três questões chaves que todas as revisões devem responder: se o estudo é válido; quais os resultados apresentados; e se os resultados são relevantes.²³

A avaliação das publicações selecionadas neste trabalho foram avaliadas segundo o CASP.²³ Apesar das respostas às questões terem sido analisadas por dois revisores diferentes, alguma subjetividade poderá estar subjacente. O objetivo ao longo desta análise foi ter sempre uma janela crítica em relação ao artigo em questão, de forma a tentar estabelecer um padrão de avaliação entre todas as publicações selecionadas e responder à questão PICOT definida. Relativamente à avaliação da qualidade, quase todos os estudos incluídos apresentam parâmetros positivos a todas as questões CASP, exceto Van der Weijden FA *et al.*⁹ Chen Y *et al.*,³⁶ Hossainian N *et al.*³⁸ e Gunsolley JC.⁴⁰ Além disso, Van Leeuwen MP *et al.*³⁵ e Boyle P *et al.*¹³ apesar de se qualificarem positivamente em todas as questões, não definem claramente uma questão PICOT. Os autores Van der Weijden FA *et al.*,⁹ Chen Y *et al.*,³⁶ Hossainian N *et al.*³⁸ e Gunsolley JC⁴⁰ apresentam heterogeneidade considerável que não permite a realização de uma meta-análise e, este último, não avalia a qualidade dos estudos incluídos na revisão sistemática, sendo o artigo com mais baixa evidência relativamente aos restantes. Na generalidade, todos os artigos apresentam heterogeneidade, apesar da maior parte incluir RCT, que correspondem a um bom grau de evidência. Entre estes estudos existem variáveis transversais a todos: concentrações dos colutórios, regimes, diferentes índices para a avaliação da placa, inflamação gengival e controlos. Apesar disso, 9 das revisões sistemáticas admitem dentro dos seus estudos, graus de menor heterogeneidade que permitiram a realização de meta-análise, o que confere, um

maior grau de rigor científico. Esta análise qualitativa permitiu aferir que 7 dos estudos incluídos nesta revisão sistemática apresentam, segundo as questões CASP, um nível de evidência muito significativo. Outra consideração relevante é que todos os artigos apenas incluíram maioritariamente RCT e/ou CCT, o que se traduz na resposta positiva às questões colocadas. É pertinente referir, na avaliação CASP, que no parâmetro de implicação clínica todos as publicações recomendaram indicações úteis para a prática clínica, preconizando a CHX como o agente antiplaca de primeira linha.

A revisão sistemática de Van Strydonck DA *et al.*¹⁵ tem um bom nível de evidência, e demonstra que a CHX reduz em cerca de 33% e 26% os IP e IG, respetivamente. Valores semelhantes de eficácia deste colutório são encontrados nos restantes estudos.

Relativamente à análise descritiva da maioria das revisões incluídas - Van der Weijden FA *et al.*,⁹ Van Leeuwen MP *et al.*,³⁷ Berchier CE *et al.*,⁴¹ Gunsolley JC,⁴⁰ Van Strydonck DA *et al.*,¹⁵ - corroboram que a CHX é o colutório de primeira escolha e o que apresenta evidências mais robustas na redução dos índices de placa e gengival. No entanto, estudos que avaliaram a CHX a médio e longo prazo, demonstram efeitos adversos sugerindo limitações da sua utilização.

Relativamente aos OE, são avaliados principalmente em estudos a longo prazo. Van Leeuwen MP *et al.*,³⁵ Gunsolley,⁴⁰ Marcelo W.B. Araujo *et al.*,³⁴ Stoeken JE *et al.*,⁴³ admitem que os OE quando usados a longo prazo diminuem os IP e IG. No estudo de Stoeken JE *et al.*,⁴³ em 4 dos 8 artigos incluídos revelam eficácia superior a 15% relativamente aos OE. Inclusive, segundo Gunsolley JC,⁴⁰ comparando a CHX com os OE, relata que a nível do IG há redução de 28,7% da CHX para 18,2% dos OE e a nível do IP de 40,4% para 15,4%. No entanto, Van Leeuwen MP *et al.*³⁵ menciona que os OE comparados com a CHX, não apresentam diferenças em relação ao IG. Porém, a CHX apresenta maior deposição de cálculos e pigmentação.

Relativamente ao CPC, Haps S *et al.*,⁴² que apresenta parâmetros positivos em todas as questões CASP, conclui que o CPC usado como adjuvantes na higiene oral revela uma pequena mas significativa diferença quando comparado com modelos de escovagem ou com placebos na redução do índice de placa e gengival. No entanto, Gunsolley⁴⁰ admite que a evidência é inconclusiva para o uso de CPC.

O mesmo se transpõe para o peróxido de hidrogénio que, segundo Hossainian N *et al.*,³⁸ apresenta resultados inconclusivos a curto prazo. Apenas um estudo desta revisão admite que diminuem os sinais de inflamação gengival a longo prazo, o que não é possível de ser extrapolado. Efetivamente, existem outros agentes ativos com alguns efeitos interessantes, como os OE a longo prazo, ou o CPC, no entanto nenhum revelou eficácia superior à CHX.

Dos mais eficazes, a CHX e os OE, ambos apresentam efeitos adversos. Relativamente aos OE o principal problema numa utilização a longo prazo é o uso do álcool como excipiente, que apesar de não estar comprovado cientificamente a sua relação com o cancro oral, essa suspeita mantém-se em aberto.^{13,37} É uma questão que não está claramente elucidada e que merece consideração, sendo mais uma justificação para responder à necessidade de desenvolver novos agentes: o investimento neste projeto – BL – visa não só melhorar a eficácia, pretendendo alcançar um produto inovador com mecanismo de ação e substantividade superiores aos existentes, mas também ultrapassar os efeitos adversos dos colutórios existentes.

Com esta contextualização científica do estado da arte atual como ponto de partida, avançou-se para a identificação dos péptidos com potencial, como os estudados neste projeto de investigação. A sua identificação é neste momento sigilosa devido à possibilidade de patente e o futuro desenvolvimento num projeto de I&D para um produto comercial.

Os ensaios preliminares *in vitro* foram realizados com o intuito de fundamentar o princípio básico fundador do conceito biológico subjacente à ideia génese do projecto. Pretendeu-se, essencialmente, testar a metodologia experimental a nível da viabilidade das culturas com o agente bacteriano selecionado e avaliar vias alternativas de estudo com diferentes concentrações do péptido.

Os trabalhos desenvolvidos em laboratório, nesta fase inicial, possibilitaram a identificação de diversas limitações metodológicas e questões pertinentes que devem ser discutidas e analisadas, nomeadamente: caracterização da saliva utilizada, filtração e quantificação; otimização da distribuição dos péptidos em meio de cultura; identificação precisa da localização do péptido no substrato da cultura *in vitro*; histomorfometria da concentração bacteriana e controlo de variáveis.

Relativamente à caracterização da saliva, esta é constituída por 99% de água e 1% apenas de componentes inorgânicos e orgânicos.⁵³ Pela análise feita foi corroborada esta constituição de material orgânico da saliva liofilizada. Por análise química dos componentes sólidos aferiu-se que são de natureza glicoproteica e que quando liofilizados têm uma estrutura em rede porosa. A propósito da quantificação proteica salivar verificou-se que os métodos de centrifugação e filtração (com filtros de 0,22 µm que são indicados para retenção de bactérias) removem uma percentagem relativa de proteína. No entanto, a filtração da saliva foi um dos passos sobre o qual nos debatemos na prática laboratorial pois, devido à viscosidade desta, o seu processo de esterilização - para não desnaturar as proteínas que são essenciais neste projeto -, não poderia ser executado por autoclavagem. Outra opção seria a utilização de saliva artificial. Existem diversas formulações de salivas artificiais, tendo todas como base uma solução aquosa que pretendem mimetizar uma saliva humana constituída por sais minerais com maior relevância da cavidade oral (cálcio, fosfato), enzimas

e proteínas.⁵⁴ No entanto, a saliva humana representa uma complexa constituição em que cada componente desempenha funções singulares e sinérgicas, uma mistura complexa de secreções de produtos glandulares. Todas estas características são fundamentais para a adesão do biofilme e para o crescimento deste. Esta foi uma das principais razões pela qual se optou por usar saliva humana: mimetizar ao máximo o ambiente de formação da matriz do biofilme.

Adicionalmente, como apenas foi utilizada saliva de um indivíduo, projeta-se no futuro aumentar o número de amostras de saliva, assim como aumentar o número de amostras para a quantificação da proteína para aferir se a taxa de retenção proteica se mantém neste valor. No entanto, esta é uma limitação do projeto, dado que se verificou uma taxa de retenção cerca de 37% na saliva filtrada.

No que se refere à distribuição dos péptidos em meio de cultura, uma otimização do primeiro para o segundo ensaio foi a delimitação da área de trabalho - através de uma caneta hidrofóbica - uma vez que no primeiro ensaio não pudemos assumir que a mesma área que pipetámos a saliva, péptido e bactérias era a mesma pois, esta dispersava. Uma possibilidade de otimização será a utilização de placas multi-wells em vez de lâminas para confinar a solução a ser estudada numa área limitada.

Conjuntamente, a identificação precisa da localização do péptido no substrato da cultura *in vitro* e interação péptido-lâmina, péptido-proteínas salivares e péptido-bactérias passa pelo uso técnicas como o SPR – técnicas fidedignas e precisas que permitem aferir como se desenrolam precisamente estas interações.

Relativamente a outra limitação, a histomorfometria da concentração bacteriana, é necessário proceder-se à contagem precisa das colónias bacterianas, uma vez que neste protocolo não foi possível aferir quantitativamente o número de bactérias, devido à dispersão do campo de observação na lâmina e por limitações de índole temporal, que não possibilitaram a implementação de métodos de contagem mais adequados.

Foram suscitadas algumas questões que importa responder no futuro, de forma a controlar múltiplas variáveis que podem interferir nos estudos experimentais: “Não foram usadas proteínas inibidoras das enzimas (proteases). Poderão as enzimas da saliva humana ter degradado parcialmente os péptidos durante o tempo dos ensaios?”; “Qual o tempo exato de atuação dos péptidos?”; “O tempo de incubação dos péptidos com a saliva terá sido suficiente para permitir a ligação péptido-proteínas salivares?”; “O meio de diluição do péptido, PBS ou água, poderá influenciar as suas interações?”; “A manipulação do tempo de incubação e as concentrações dos péptidos poderão interferir significativamente?”.

Outro objetivo específico deste trabalho, foi analisar se os péptidos escolhidos poderiam ter algum impacto na adesão das bactérias. Os estudos apresentados para este fim, representam apenas o início de um protocolo experimental que se quer mais complexo e

elaborado. Devido a limitações de ordem temporal, apenas se conseguiu esboçar um estudo piloto de princípio de prova, com o intuito adicional de testar a viabilidade das culturas bacterianas no meio selecionado – saliva humana. Foi possível observar, principalmente, no ensaio 2 do péptido 2 na concentração de 1 mg/ml, uma tendência para a diminuição de agregados de bactérias. É de realçar que o péptido 2 é o que apresenta maior homologia com o *Streptococcus mutans*, o que pode fundamentar este fenómeno. Todavia, esta observação carece de validade científica porque não foi elaborada uma análise quantitativa da organização das bactérias, através de métodos histomorfométricos, nem uma avaliação ultraestrutural da adesão bacteriana. Se esta tendência for confirmada em trabalhos futuros, existe uma margem de progressão deste projeto de I&D, com potenciais perspetivas.

No que diz respeito a resultados desejáveis a nível da prática clínica, se um produto como o Biolocker for concretizado, seria expectável, no âmbito da Periodontologia, um benefício no controlo de placa e de inflamação gengival a nível de uma utilização preventiva nas patologias periodontais gerais, incluindo a gengivite e periodontite. A nível desta última, poderia ser particularmente útil na fase higiénica e de tratamento causal, auxiliando a promover mais rapidamente condições de estabilidade clínica para a transição para a fase corretiva, bem como um auxiliar importante na terapia de manutenção a longo prazo. Neste contexto, pretende-se ultrapassar os efeitos adversos da CHX, cuja utilização neste tipo de regimes de manutenção se encontra limitado devido aos seus efeitos adversos, e suplantando o uso de excipientes com álcoois pela reserva que ainda existe numa utilização prolongada. Este progresso poderia ser extrapolável para doentes com necessidades especiais e/ou capacidade motora diminuída.

Pretende-se, igualmente, configurar os péptidos, através de tecnologia de manipulação proteómica, para aumentarmos a sua substantividade comparativamente à CHX, aumentando o seu tempo de adesão às proteínas salivares/substrato dentário. Por outro lado, é desejável a aplicação em vários tipos de formulações não só como colutórios, mas também em géis, vernizes ou pastilhas.

Os testes e ensaios apresentados no presente trabalho são um ponto de partida de um projeto I&D com uma estimativa de 2 a 3 anos. O seu principal objetivo foi otimizar um possível protocolo laboratorial, controlando algumas variáveis básicas iniciais, no sentido de ir aumentando o grau de complexidade dos ensaios de molde a melhorar o grau analítico de previsão da tecnologia em causa. Neste momento o projeto encontra-se num nível de desenvolvimento TLR-3 (investigação suportada por um mínimo de investigação) e as perspetivas futuras são desenvolvê-lo a médio prazo, no período de tempo mencionado, até um nível TLR-5 (validação dos componentes da tecnologia em ambiente relevante). Posteriormente, ainda em contexto académico e universitário, pretende-se alcançar a plataforma de TLR-7 (demonstração do protótipo num ambiente operacional).

V. Conclusão

O presente trabalho possibilitou delinear as seguintes conclusões relativamente ao estado da arte sobre os antissépticos orais:

- A clorhexidina continua a ser o *gold standard* para o controlo químico do biofilme reduzindo cerca de 33% e 26% os IP e IG, respetivamente.
- Os óleos essenciais apresentam menor eficácia nos IP e IG que a CHX em estudos de curta duração mas são mais indicados a longo prazo.
- A eficácia do CPC e Peróxido de hidrogénico é inconclusiva em relação aos índices de placa e inflamação. O Delmopinol e os componentes naturais não apresentam eficácia significativa no controlo da placa bacteriana.

No âmbito do projeto I&D foi possível enunciar os seguintes resultados preliminares:

- A saliva humana pode ser utilizada com validade científica para este tipo de estudos *in vitro*, usando a centrifugação e filtração como métodos de esterilidade, uma vez que não se verificaram alterações significativas nas suas propriedades.
- Nos estudos anti-adesão dos péptidos, apesar das limitações inerentes, verificou-se uma aparente tendência em algumas concentrações para a inibição de criação de aglomerados bacterianos.
- Os estudos realizados possibilitaram detetar múltiplas limitações metodológicas, sendo imperioso utilizar técnicas mais fidedignas para caracterizar a adesão proteínas salivares-substrato, péptido-proteínas e bactérias-péptido/proteínas, no sentido de otimizar os estudos experimentais subsequentes.

VI. Bibliografia

1. P.Lang N, Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 6ª edição. 2015.
2. Shi W, Qi F. *NIH Public Access*. 2005;1(4):277–84.
3. Hamada T, Kawashima M, Watanabe H, Tagami J, Senpuku H. Molecular Interactions of Surface Protein Peptides of *Streptococcus gordonii* with Human Salivary Components. 2004;72(8):4819–26.
4. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1599–607.
5. Atsuo Amano. Host-parasite Interactions in Periodontitis: Subgingival Infection and Host Sensing. *Periodontol 2000*. 2010;52:7–11.
6. Graner ROM, Gonçalves RB, Hofling JF, Furlan LM. Aspectos microbiológicos da placa dental. 2005;1–16.
7. Li YH, Tian XL. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms: Bacterial Cooperation and Competition. *Stress Environ Regul Gene Expr Adapt Bact*. 2016;2:1197–205.
8. Relevance of biofilms in the oral cavity in the formation of dental plaque, caries and gum disease. In: *MicrobeWiki* [Internet]. Available from: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Relevance_of_biofilms_in_the_oral_cavity_in_the_formation_of_dental_plaque,_caries_and_gum_disease
9. Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/Gingivitis Control? *Dent Clin North Am*. 2015;59(4):799–829.
10. Moran JM. Home-use Preventive and Therapeutic Oral Products. *Periodontol 2000*. 2008;48:42–53.
11. Barreto E. Colutórios. In: *know.net*. 2015.
12. Ring M. *Dentistry. An Illustrated History*. 1985.
13. Boyle P. Oral diseases. 2014;20(January).
14. Supranoto SC, Slot DE, Addy MA, Van der Weijden GA. The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: A systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2015;13(2):83–92.
15. Van Strydonck DAC, Slot DE, Van Der Velden U, Van Der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2012;39(11):1042–55.
16. Ahg A, Fratura Radicular P AL, de caso clínico R, Batistin Zanatta F, Kuchenbecker Rösing C. Clorexidina: Mecanismo De Ação E Evidências Atuais De Sua Eficácia No Contexto Do Biofilme Supragengival Chlorhexidine: Action'S Mechanisms and Recent Evidences of It'S Efficacy Over Supragingival Biofilm Context. *Scientific-A*. 2007;1(2):35–43.

17. Sanchez, M.C., Llama- Palacios, A., Blanc V. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res.* 2011;46:252–260.
18. Paper O. Real-Time Monitoring of Streptococcus mutans Biofilm Formation Using a Quartz. 2007;92521:474–83.
19. Merwe PA Van Der. Surface plasmon resonance GENERAL PRINCIPLES OF BIACORE EXPERIMENTS. :1–50.
20. Council on Dental Therapeutics. Guidelines for acceptance of chemotherapeutic products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc.* 1986;112(4):529–32.
21. ACT by COTEC. COHITEC - Turning science into business [Internet]. 2012. Available from: www.actbycotec.com
22. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353–80.
23. Richards D. Critically Appraising Systematic Reviews. 2010;2008–11.
24. Fatima T, Rahim ZBHA, Lin CW, Qamar Z. Zinc: A precious trace element for oral health care? *J Pak Med Assoc.* 2016;66(8):1019–23.
25. Journal T, Society W, California S. Sodium hypochlorite (dilute chlorine bleach) oral rinse in patient self-care. 2016;(January 2015).
26. Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine-pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(7):1321–6.
27. Hwu YJ, Lin FY. Effectiveness of Propolis on Oral Health: A Meta-Analysis. *J Nurs Res.* 2014;22(4):221–30.
28. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol.* 2012;61(9):399–419.
29. Freires I., Silva IC., Alves L., Bezerra LM., Castro R. Clinical applicability of natural product (s) -containing mouthwashes as adjunctive treatment of biofilm-induced gingivitis : a systematic review. *Rev Bras PI Med.* 2012;14(4):700–11.
30. Amersham, Amersham, Asturias J a, Ibarrola I, Bartolomé B, Ojeda I, et al. Pollen Allergy. *Grana.* 2012;27(1):1–3.
31. Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent.* 2010;38(SUPPL. 1):S11–5.
32. Teles RP, Teles FRF. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res.* 2009;23(Special Issue 1):39–48.
33. Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: A systematic review and meta-analysis.

- J Clin Periodontol. 2015;42(S16):S106–38.
34. Araujo MWB, Ms DDS, Charles CA, Bs RDH, Weinstein RB, Ms JAM, et al. Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. J Am Dent Assoc. 2015;146(8):610–22.
 35. Van Leeuwen MPC, Slot DE, Van der Weijden GA. The effect of an essential-oils mouthrinse as compared to a vehicle solution on plaque and gingival inflammation: A systematic review and meta-analysis. Int J Dent Hyg. 2014;12(3):160–7.
 36. Chen Y, Wong RWK, McGrath C, Hagg U, Seneviratne CJ. Natural compounds containing mouthrinses in the management of dental plaque and gingivitis: A systematic review. Clin Oral Investig. 2014;18(1):1–16.
 37. Van Leeuwen MPC, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential Oils Compared to Chlorhexidine With Respect to Plaque and Parameters of Gingival Inflammation: A Systematic Review. J Periodontol. 2011;82(2):174–94.
 38. Hossainian N, Slot DE, Afennich F, Van Der Weijden GA. The effects of hydrogen peroxide mouthwashes on the prevention of plaque and gingival inflammation: A systematic review. Int J Dent Hyg. 2011;9(3):171–81.
 39. Afennich F, Slot DE, Hossainian N, Van Der Weijden GA. The effect of hexetidine mouthwash on the prevention of plaque and gingival inflammation: A systematic review. Int J Dent Hyg. 2011;9(3):182–90.
 40. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. J Dent. 2010;38(SUPPL. 1):S6–10.
 41. Berchier CE, Slot DE, Van Der Weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: A systematic review. J Clin Periodontol. 2010;37(9):829–39.
 42. Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. Int J Dent Hyg. 2008;6(4):290–303.
 43. Stoeken JE, Paraskevas S, van der Weijden G a. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. J Periodontol. 2007;78(7):1218–28.
 44. Center for evidence based dentistry.
 45. Simmonds E, France E, Hinde J, Allen L. Oral Care Market Forecast To Grow 22 Per Cent by 2018 [Internet]. 2014. Available from: <http://www.djsresearch.co.uk/HealthMarketResearchInsightsAndFindings/article/Oral-Care-Market-Forecast-To-Grow-22-Per-Cent-by-2018-01552>
 46. Sales of the leading mouthwash/dental rinse brands in the United States in 2016

- [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 18]. Available from: <https://www.statista.com/statistics/195543/sales-of-leading-us-mouthwash-brands-in-2012-and-2013/>
47. Younson J, Kelly C. The rational design of an anti-caries peptide against *Streptococcus mutans*. *Mol Divers*. 2004;8(2):121–6.
 48. Márcia F, Lavandeira F. Ensaios toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos. 2014;
 49. American Dental Association (1997) Acceptance Program Guidelines. Adjunctive Dental Therapies for the Reduction of Plaque and Gingivitis.
 50. American Dental Association (2008) Acceptance Program Guidelines Chemotherapeutics Products for Control of Gingivitis.
 51. Enterprise Europe Network. Marcação CE [Internet]. 2016. Available from: <https://www.een-portugal.pt/info/mercadounico/Paginas/marcacaoce.aspx>
 52. PRISMA 2009 Checklist PRISMA 2009 Checklist. 2009;2:1–2.
 53. Almeida PGA, Machado M, Lima AD AL. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Prat*. 2008;
 54. Cabral S. Saliva Natural vs Saliva Artificial : Composição Bioquímica Saliva Natural vs Saliva Artificial : Composição Bioquímica Serena Cabral. 2012;

VII. Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Sérgio Matos, por todo o conhecimento partilhado, toda a paciência dispensada, todas as respostas às minhas dúvidas existenciais. Um sincero obrigada por me fazer acreditar que sou capaz de concretizar este projeto, pela acessibilidade, por todo o apoio, boa disposição e por me fazer crescer como pessoa e como estudante ao longo deste percurso académico.

Agradeço ao meu coorientador, Daniel Abegão, por toda a atenção e conhecimento partilhado de uma área que até agora me era bem distante. Por toda a motivação e coragem que me proporcionou.

Agradeço à Dr^a.Gabriela Martins, pelas horas perdidas comigo, a fazer-me entender pela décima vez como funcionam os espectros vibracionais. Uma pessoa que revelou ter um coração de ouro.

Ao Dr. Filipe Antunes, agradeço por todo o dinamismo partilhado e sabedoria.

Agradeço à Professora Dr.^a Teresa Gonçalves por todos os ensinamentos que me permitiram progredir e crescer enquanto aluna e por me ter disponibilizado o seu laboratório.

Um especial obrigada à Dr^a.Marta Mota que foi, literalmente, o meu anjo da guarda no laboratório. Todo o conhecimento partilhado e toda a motivação que me fazia levantar a cabeça, um sincero obrigada. Que a vida me replete de pessoas assim: fantásticas.

Agradeço ao meu namorado, Nuno, por toda a paciência e segurança que me proporcionou ao longo destes anos, por nunca deixar de acreditar em mim. Um dos pilares da minha vida.

Agradeço às minhas três irmãs que sempre me apoiaram e fizeram aguentar firme nos momentos mais difíceis. Não posso deixar de agradecer também às minhas três irmãs caninas por todas as lambidelas carinhosas que enchem o meu coração. Agradeço também aos meus avós que me apoiaram em tudo o que podiam.

Agradeço a todas as minhas amigas, que por bom sinal, não posso escrever todos os nomes aqui, por toda a paciência que eu lhes roubei, por todos os abraços, força e amizade que me deixam com saudade de partir.

Por último, mas de todo, menos importante, queria agradecer do fundo do meu coração ao meu pai. O meu pilar, o meu objetivo de vida: dar tudo a quem me fez chegar onde estou. Apesar de a vida nem sempre ser fácil para ti, para nós, e estar constantemente a colocar-nos imprevistos, aprendi contigo que com força, perseverança e fé conseguem-se contornar esses obstáculos. Nem sempre é fácil pai, mas acredita que, apesar de não termos tudo o que poderíamos ter, nós as quatro, temos-te a ti. Espero nunca te desiludir. Isto é para ti.

VIII. Anexos

Lista de abreviaturas

QS – *Quorum sensing*

OE - Óleos essenciais

TRI – Triclosan

CHX – Clorhexidina

CPC - Cloreto de cetilpiridínio

HEX - Hexitidina

DEL - Delmipinol

CIM - Concentração mínima inibitória

MBC - Concentração bactericida mínima

QCM - Quartz Crystal Microbalance

SPR - Surface Plasmon Resonance

TRL – *Technology Readiness Level*

BL – Biolocker

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

MGI – Índice Modificado Gengival

LS – Índice Silness Løe

Tri/cop – Triclosan/copolímero

IP – Índice de Placa

IG – Índice Gengival

HO – Higiene Oral

CASP - *Critical Appraisal Skills Programme*

I&D – Projeto de investigação e desenvolvimento

FCTUC – Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

MOCOP – Medicina Oral, Cirurgia Oral e Periodontologia

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

YDP – *Yeast Peptone Dextrose*

BHI - Brain Heart Infusion

BSA – *Bovine Serum Albumin*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

MEV – Microscopia Eletrónica de Varrimento

FTIR – ART - *Fourier transformed infrared spectroscopy in attenuated total reflectance mode*

EMA - Agência Europeia de Medicamentos

FDA - *Food and Drug Administration*

IX. Índice

Resumo.....	II
Abstract	IV
I. Introdução.....	1
1. Formação do biofilme	1
2. Produtos orais terapêuticos e preventivos	3
2.1. Agentes terapêuticos e preventivos.....	3
3. Métodos de avaliação da eficácia das formulações.....	6
4. Contextualização do nível de desenvolvimento da tecnologia.....	8
5. Contextualização do propósito do projeto de investigação.....	9
6. Objetivos	10
II. Revisão Sistemática	12
A. Materiais e Métodos	12
A.1. Questão PICOT	12
A.2. Estratégia de Pesquisa	12
A.3. Critérios de Seleção.....	13
A.4. Pesquisa e seleção.....	14
A.5. Avaliação da qualidade metodológica	14
B. Resultados	15
B.1. Resultados da pesquisa e seleção	15
B.2. Avaliação descritiva dos artigos selecionados	16
B.3. Avaliação qualitativa	19
III. Projeto de Investigação	22
A. Materiais e Métodos	22
A.1. Estudo de mercado, elaboração da proposta e revisão bibliográfica.....	22
A.2. Testes <i>in vitro</i>	23
A.2.1. Caracterização dos péptidos	23
A.2.2. Preparação da saliva humana	25
A.2.3. Caracterização da saliva total	27
A.2.4. Observação dos efeitos dos péptidos na adesão das bactérias a proteínas da saliva <i>in vitro</i>	27
A.2.5. Trabalhos <i>in vitro</i> futuros.....	30
A.3. Desenvolvimento da formulação	30
A.4. Testes <i>ex vivo</i>	31
A.5. Otimização do produto final – Testes de toxicidade e segurança	31

A.6. Ensaio clínicos.....	31
A.7. Elaboração do produto final e aspetos legais	32
A.8. Comercialização	32
B. Resultados	33
B.1. Caracterização da saliva total.....	33
B.2. Preparação da saliva humana	37
B.2.1. Filtração da saliva	37
B.2.2. Quantificação da proteína.....	37
B.3. Observação dos efeitos dos péptidos na adesão das bactérias a proteínas da saliva – <i>in vitro</i>	39
IV. Discussão	42
V. Conclusão	47
VI. Bibliografia	48
VII. Agradecimentos	52
VIII. Anexos.....	53
IX. Índice	54