

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIBACTERIANA DE PASTAS DENTÍFRICAS EM BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÉNICAS: UM ESTUDO *IN VITRO*

Trabalho submetido por
Filipa Pereira Dias
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIBACTERIANA DE PASTAS DENTÍFRICAS EM BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÉNICAS: UM ESTUDO *IN VITRO*

Trabalho submetido por
Filipa Pereira Dias
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Alexandre Miguel Pereira Oliveira Santos

e coorientado por
Prof. Doutora Helena Barroso

setembro de 2023

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Doutor Alexandre Santos, por todas as suas valiosas contribuições e conhecimentos partilhados para a elaboração desta dissertação.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Helena Barroso, pela constante disponibilidade e ajuda tanto na parte laboratorial como ao longo da realização desta dissertação.

À Daniela Rente, por toda a ajuda que me deu durante a realização da experiência.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por me ter dado acesso ao Laboratório de Microbiologia e, principalmente, por ter sido a minha segunda casa durante os últimos 5 anos.

Aos meus pais e à minha avó, por acreditarem sempre em mim e nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Obrigada por serem o meu maior exemplo.

Ao meu namorado, Pedro, por toda a paciência e ajuda na elaboração desta dissertação, mas, principalmente, por ter sido o meu maior pilar ao longo destes últimos anos. Obrigada por me transmitires calma, confiança e felicidade.

Às minhas amigas, Marta e Flávia, por terem tornado estes 5 anos menos complicados. Obrigada por terem estado sempre presentes ao longo desta jornada.

À minha amiga, Micaela, uma das melhores pessoas que eu já conheci, por todos os momentos partilhados dentro e fora da clínica. Não podia ter pedido melhor colega de box.

À minha colega de casa, Matilde, por ter tornado a minha estadia na Caparica mais feliz e animada. Obrigada por todas as conversas sem fim.

Resumo

Objetivo: Este estudo experimental *in vitro* avalia a atividade antibacteriana de pastas dentífricas, comparando a eficácia das pastas dentífricas “não especializadas” com as “especializadas para as gengivas”. Visando verificar se as pastas especializadas são, ou não, mais eficazes no combate a bactérias periodontopatogénicas.

Materiais e métodos: Foi verificada a atividade antibacteriana de pastas dentífricas em *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, avaliando a inibição bacteriana pelo método de difusão em ágar (através da formação, ou não, de halo de inibição do crescimento). Nas pastas que formaram halo de inibição, verificou-se a capacidade de provocarem morte bacteriana. Nas que não formaram halo de inibição, através do teste de suspensão quantitativo, verificou-se a capacidade de redução do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/ml) após o contacto com as pastas durante 2 minutos.

Resultados: Todas as pastas dentífricas em estudo apresentaram efeito bactericida em *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Relativamente às pastas especializadas para as gengivas, as amostras de Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas e Arthrodont Classic Gengivas Irritadas provocaram a morte total das bactérias testadas e as de PerioGard Colgate e Parodontax Original provocaram reduções superiores a 10^5 UFC/ml em ambas as bactérias. Quanto às pastas não especializadas, a amostra de Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca provocou uma redução superior a 10^5 UFC/ml em ambas as bactérias, sendo que as restantes (Colgate Tripla Ação; Oral-B 1-2-3; Elgydium: Multi-Ação) apresentaram reduções superiores a 10^5 UFC/ml somente numa das bactérias.

Conclusão: Aparentam existir diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” e as “não especializadas”, sendo que as pastas “especializadas para as gengivas” aparentam ser mais eficazes que as “não especializadas”. Verificou-se também que aparentam existir diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” testadas.

Palavras-chave: Pastas Dentífricas; Doença Periodontal; Atividade Antibacteriana; Bactérias Periodontopatogénicas.

Abstract

Objective: This in vitro experimental study evaluates the antibacterial activity of toothpastes, comparing the effectiveness of “non-specialized” toothpastes with those “specialized for the gums”. Aiming to verify whether or not specialized toothpastes are more effective in combating periodontopathogenic bacteria.

Materials and methods: The antibacterial activity of toothpastes was verified against *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*, evaluating bacterial inhibition using the agar diffusion method (through the formation, or not, of a growth inhibition halo). In toothpastes that formed an inhibition halo, the ability to cause bacterial death was verified. In those that did not form an inhibition halo, the ability to reduce the number of colony-forming units per milliliter (CFU/ml) after contact with the toothpastes for 2 minutes was verified, through the quantitative suspension test.

Results: All toothpastes studied showed bactericidal effect against *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. Regarding specialized for the gums toothpastes, the samples of Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas and Arthrodont Classic Gengivas Irritadas caused the total death of the bacteria tested and those of PerioGard Colgate and Parodontax Original caused reductions of more than 10^5 CFU/ml in both bacteria. As for non-specialized toothpastes, the Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca sample caused a reduction of more than 10^5 CFU/ml in both bacteria, while the remainder (Colgate Tripla Ação; Oral-B 1-2-3; Elgydium: Multi-Ação) showed reductions greater than 10^5 CFU/ml in just one of the bacteria.

Conclusion: There appear to be differences in antibacterial effectiveness between “specialized for the gums” and “non-specialized” toothpastes, with “specialized for the gums” toothpastes appearing to be more effective than “non-specialized” toothpastes. It was also found that there appeared to be differences in antibacterial effectiveness between the “specialized for the gums” toothpastes tested.

Keywords: Toothpastes; Periodontal Disease; Antibacterial Activity; Periodontopathogenic Bacteria.

Índice Geral

I. INTRODUÇÃO	15
II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	17
1. Doença periodontal.....	17
1.1. Diagnóstico periodontal	17
1.2. Nova classificação das doenças periodontais.....	18
1.3. Epidemiologia	20
1.4. Fatores de risco.....	20
1.5. Placa bacteriana.....	23
1.6. Microbiota oral da doença periodontal.....	24
1.6.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	26
1.6.2. <i>Prevotella intermedia</i>	29
1.7. Resposta do sistema imunológico do hospedeiro.....	30
2. Pastas dentífricas	32
2.1. Composição básica	33
2.1.1. Abrasivos	33
2.1.2. Humectantes.....	33
2.1.3. Surfactantes/ Detergentes	33
2.1.4. Aglutinantes/ Espessantes.....	34
2.1.5. Conservantes	34
2.1.6. Corantes	34
2.1.7. Aromatizantes e adoçantes.....	35
2.1.8. Água.....	35
2.2. Agentes antimicrobianos	35
2.3. Classificação de pastas dentífricas	35
2.3.1. Pasta dentífrica para a prevenção e tratamento da cárie dentária	36
2.3.2. Pasta dentífrica para a prevenção e tratamento da doença periodontal	36
2.3.3. Pasta dentífrica para o tratamento da hipersensibilidade.....	38
2.3.4. Pasta dentífrica para o branqueamento dentário	39
2.3.5. Pasta dentífrica com finalidade específica.....	40
2.4. Controlo químico da placa bacteriana.....	40
2.5. Regulamentos da Comissão Europeia e selo de aceitação da <i>American Dental Association</i> (ADA).....	41
III. OBJETIVOS E HIPÓTESES	43
1. Objetivos do estudo	43

2. Hipóteses do estudo	43
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	45
1. Tipo de estudo e local da realização do estudo	45
2. Estirpes bacterianas utilizadas	45
3. Amostra	45
4. Composição química das pastas dentífricas	46
5. Questão PICOST	48
5.1. População (P)	48
5.2. Intervenção (I)	49
5.3. Comparação (C)	49
5.4. Resultados (O).....	49
5.5. Desenho do estudo (S).....	49
5.6. Tempo (T)	50
6. Metodologia.....	51
6.1. Método de difusão em ágar	51
6.2. Método turbidimétrico.....	52
6.3. Teste de suspensão quantitativo	52
7. Protocolo experimental.....	52
V. RESULTADOS	57
1. Verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas.....	57
1.1. Resultados das amostras de pastas “não especializadas” em <i>Porphyromonas gingivalis</i>	57
1.2. Resultados das amostras de pastas “não especializadas” em <i>Prevotella intermedia</i>	58
1.3. Resultados das amostras de pastas “especializadas para as gengivas” em <i>Porphyromonas gingivalis</i>	59
1.4. Resultados das amostras de pastas “especializadas para as gengivas” em <i>Prevotella intermedia</i>	60
1.5. Resultados de todas as amostras de pastas dentífricas estudadas em <i>P. gingivalis</i> e <i>P. intermedia</i>	61
2. Verificação da atuação bactericida ou bacteriostática das amostras das pastas dentífricas com formação de halo de inibição do crescimento com diâmetro suficiente para realizar sub-inoculação em ambas as bactérias.....	61
3. Verificação da redução do número de UFC/ml quando não há formação de halo de inibição do crescimento ou o halo formado não permite efetuar a sub-inoculação devido ao seu diâmetro reduzido	62
4. Comparação da eficácia antibacteriana das pastas dentífricas em estudo	64

VI. DISCUSSÃO.....	65
1. Verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas.....	65
2. Verificação da atuação bactericida ou bacteriostática das amostras das pastas dentífricas com formação de halo de inibição do crescimento com diâmetro suficiente para realizar sub-inoculação em ambas as bactérias.....	66
3. Verificação da redução do número de UFC/ml quando não há formação de halo de inibição do crescimento ou o halo formado não permite efetuar a sub-inoculação devido ao seu diâmetro reduzido	69
4. Comparação da eficácia antibacteriana das pastas dentífricas em estudo	72
VII. CONCLUSÃO	75
VIII. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	77
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática dos complexos microbianos de Socransky (Socransky & Haffajee, 2005).....	25
Figura 2 - Esquematização do estudo de investigação experimental	49
Figura 3 - Esquematização do método de difusão em ágar para verificar a atividade antibacteriana das pastas dentífricas em <i>P. gingivalis</i>	50
Figura 4 - Esquematização do método de difusão em ágar para verificar a atividade antibacteriana das pastas dentífricas em <i>P. intermedia</i>	50
Figura 5 - Imagem representativa da zona de onde foi retirado o fragmento de gelose para efetuar a sub-inoculação.	54
Figura 6 - Representação esquemática das diluições em série da suspensão bacteriana para inoculação no meio	54
Figura 7 - Representação esquemática do ensaio quantitativo com a solução de pasta dentífrica.....	55
Figura 8, 9 e 10 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas COLG-3A, OB123, EL-MULT e AQUA-3P em <i>P. gingivalis</i> . ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.	57
Figura 11, 12 e 13 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas COLG-3A, OB123, EL-MULT e AQUA-3P em <i>P. intermedia</i> . ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.	58
Figura 14, 15 e 16 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas PTAX, PGARD, EL-PBG e AC-GI em <i>P. gingivalis</i> . ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.....	59
Figura 17, 18 e 19 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas PTAX, PGARD, EL-PBG e AC-GI em <i>P. intermedia</i> . ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.....	60
Figura 20 - Ensaio para verificação da atividade bactericida ou bacteriostática das amostras de AC-GI em <i>P. gingivalis</i> e <i>P. intermedia</i>	62
Figura 21 - Ensaio para verificação da atividade bactericida ou bacteriostática das amostras de EL-PBG em <i>P. gingivalis</i> e <i>P. intermedia</i>	62

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Pastas dentífricas utilizadas no estudo	45
Tabela 2 - Composição Química das Pastas Dentífricas adaptada do Radzki et al. (2022)	46
Tabela 3 - Grupos de estudo	48
Tabela 4 - Verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas através da identificação da formação de halo de inibição do crescimento	61
Tabela 5 - Contagem e redução de UFC/ml de <i>P. gingivalis</i>	63
Tabela 6 - Contagem e redução de UFC/ml de <i>P. intermedia</i>	63
Tabela 7 - Quadro síntese da atividade antibacteriana apresentada pelas pastas dentífricas testadas em <i>P. gingivalis</i> e em <i>P. intermedia</i>	64

Lista de abreviaturas, acrónimos, siglas e símbolos

AC-GI - Arthrodont Classic Gengivas Irritadas

ADA - *American Dental Association* (Associação Americana de Medicina Dentária)

ADE - Água Destilada Estéril

APTE - Água Peptonada Tamponada Estéril

AQUA-3P - Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca

CHX - Clorohexidina

COLG-3A - Colgate Tripla Ação

CPC - Cloreto de Cetilpiridínio

DGS - Direção-Geral de Saúde

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EL-MULT - Elgydium: Multi-Ação

EL-PBG - Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas

F⁻ - Ião de Flúor

HbA1c - Hemoglobina Glicada

HF - Hidrofluoreto

IL - Interleucina

K⁺ - Ião de Potássio

LPS - Lipopolissacarídeos

MALT - Tecido Linfoide Associado à Mucosa

MMP - Metaloproteinase de Matriz

OB123 - Oral-B 1-2-3

OMVs - Vesículas da Membrana Externa

OPG – Osteoprotegerina

PEG - Polietilenoglicol

PGARD - PerioGard Colgate

P. gingivalis - *Porphyromonas gingivalis*

P. intermedia - *Prevotella intermedia*

PTAX - Parodontax Original

RANK - Recetor Ativador do Fator Nuclear – κB

RANKL - Ligante do Recetor Ativador do Fator Nuclear – κB

RNA - Ácido Ribonucleico

Sn²⁺ - Ião de Estanho

Th - Células T-helper

TNF - Fator de Necrose Tumoral

Tregs - Células T Reguladoras

UFC/ml - Unidades Formadoras de Colónias por Mililitro

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

I. INTRODUÇÃO

A cavidade oral pode ser considerada um “espelho” da saúde geral de um indivíduo, além disso a saúde oral demonstra ser um fator importante na manutenção da saúde, bem-estar e qualidade de vida. A higiene oral é a medida mais importante para a preservação da saúde oral e prevenção da doença periodontal e da cárie dentária (Agrawal & Gupta, 2020; Peres et al., 2019; Valkenburg et al., 2019).

As doenças orais são um problema global de saúde pública com particular preocupação para diversos países de baixo e médio-baixo rendimento em que se estima um aumento do número de casos de doenças orais, em parte devido a práticas inadequadas de higiene oral, à exposição inadequada ao flúor, à falta de acesso a serviços de higiene oral, bem como ao consumo de álcool, tabaco e produtos alimentares com alto teor de açúcar (Iba & Adamu, 2021; Peres et al., 2019; WHO, 2022).

Atualmente, estão disponíveis, e facilmente acessíveis, diversos produtos de higiene oral, como escova de dentes, pasta dentífrica, colutório e fio dentário, que podem ser utilizados para o controlo da placa bacteriana na cavidade oral, prevenir as doenças orais, manter a estética e prevenir a halitose, mantendo assim uma boa higiene oral. A escovagem dentária é um método essencial e adequado para a remoção mecânica da placa bacteriana, quimicamente auxiliado pelos compostos presentes nas pastas dentífricas. Recomenda-se uma escovagem com duração de 2 a 3 minutos, pelo menos 2 vezes por dia, em combinação com o uso de fio dentário ou de outro produto auxiliar de limpeza interdentária (Agrawal & Gupta, 2020; Iba & Adamu, 2021; Valkenburg et al., 2019).

Durante a seleção dos produtos de higiene oral, os indivíduos apresentam dificuldade na escolha da pasta dentífrica mais adequada para as suas necessidades e problemas. Existem diversos fatores que influenciam a seleção do produto de higiene oral como o poder de compra (preço), as propriedades do produto (sabor, cor e aparência) e a publicidade nos media. Talvez por este motivo, muitos indivíduos consultam os profissionais de saúde oral em busca da pasta dentífrica mais eficaz. Sendo que, idealmente, os médicos dentistas recomendam a pasta dentífrica com base nas necessidades específicas de cada paciente e na natureza dos seus problemas de saúde oral (Agrawal & Gupta, 2020; Subramanian et al., 2017; Umanah & Braimoh, 2017).

II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. Doença periodontal

A doença periodontal é um processo patológico que afeta o periodonto, estrutura responsável pelo suporte dos dentes e que inclui o tecido gengival, o osso alveolar, o cemento e o ligamento periodontal. É uma doença inflamatória multifatorial associada a uma disbiose da microbiota oral, resultante de um aumento de bactérias anaeróbias Gram-negativo no biofilme oral e desencadeada por uma resposta imunológica do hospedeiro a essas bactérias (Gasner & Schure, 2023; Kinane et al., 2017; Minty et al., 2019).

A doença periodontal engloba a gengivite e a periodontite. A gengivite caracteriza-se como uma inflamação gengival que ocorre devido a uma acumulação de placa bacteriana, mas sem perda de inserção do tecido conjuntivo. É uma condição que afeta cerca de 90% da população, mas que pode ser reversível com mudanças no estilo de vida e melhoria dos hábitos de higiene oral. Quando a condição periodontal progride para além da gengivite, designa-se de periodontite. A periodontite é uma inflamação crónica e irreversível em que a presença de inflamação gengival leva à perda de inserção, o que consequentemente contribui para a formação de bolsas periodontais e possibilidade de perda dentária (Gasner & Schure, 2023; Kinane et al., 2017; Madiba & Bhayat, 2018).

1.1. Diagnóstico periodontal

Antes de iniciar o diagnóstico periodontal, é importante perceber quais as queixas e as expectativas do paciente em relação ao tratamento, bem como obter uma minuciosa história clínica e, assim, identificar potenciais fatores de risco modificáveis ou não modificáveis para a doença periodontal como, por exemplo, a diabetes *mellitus* e o tabagismo. O diagnóstico periodontal inclui a avaliação de diversos parâmetros clínicos como a profundidade de sondagem, a hemorragia à sondagem, o nível de inserção clínica, os defeitos de furca, a mobilidade dentária e o trauma oclusal que avaliam a extensão e a gravidade atual da doença periodontal, apesar de não conseguirem prever a atividade futura desta doença. Através de exames complementares de diagnóstico tais como radiografias, é possível determinar a extensão da perda óssea alveolar horizontal e vertical (Kwon et al., 2021; Salvi et al., 2023).

Um periodonto saudável consiste numa gengiva rosa, firme, pontilhada e bem-adaptada ao osso subjacente e apresenta uma profundidade de sondagem de 1 a 3 mm, não possuindo sinais de hemorragia à sondagem (Gasner & Schure, 2023).

Na presença de periodontite verifica-se uma gengiva vermelha com textura alterada, aumento da profundidade de sondagem (bolsas periodontais superiores a 3mm), hemorragia à sondagem, destruição das estruturas de suporte dentário, recessão ou aumento da margem gengival, aumento da mobilidade dentária e, conseqüentemente, perda dentária. A doença periodontal é indolor com exceção dos casos em que há deslocamento dentário ou aparecimento de abscessos (Gasner & Schure, 2023; Kinane et al., 2017).

A ausência de hemorragia à sondagem pode ser considerada um indicador muito confiável para a estabilidade periodontal, representando a saúde periodontal com um valor preditivo negativo de 98% a 99%. Já a presença de hemorragia à sondagem tem um valor preditivo positivo baixo, uma vez que podem existir outros fatores que podem não estar relacionados diretamente com a acumulação de placa bacteriana e causar hemorragia gengival, como, por exemplo, a deficiência de vitamina C ou a terapêutica com aspirina. Para além disso, fatores como a dimensão da sonda, a angulação da sonda e a pressão aplicada podem afetar a avaliação da inflamação gengival, isto é, a presença ou ausência de hemorragia gengival. A pressão aplicada durante a profundidade de sondagem não deve ser superior a 0,25 N (Lang & Bartold, 2018).

O diagnóstico da doença periodontal deve ser preciso e precoce, já que a perda óssea e de tecido mole ocorre de forma progressiva e é, maioritariamente, irreversível. No entanto, numa fase inicial de gengivite, apesar de os pacientes terem hemorragia durante a escovagem dentária, tendem a não sentir dor, o que faz com que raramente recorram ao médico dentista por esse motivo (Kinane et al., 2017; Neves et al., 2019).

1.2. Nova classificação das doenças periodontais

Em 2017, foi adotado um novo esquema de classificação da doença periodontal no “Workshop Mundial de Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares” que decorreu em Chicago (Caton et al., 2018).

De acordo com a nova classificação, a saúde gengival clínica está geralmente associada a um infiltrado inflamatório e a uma resposta do hospedeiro compatível com

homeostase, sendo caracterizada pela ausência de hemorragia à sondagem, de eritema, de edema e de sintomas do paciente. Podendo existir num periodonto intacto, onde há ausência de perda óssea e de inserção clínica, ou num periodonto reduzido (com periodontite estável ou sem periodontite), onde há perda de inserção clínica e reduzido nível ósseo. Um caso de saúde periodontal num periodonto intacto ou reduzido de um paciente sem periodontite é caracterizado pela existência de hemorragia à sondagem menor que 10% e valores de profundidade de sondagem menores ou iguais a 3 mm. No entanto, é importante ter em conta que um caso de saúde periodontal num periodonto reduzido de um paciente com periodontite estável possui um maior risco de recorrência da doença em comparação com um paciente sem histórico de periodontite e apresenta valores de profundidade de sondagem menores ou iguais a 4 mm e hemorragia à sondagem menor que 10% (Chapple et al., 2018).

A gengivite pode ser dividida em dois tipos: gengivite induzida por placa dentária e doenças gengivais não induzidas por placa dentária. A gengivite induzida por placa dentária é definida como uma lesão inflamatória que resulta da interação entre o biofilme dentário e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, que permanece contida na gengiva e não se estende aos tecidos periodontais de inserção (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar). Pode ser reversível através da redução dos níveis de placa dentária na margem gengival. Um caso de gengivite num periodonto intacto ou num periodonto reduzido (sem periodontite ou com periodontite estável) é caracterizado pela existência de hemorragia gengival maior ou igual a 10% e valores de profundidade de sondagem menores ou iguais a 3 mm. No entanto, é importante ter em conta que os pacientes com periodontite estável apresentam um alto risco de recorrência de periodontite (Chapple et al., 2018).

A periodontite é uma doença inflamatória crónica multifatorial associada a um biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos de suporte dentário. As suas principais características incluem a perda de tecido de suporte periodontal, manifestado através da perda de inserção clínica e da perda de osso alveolar, bem como da presença de bolsas periodontais e hemorragia à sondagem (Papapanou et al., 2018).

Clinicamente, é considerado um caso de periodontite se uma perda de inserção interproximal for detetada em dois ou mais dentes não adjacentes ou se uma perda de inserção clínica ≥ 3 mm com bolsas ≥ 3 mm em vestibular ou lingual/palatina for

detetada em pelo menos dois dentes, sendo que a perda de inserção clínica não pode ser atribuída a causas não relacionadas com a periodontite (Papapanou et al., 2018).

Com a nova classificação, a periodontite pode existir sob 3 formas: a periodontite necrosante, a periodontite como manifestação direta de doenças sistémicas e a “periodontite”. A “periodontite” pode ser caracterizada consoante o seu estadio e grau. O estadio (I a IV) depende da severidade da doença e da presença de fatores de complexidade, podendo ser classificado consoante a sua extensão e distribuição. O grau (A a C) representa a taxa de progressão da doença e avalia o risco de a doença afetar de forma negativa a saúde geral do indivíduo (Papapanou et al., 2018).

1.3. Epidemiologia

A doença periodontal é considerada um problema de saúde pública, representando a sexta doença mais comum em todo o mundo. Em Portugal, de acordo com o Inquérito Nacional de Saúde Oral da Direção-Geral de Saúde (DGS), em 2015, a prevalência de periodontite era de 10,8% na faixa etária dos 35 aos 44 anos e de 15,3% na faixa etária dos 65 aos 74 anos. No entanto, de acordo com a *Global Burden of Disease*, a prevalência da doença periodontal em Portugal está em crescimento contínuo e acima da média mundial (Machado et al., 2020). Um estudo recente estima que a prevalência de periodontite varie entre os 41,2% e os 69% para os municípios caracterizados como periurbanos e urbanos, a maioria deles localizados na Área Metropolitana de Lisboa (Antunes et al., 2020).

1.4. Fatores de risco

Sendo a doença periodontal uma doença multifatorial, esta surge como resultado de fatores de risco modificáveis, nomeadamente o tabagismo, a má higiene oral, a diabetes *mellitus* e a gravidez, e de fatores de risco não modificáveis, como a idade e os fatores genéticos. Ainda assim, o seu principal fator etiológico é a placa bacteriana (Gasner & Schure, 2023; Harvey, 2017).

O tabagismo, o principal fator de risco modificável da doença periodontal, está associado a um aumento do risco e da gravidade da doença periodontal e a uma diminuição da eficácia do tratamento desta doença. Os fumadores possuem um maior nível de perda óssea, uma maior perda de inserção periodontal, bolsas periodontais mais profundas, tal como uma maior perda dentária em comparação com os não fumadores

(Gasner & Schure, 2023; Kinane et al., 2017; Madiba & Bhayat, 2018). O efeito do tabaco na composição da microbiota oral, na resposta imunológica e na capacidade de cicatrização do periodonto são os potenciais mecanismos responsáveis pelo efeito do tabagismo na doença periodontal. Assim, admite-se que o tabaco pode provocar uma mudança na composição do biofilme subgingival com um aumento da prevalência de bactérias periodontopatogénicas. Para além disso, defende-se que pode levar ao atraso do recrutamento e migração de neutrófilos para os tecidos periodontais, comprometendo assim os mecanismos de imunidade inata e aumentando o limiar de agressão aos tecidos periodontais para iniciar a cascata inflamatória. Também foram encontradas concentrações mais elevadas de elastase e metaloproteinase de matriz (MMP)-8 e MMP-9 com atividade proteolítica e níveis mais baixos de inibidores de protease, como alfa-2-macroglobulina e α -1-antitripsina. Assim, uma maior atividade colagenolítica em conjunto com uma proporção reduzida de vasos sanguíneos gengivais pode comprometer a capacidade de cicatrização periodontal (Leite et al., 2018). A inflamação dos tecidos periodontais normalmente gera hemorragia gengival durante a sondagem periodontal ou até mesmo durante a escovagem dentária. No entanto, os pacientes fumadores possuem menor hemorragia gengival devido ao efeito vasoconstritor do tabaco, o que contribui para a camuflagem da doença periodontal (Kinane et al., 2017; Santos et al., 2021).

Uma higiene oral inadequada provoca uma acumulação de bactérias e placa bacteriana, desempenhando um papel importante no início e no desenvolvimento da doença periodontal (Gasner & Schure, 2023; Nazir, 2017).

A diabetes *mellitus* aumenta a prevalência e a gravidade da doença periodontal, em especial naqueles indivíduos que possuem a diabetes mal controlada. A saúde periodontal, em diabéticos, é afetada através da redução da renovação dos tecidos e do enfraquecimento dos mecanismos de defesa imunológica, ocorrendo uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e uma menor eliminação de agentes periodontopatogénicos. Por outro lado, a doença periodontal pode influenciar o controlo metabólico da diabetes devido a um aumento da carga inflamatória e da resistência à insulina. Deste modo, conclui-se que a diabetes *mellitus* e a doença periodontal têm uma relação bidirecional (Kinane et al., 2017; Neves et al., 2019). A análise da hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue fornece evidências sobre os níveis médios de glicose no sangue de um indivíduo nos últimos dois a três meses e é o parâmetro utilizado para

representar a influência da diabetes *mellitus* na taxa de progressão da periodontite (Papapanou et al., 2018; Sherwani et al., 2016). Deste modo, a diabetes *mellitus* representa um modificador do Grau de periodontite. Assim, um indivíduo com periodontite Grau A tem de ser normoglicémico, não possuindo diagnóstico de diabetes *mellitus*. Para ser considerada periodontite Grau B, o indivíduo tem de possuir níveis de HbA1c inferiores a 7%. No entanto, se possuir a HbA1c com níveis iguais ou superiores a 7%, é considerada periodontite Grau C (Papapanou et al., 2018).

A gravidez está associada a oscilações significativas nas hormonas sexuais femininas, sendo que essas oscilações se correlacionam com um aumento na prevalência e na gravidade da inflamação gengival. Há estudos que mostram que grávidas com doença periodontal têm maior risco de sofrer efeitos adversos na gravidez, como pré-eclâmpsia, parto pré-termo e baixo peso à nascença, no entanto alguns estudos não conseguiram confirmar essas associações. Ainda assim, o tratamento periodontal numa grávida é recomendado, uma vez que é seguro tanto para a mãe como para o feto, e mesmo que não reduza o risco de efeitos adversos na gravidez, melhora a saúde oral da grávida (Bobetsis et al., 2020; Daalderop et al., 2018).

Com o avançar da idade, ocorre um aumento da prevalência da doença periodontal nos idosos, verificando-se uma diminuição do número de fibras do ligamento periodontal, da vascularização e da capacidade de cicatrização do osso alveolar. A resposta inflamatória nos idosos ocorre de forma mais dificultada o que pode deixá-los mais suscetíveis à doença periodontal. Ainda assim, a doença periodontal pode não ser causada apenas pelo envelhecimento celular, podendo ser o resultado de diversos fatores, nomeadamente a exposição prolongada a bactérias periodontopatogénicas associada a doenças sistémicas, ao comprometimento motor e imunológico e a substâncias químicas, tais como o álcool e o tabaco (Madiba & Bhayat, 2018; Rocha et al., 2019).

A genética tem sido considerada um fator de risco para o início e progressão da doença periodontal. Esta predisposição genética é possivelmente conferida por um conjunto de genes, deste modo sugere-se que os polimorfismos genéticos associados aos genes envolvidos na produção de citocinas podem influenciar a patogénese da doença periodontal. A hipótese atual propõe que o fenótipo específico da doença periodontal pode ser o resultado de combinações de múltiplos alelos de risco genético e das suas

interações com fatores internos e externos (Kinane et al., 2017; Prashanthi et al., 2021; Schaefer, 2018).

1.5. Placa bacteriana

A placa bacteriana consiste num biofilme complexo, isto é, num ecossistema de microcolónias de bactérias envolvidas por uma matriz protetora composta por glicoproteínas e polissacarídeos extracelulares, tornando-as mais resistentes aos agentes antimicrobianos. O biofilme possui canais circulatórios que permitem a entrada de nutrientes e a saída de resíduos ou metabolitos. Além disso, possui *Quorum sensing*, o que permite que os microrganismos comuniquem entre si, e *Autoinducers*, que são moléculas secretadas pelas bactérias que regulam a expressão génica. Dentro deste ecossistema, existem microambientes com diferentes pH e diversas concentrações de metabolitos e produtos químicos, permitindo a existência de diferentes espécies. Deste modo, há uma maior diversidade de bactérias, levando a infeções mistas mais difíceis de tratar (Harvey, 2017; Mehrotra & Singh, 2023).

A placa bacteriana não pode ser eliminada com bochechos ou pela ação de um jato de água, ao contrário da matéria alba que, como não está fisicamente aderida a nenhuma superfície, é facilmente eliminada. Se a placa dentária não for removida, esta irá sofrer um processo de mineralização e levar à formação de cálculo dentário (Harvey, 2017).

Após a escovagem dentária, em segundos, origina-se a película adquirida, uma camada acelular formada por glicoproteínas salivares, lípidos, mucina, produtos extracelulares e fosfoproteínas nas superfícies dentárias. De seguida, surgem os colonizadores primários, que são bactérias predominantemente Gram-positivo anaeróbicas facultativas, como as espécies *Streptococcus* e *Actinomyces*. Mais de 80% do biofilme inicial, é composto por *Streptococcus*, sendo considerada a principal espécie de colonizadores precoces no biofilme oral (Aruni et al., 2015; Aspinall et al., 2021; Harvey, 2017; Mehrotra & Singh, 2023).

A adesão dos colonizadores primários ocorre através do reconhecimento e da ligação das adesinas que se projetam da superfície bacteriana às proteínas ricas em prolina da película. Estas ligações levam a uma alteração conformacional das proteínas ricas em prolina e, conseqüentemente, à disponibilidade de locais recetores denominados “criptítapos”. Através de coagregação, há uma deposição de placa bacteriana que se liga aquela já existente, levando a uma deficiência de oxigénio e,

eventualmente, à colonização de bactérias maioritariamente anaeróbias Gram-negativo, bastonetes ou filamentosas (Harvey, 2017; Mehrotra & Singh, 2023). A coagregação é um processo específico em que bactérias geneticamente distintas se ligam umas às outras através da interação entre adesinas proteicas, localizadas na parede celular ou nas fimbrias, e recetores de polissacarídeos, sendo este um dos mecanismos mais importantes para a formação do biofilme oral. Assim, os colonizadores secundários ligam-se às bactérias que se encontram previamente ligadas à superfície dentária (Hojo et al., 2009; Rickard et al., 2003). O microrganismo *Fusobacterium nucleatum* é uma bactéria intermédia responsável pela ligação entre os colonizadores primários e os colonizadores secundários, uma vez que é capaz de se coagregar com ambos (Harvey, 2017; Mehrotra & Singh, 2023).

Os biofilmes supragengivais e subgengivais não são totalmente independentes, uma vez que a remoção do biofilme supragengival influencia a composição do biofilme subgengival e a sua capacidade de desenvolver a doença periodontal. No entanto, a microbiota subgengival não depende permanentemente da microbiota supragengival para a sua sobrevivência e patogenicidade (Aruni et al., 2015).

1.6. Microbiota oral da doença periodontal

Na placa subgengival, são encontradas aproximadamente 300 a 400 espécies bacterianas, no entanto apenas cerca de 10 a 20 é que são capazes de colonizar e, conseqüentemente, causar danos nos tecidos periodontais. Para que ocorra colonização, a espécie bacteriana necessita de ter a capacidade de se ligar aos tecidos periodontais, de se multiplicar, de competir com outras bactérias presentes na cavidade oral e de sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Madiba & Bhayat, 2018). As bactérias orais comensais são responsáveis pela iniciação e propagação da doença periodontal através de disbiose (Gasner & Schure, 2023; Mohanty et al., 2019). O processo de disbiose oral caracteriza-se pelo desequilíbrio da homeostase entre os tecidos do hospedeiro e a microbiota oral, podendo ocorrer como resultado da alteração dessa microbiota ou da falta de capacidade de resposta por parte do hospedeiro (Cugini et al., 2021). Na periodontite há uma substituição de bactérias Gram-positivo subgengivais por bactérias Gram-negativo (Gasner & Schure, 2023; Mohanty et al., 2019).

As bactérias periodontopatogénicas são cocos, espiroquetas ou bacilos anaeróbios. As principais bactérias ligadas à doença periodontal são *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Treponema denticola* (Madiba & Bhayat, 2018). As bactérias anaeróbias multiplicam-se e sobrevivem na ausência de oxigénio ou em baixas condições de potencial *redox* (Ramos, 2014).

As bactérias da placa subgingival estão organizadas em 6 complexos microbianos de Socransky: azul, amarelo, verde, roxo, laranja e vermelho (figura 1). O complexo azul que corresponde a espécies de *Actinomyces*, o complexo amarelo que inclui *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguis*, o complexo verde que inclui as espécies de *Capnocytophaga*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo a, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter concisus* e o complexo roxo que inclui *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. Estes 4 complexos são os primeiros colonizadores da superfície dentária (Aleksijević et al., 2022; Mohanty et al., 2019; Socransky et al., 1998).

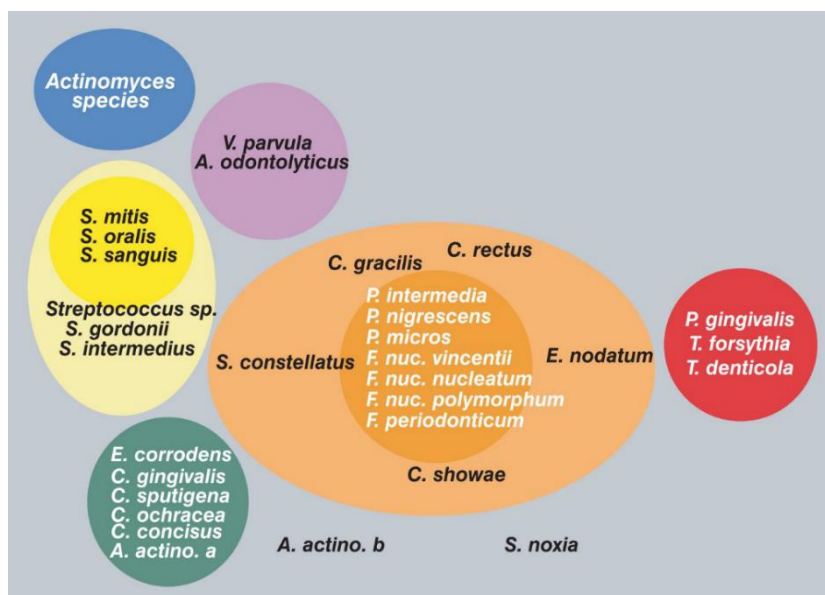


Figura 1 - Representação esquemática dos complexos microbianos de Socransky (Socransky & Haffajee, 2005).

Os complexos laranja e vermelho incluem bactérias que estão intimamente relacionadas com condições periodontais patológicas e que geralmente se multiplicam após o crescimento das bactérias colonizadoras (Harvey, 2017; Mehrotra & Singh, 2023; Mohanty et al., 2019).

As bactérias periodontopatogénicas *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* fazem parte do complexo vermelho e raramente são encontradas na ausência de bactérias do complexo laranja. As bactérias *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, subespécies de *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Streptococcus constellatus* pertencem ao complexo laranja e são conhecidas como as bactérias anaeróbias Gram-negativo que estabelecem a ponte entre as estirpes colonizadoras precoces e as bactérias do complexo vermelho. Deste modo, o aumento da colonização pelo complexo laranja leva a uma maior colonização pelo complexo vermelho (Mohanty et al., 2019; Park et al., 2015) (figura 1).

As bactérias do complexo vermelho geralmente não são encontradas de forma isolada nas bolsas periodontais, mas em associação, sugerindo a forma cooperativa com que elas causam a destruição do tecido periodontal. Isso ocorre devido à interação entre as espécies e à coagregação e interdependência metabólica que existe entre estas bactérias (Nayak et al., 2018).

Após a reclassificação do género *Bacteroides*, surgiram os géneros *Prevotella* e *Porphyromonas*. São constituídos por bactérias pigmentadas, apesar de no género *Prevotella* existirem espécies não pigmentadas (Ramos, 2014).

No estudo experimental, desenvolvido mais à frente, serão utilizadas as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, que possuem uma forte relação com o início e progressão da doença periodontal (Cong et al., 2020).

1.6.1. *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) é uma bactéria anaeróbia Gram-negativo assacarolítica, não móvel e em forma de bastonete responsável pela progressão da doença periodontal e destruição óssea e tecidual. Esta bactéria pertence ao complexo vermelho (How et al., 2016; Mohanty et al., 2019).

A palavra *Porphyromonas* tem origem grega e é formada pela junção de dois termos: *porphyreos* que é um adjetivo que significa roxo e *monas* que é um substantivo que significa unidade. Representa uma célula de porfirina que quando incubada em ágar com sangue, forma colónias brancas ou cremes que, com o tempo e acumulação de

heme, se tornam colônias redondas de pigmento preto. Esta requer a presença de ferro para o seu crescimento, necessitando de heme, hemina (forma oxidada do heme) e vitamina K no seu meio de crescimento. O sulco subgingival da cavidade oral é o principal habitat desta bactéria, local onde produz energia através da fermentação de aminoácidos presentes nas bolsas periodontais, uma vez que neste local a disponibilidade de açúcares é baixa (How et al., 2016; Mei et al., 2020; Mohanty et al., 2019).

A patogenicidade de um microrganismo depende da capacidade de este colonizar e sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como da capacidade de este produzir substâncias que podem levar à destruição dos tecidos (How et al., 2016).

A sobrevivência, patogenicidade e colonização de *P. gingivalis* nos tecidos gengivais do hospedeiro depende de diversos fatores de virulência, como fimbrias, hemolisina, hemaglutininas, cápsula, vesículas da membrana externa (OMVs), lipopolissacarídeos (LPS) e *gingipains* (Aleksijević et al., 2022; How et al., 2016; Mei et al., 2020).

As fimbrias ou “pili” são apêndices de superfície finos, filamentosos e proteicos que se projetam da membrana externa de uma célula bacteriana e aumentam a adesão bacteriana a vários tipos de superfície incluindo à matriz extracelular, a células hospedeiras e a outras bactérias. Estas estruturas permitem a interação com outras bactérias orais, a formação de biofilme, a motilidade bacteriana bem como a adesão e a invasão às células hospedeiras (Aleksijević et al., 2022; How et al., 2016; Jia et al., 2019; Xu et al., 2020).

O heme é uma fonte de ferro e protoporfirina IX, sendo que a sua disponibilidade afeta a sobrevivência, o crescimento e a morfologia de *P. gingivalis* e, conseqüentemente, a sua virulência. As hemoproteínas da saliva, o fluido gengival e os eritrócitos são as principais fontes de heme (Aleksijević et al., 2022; Jia et al., 2019; Smalley & Olczak, 2016).

A cápsula de *P. gingivalis*, também conhecida como antígeno K, é uma estrutura externa que, como um envelope, envolve a célula bacteriana e é constituída por polissacarídeos e água. Esta estrutura evita a ativação do sistema imunológico do hospedeiro e serve como mecanismo de defesa da célula bacteriana contra a fagocitose e a morte celular (Aleksijević et al., 2022; Xu et al., 2020).

As vesículas da membrana externa (OMVs) são compostas por proteínas da membrana externa, fosfolipídios, lipopolissacarídeos (LPS), partes do periplasma, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Durante o seu crescimento, as bactérias Gram-negativo podem libertar OMVs onde a ligação entre o peptidoglicano e a membrana externa está enfraquecida. As OMVs estão envolvidas na adaptação da célula bacteriana ao stress, no desenvolvimento do biofilme, na aquisição de nutrientes e na interação com o hospedeiro e outras bactérias, tendo também a capacidade de invadir e destruir as células hospedeiras ao evitar as suas respostas imunológicas (Aleksijević et al., 2022; Mei et al., 2020; Zhang et al., 2021).

A membrana celular externa consiste essencialmente em lipopolissacarídeos (LPS), sendo que para a sua virulência o componente lipídico A é o mais relevante. Os LPS são libertados após a lise de bactérias ou através das OMVs de bactérias vivas. Este constituinte da membrana externa influencia a manutenção celular e estrutural das bactérias Gram-negativo, bem como o controlo da entrada de moléculas hidrofóbicas e produtos tóxicos. Para além disso, interrompe a remodelação óssea e produz uma resposta inflamatória nos tecidos gengivais, criando um ambiente favorável para a progressão da doença periodontal (How et al., 2016; Jia et al., 2019; Xu et al., 2020).

As *gingipains* fazem parte da família das proteases de cisteína extracelular e podem ser divididas em específicas de arginina e específicas de lisina. Estas enzimas têm impacto na imunidade inata e adquirida, desempenhando papéis essenciais na colonização do hospedeiro, desativação das defesas do hospedeiro, destruição de tecidos e aquisição de nutrientes. Têm um papel essencial na clivagem de ligações peptídicas e polipeptídicas, compondo 85% da atividade proteolítica total de *P. gingivalis*. Para além disso, promovem um aumento da hemorragia gengival através de alterações na permeabilidade capilar e da inibição da coagulação sanguínea (Aleksijević et al., 2022; Jia et al., 2019; Mei et al., 2020; Xu et al., 2020).

Através dos diversos fatores de virulência, *P. gingivalis* garante uma presença mais prolongada nos tecidos do hospedeiro, sobrevivendo mais tempo em condições adversas e contribuindo para a reabsorção do osso alveolar, destruição dos tecidos periodontais e aumento do risco de desenvolvimento de doenças sistémicas associadas à periodontite (Aleksijević et al., 2022).

1.6.2. *Prevotella intermedia*

As espécies de *Prevotella* são bactérias anaeróbias Gram-negativo. Na cavidade oral, as mais predominantes são: *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. nigrescens* e *P. denticola* (Sharma et al., 2022).

Prevotella intermedia (*P. intermedia*) apresenta forma de cocobacilos ou de bastonetes alargados e origina colónias negras. Pertence ao complexo laranja e é responsável pela interconexão entre os primeiros colonizadores e as espécies de bactérias pertencentes ao complexo vermelho. É um dos principais microrganismos responsáveis pela doença periodontal, uma vez que tem a capacidade de estimular a reabsorção óssea e ativar ou inibir as células imunológicas através de alguns dos seus fatores de patogenicidade, tais como os LPS e as proteases (Münchow et al., 2015; Sharma et al., 2022).

Como *P. intermedia* é muito sensível ao oxigénio, o sulco subgengival é um dos seus principais habitats, uma vez que se trata de um meio anaeróbio. Assim, a sua fonte de energia provém da vitamina K e da hemina presentes no fluido crevicular e de carboidratos fermentáveis (Münchow et al., 2015).

Os tecidos periodontais são atacados diretamente pelos fatores de virulência desta bactéria e indiretamente pela libertação de metabolitos biologicamente ativos através da resposta imunológica por parte do próprio hospedeiro (Sharma et al., 2022). Esta bactéria tem a capacidade de lesar os tecidos periodontais, conseguindo resistir à vancomicina e ao metronidazol através da sua capacidade de produzir β -lactamases (Münchow et al., 2015).

Dentro dos diversos fatores de patogenicidade, as adesinas, as fímbrias e as proteínas da membrana externa permitem a adesão e a fixação de *P. intermedia* às células hospedeiras e a coagregação com outras bactérias, sendo este o primeiro passo para o surgimento da doença periodontal (Sharma et al., 2022).

A cápsula é composta por polissacarídeos extracelulares que protegem a bactéria contra a fagocitose e a sua destruição por parte dos leucócitos do hospedeiro, fornecendo proteção contra agentes antimicrobianos. As enzimas protetoras contra o oxigénio aumentam a sobrevivência desta bactéria nos tecidos periodontais (Münchow et al., 2015; Sharma et al., 2022).

As proteases produzidas por *P. intermedia* têm um papel importante ao destruir os tecidos periodontais e interferir com os mecanismos de defesa do hospedeiro. Estas degradam as imunoglobulinas do hospedeiro responsáveis por facilitar a fagocitose das bactérias ou bloquear a sua aderência. Para além disso, são responsáveis pela inibição das vias do complemento que participam nas defesas do organismo e de outras proteínas plasmáticas que controlam a resposta inflamatória. Fazem parte deste grupo, as proteases de cisteína, as proteases de serina, as proteases semelhantes a tripsina e as exopeptidases (Münchow et al., 2015; Sharma et al., 2022).

Através da sua atividade hemolítica, as hemolisinas, produzidas por *P. intermedia*, lisam eritrócitos para libertar hemoglobina e, conseqüentemente produzir heme. Assim, ajudam a bactéria a sobreviver nas bolsas periodontais e a obter ferro para o seu crescimento a partir das hemácias do hospedeiro (Sharma et al., 2022).

Os LPS são responsáveis pela reabsorção óssea e por processos de destruição tecidual através da produção de toxinas ou da indução de uma resposta imunopatológica (Münchow et al., 2015; Sharma et al., 2022).

Assim, o controlo da microbiota oral é essencial para que microrganismos como *P. intermedia* possam ser mantidos em homeostase com o hospedeiro, de modo a não provocar doença periodontal (Münchow et al., 2015).

1.7. Resposta do sistema imunológico do hospedeiro

A destruição dos tecidos periodontais resulta em parte da resposta do sistema imunológico do hospedeiro às bactérias periodontopatogénicas, envolvendo os mecanismos da imunidade inata e adaptativa (Harvey, 2017).

A imunidade inata trata-se de uma resposta inespecífica ativada pelo sistema imunológico com o objetivo de proteger o hospedeiro nos primeiros dias imediatamente após uma infeção bacteriana. Trata-se da primeira linha de defesa contra as bactérias orais patogénicas invasoras, consistindo numa barreira epitelial oral e na atividade de células fagocíticas, incluindo neutrófilos e macrófagos, que atacam diretamente e, conseqüentemente, eliminam as bactérias invasoras. Esta resposta inclui sinais de inflamação aguda, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos para o local da invasão. Para além disso, é responsável pela diferenciação das células hospedeiras em células mais especializadas, o que desencadeia um aumento

de mediadores pró-inflamatórios, nomeadamente a interleucina (IL)-1 β , a prostaglandina E2 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , que influenciam a perda óssea presente na periodontite. Ao serem libertados, estes mediadores fornecem um *feedback* positivo para as células responsáveis pela sua produção, originando uma cascata que leva ao aumento da sua concentração. Durante a cascata, também ocorre a produção de mediadores anti-inflamatórios, incluindo a IL-10 e o antagonista do recetor da IL-1 (IL-1ra), que tem a função de limitar a extensão e a duração da destruição óssea (Harvey, 2017; Luan et al., 2018; Mehrotra & Singh, 2023).

A imunidade inata é responsável pela ativação da imunidade adaptativa, que é uma resposta imunológica específica do antigénio e que envolve as células B e T (Harvey, 2017; Luan et al., 2018).

O RANK (recetor ativador do fator nuclear - κ B), responsável pela regulação da reabsorção óssea, é ativado pelo seu ligante (RANKL) e induz a diferenciação e a ativação dos osteoclastos que, conseqüentemente, reabsorvem o osso alveolar. Sendo que na periodontite ativa, as principais fontes de RANKL são as células B e T. A osteoprotegerina (OPG) é responsável pela inibição do RANK, estando em níveis mais altos durante a saúde periodontal e em níveis mais baixos na periodontite. Já os níveis de RANKL, encontram-se baixos na saúde periodontal e altos na periodontite (Harvey, 2017; Mehrotra & Singh, 2023).

As células T-helper (Th) possuem diversos subconjuntos que levam a respostas protetoras ou prejudiciais. O subconjunto Th17 (CD4+) desencadeia respostas que reforçam a imunidade inata contra os microrganismos, mas também produz a citocina IL-17 que pode causar a destruição óssea e tecidual. As células T reguladoras (Tregs) têm uma função protetora na inflamação ao produzir IL-10 que suprime a ativação do RANKL, sendo responsáveis pela restauração da homeostase (Harvey, 2017).

As células B no tecido linfoide associado à mucosa (MALT) participam na imunidade adaptativa da doença periodontal. As células dendríticas capturam o antigénio estranho e apresentam-no às células T helper naïve. Assim, as células T helper naïve tornam-se ativas e, conseqüentemente, ativam as células B que se tornam células plasmáticas e produzem anticorpos no tecido conjuntivo junto ao local da invasão. Esses anticorpos são transportados para o sulco gengival onde impedem a adesão dos microrganismos patogénicos que possuem esse antigénio específico (Harvey, 2017).

A imunidade inata e a imunidade adaptativa trabalham em conjunto, limitando a infeção bacteriana e restabelecendo a homeostase do tecido periodontal. No entanto, todos estes processos produzem uma resposta imunológica que, conseqüentemente, leva à destruição dos tecidos periodontais (Harvey, 2017; Luan et al., 2018).

2. Pastas dentífricas

Dentro de todas as estratégias preventivas, a escovagem dentária com pasta dentífrica é o método de higiene oral mais praticado em todo o mundo, sendo essencial para a manutenção da saúde oral (Gautam et al., 2017; Marinho et al., 2022).

Os dentífricos podem apresentar-se em forma de pasta, gel, espuma ou pó. A pasta dentífrica é um material semi-sólido que se torna fluido em contacto com a saliva e que deve ser usado simultaneamente com uma escova de dentes (Marinho et al., 2022; Martu et al., 2021; Subramanian et al., 2017). A escova de dentes ideal é aquela que remove de forma mais eficaz a placa bacteriana (Iba & Adamu, 2021).

A pasta dentífrica ajuda a desorganizar e a remover eficazmente a placa bacteriana, prevenindo a desmineralização dos tecidos dentários duros e a destruição dos tecidos de sustentação (Lopes & Soares, 2022). O sucesso de qualquer pasta dentífrica está na sua capacidade de eliminar as bactérias orais patogénicas (Gautam et al., 2017).

A composição de cada pasta dentífrica difere, mas a fórmula típica é 10-40% de abrasivos, 20-70% de humectantes, 5-30% de água, 1-2% de aglutinantes/espessantes, 1-3% de surfactantes/detergentes, 1-2% de aromatizantes e adoçantes, 0,05-0,5% de conservantes e 0,1-0,5% de agentes terapêuticos (Martu et al., 2021).

As pastas dentífricas são compostas por ingredientes ativos e inativos que devem ser compatíveis entre si. Sendo que cada ingrediente tem uma função específica e que, em conjunto com os restantes, contribui para um aumento da eficácia das pastas dentífricas. Os ingredientes inativos são necessários para a pasta dentífrica ter uma cor e um sabor específico, tornar a sua consistência espessa e permitir a união dos seus componentes. Já os ingredientes ativos têm benefícios terapêuticos que ajudam a melhorar a higiene da cavidade oral (Martu et al., 2021; Subramanian et al., 2017).

2.1. Composição básica

2.1.1. Abrasivos

Os abrasivos são substâncias insolúveis que têm um papel muito importante na limpeza e no polimento dos dentes, permitindo a remoção da placa bacteriana e de manchas extrínsecas. Deste modo, permitem obter uma superfície dentária lisa e brilhante (Martu et al., 2021; Subramanian et al., 2017).

A eficácia dos abrasivos depende do tipo, do tamanho e da quantidade de partículas abrasivas, da superfície de contato, da diluição pela saliva e da pressão exercida durante a escovagem. Estes devem ser abrasivos o suficiente para remover a placa bacteriana, mas não devem provocar qualquer dano na superfície dentária (Madhuri & Buggapati, 2017; Subramanian et al., 2017).

Destas substâncias fazem parte a sílica, os óxidos metálicos, os fosfatos, os carbonatos e os silicatos. Os abrasivos mais utilizados são a sílica hidratada, a alumina hidratada, o carbonato de cálcio, o fosfato bicálcico dihidratado, o pirofosfato de cálcio, o metafosfato de sódio, a perlita, a nanohidroxiapatita, o pó de diamante e o bicarbonato de sódio. Sendo que a sílica hidratada e o carbonato de cálcio são usados em concentrações de 8 a 20%, enquanto a alumina e a perlita, devido à sua maior abrasividade em relação ao esmalte, apenas são usadas em concentrações de 1 a 2% (Lippert, 2013; Martu et al., 2021).

2.1.2. Humectantes

Os humectantes atuam como agentes hidratantes, permitindo a manutenção do teor de humidade, assim, evitam que a pasta dentífrica seque quando exposta ao ar ou até durante o seu armazenamento. Estes também permitem a manutenção da textura cremosa da pasta dentífrica. Os humectantes mais utilizados são o sorbitol e a glicerina, mas o polietilenoglicol (PEG)-8, o xilitol, o isomalte, o eritritol e o óleo de parafina também são comumente utilizados (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Madhuri & Buggapati, 2017; Martu et al., 2021).

2.1.3. Surfactantes/ Detergentes

Os surfactantes, também chamados de detergentes, são responsáveis pela ação espumante das pastas dentífricas e diminuem a tensão superficial do meio líquido da

cavidade oral, permitindo que todos os ingredientes da pasta dentífrica possam entrar em contacto com os dentes e dissolver a placa bacteriana. Estes também atuam como emulsionantes de agentes aromatizantes. O surfactante mais utilizado é o lauril sulfato de sódio, no entanto o lauril sarcosinato de sódio, os fluoretos de amina, o estearil lactato de sódio, o estearil fumarato de sódio e o cocoamidopropil betaína também são comumente utilizados (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Madhuri & Buggapati, 2017; Martu et al., 2021).

2.1.4. Aglutinantes/ Espessantes

Os aglutinantes, também denominados por espessantes, são coloides hidrofílicos que previnem a separação da fase sólida da fase líquida. Para além disso, dispersam ou aumentam de volume na presença de água. O mais utilizado é o carboximetilcelulose de sódio, que é uma celulose sintética solúvel em água, estável e compatível com os outros ingredientes. Também pode ser utilizado o alginato de sódio, a goma celulósica, xantana, arábica, *karaya* e tragacanto, a hidroxietilcelulose, a carragenina, entre outros (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Madhuri & Buggapati, 2017; Martu et al., 2021).

2.1.5. Conservantes

Os conservantes são utilizados para evitar o crescimento bacteriano durante o armazenamento. Atualmente, as pastas dentífricas que contêm conservantes são poucas, porque o crescimento bacteriano é impedido através de níveis elevados de humectantes (devido à elevada pressão osmótica na fase aquosa), de surfactantes aniónicos (que são antimicrobianos) ou de aromatizantes (que contribuem para a estabilidade). Os conservantes mais utilizados são os álcoois, o formaldeído, o ácido benzóico, o benzoato de sódio, o etilparabeno e o metilparabeno (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Martu et al., 2021).

2.1.6. Corantes

A coloração da pasta dentífrica confere-lhe um aspeto agradável, sendo relevante para a aceitação por parte do consumidor. Os corantes mais utilizados são o dióxido de titânio, que lhe confere uma cor branca, e a clorofila (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Martu et al., 2021).

2.1.7. Aromatizantes e adoçantes

Os aromatizantes são adicionados às pastas dentífricas para disfarçar o sabor desagradável de outros ingredientes, proporcionando um hálito agradável e diversas sensações, como frio, quente ou formigueiro, dependendo do aromatizante utilizado. Os principais responsáveis pela sua solubilidade e dispersão são os surfactantes. O aromatizante mais utilizado é a menta, mas também podem ser utilizados outros, como ervas, canela ou limão. Já os adoçantes são responsáveis por melhorar o sabor das pastas dentífricas. Sendo os mais utilizados, a sacarina sódica, o sorbitol, o aspartame, a sucralose, a glicerina e o xilitol (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Martu et al., 2021).

2.1.8. Água

A água é um solvente dos ingredientes ativos inorgânicos, nomeadamente dos fluoretos. Quando a água não está presente, os ingredientes ativos inorgânicos estão no estado sólido e só podem interagir com os tecidos alvos após a sua solubilização em contacto com a saliva (Lippert, 2013).

2.2. Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são incorporados nas pastas dentífricas para melhorar a eficácia do controlo da placa bacteriana durante a escovagem dentária, ajudando a reduzir o número de microrganismos na cavidade oral. Consequentemente, auxiliam na prevenção da cárie dentária e das doenças periodontais, reduzindo o número de infeções orais. Durante a sua atividade antibacteriana, estes podem ter efeitos bactericidas, provocando a morte celular das bactérias através da rutura da parede celular e da inibição da atividade enzimática, ou efeitos bacteriostáticos, afetando o funcionamento das células bacterianas para torná-las menos virulentas, através da interferência na adesão, no metabolismo ou no crescimento bacteriano (Gautam et al., 2017; Marinho et al., 2022; Perry et al., 2014).

2.3. Classificação de pastas dentífricas

As pastas dentífricas podem ser classificadas de acordo com as características dos ingredientes ativos: Pasta dentífrica para a prevenção e tratamento da cárie dentária; para a prevenção e tratamento da doença periodontal; para o tratamento da

hipersensibilidade; para o branqueamento dentário; e com finalidade específica (Hemalatha et al., 2022; Maldupa et al., 2012).

2.3.1. Pasta dentífrica para a prevenção e tratamento da cárie dentária

O flúor tem a capacidade de diminuir a prevalência e a gravidade da cárie dentária através da remineralização do esmalte e da inibição da atividade bacteriana do biofilme (Pollick, 2018). O tratamento da cárie dentária precoce passa pela redução do fator etiológico, neste caso a placa bacteriana, e pelo aumento da concentração de flúor, através da utilização de uma pasta dentífrica com flúor (Hemalatha et al., 2022; Madhuri & Buggapati, 2017; Maldupa et al., 2012). Os fluoretos mais utilizados nas pastas dentífricas são o fluoreto de sódio, o monofluorofosfato de sódio, o fluoreto de estanho e o fluoreto de amina (Martu et al., 2021).

A concentração de flúor recomendada está dependente tanto da idade do indivíduo como do risco de cárie dentária que este detém. Entre os 18 meses e os 5 anos (inclusive), recomenda-se o uso de pastas dentífricas com concentração de flúor de 500-550 ppm (2 vezes por dia), enquanto para pacientes com 6 anos ou mais, está indicado o uso de pastas dentífricas padrão com concentração de flúor de 1000-1500 ppm (2 ou mais vezes por dia). Contudo, em pacientes com elevado risco de cárie dentária pode estar recomendado o uso mais frequente da pasta dentífrica fluoretada, o início do uso da pasta dentífrica numa idade mais jovem ou o início mais precoce do uso da pasta dentífrica padrão (Do & Australian Research Centre for Population Oral Health, 2019).

Outro ingrediente usado para prevenção e tratamento da cárie dentária é o xilitol, um antibacteriano e estimulante salivar que reduz a formação de biofilme e a aderência bacteriana, inibe a desmineralização do esmalte através da redução da produção de ácido e inibe a bactéria *Streptococcus mutans* ao interromper a sua produção de energia (Hemalatha et al., 2022; Janakiram et al., 2017; Maldupa et al., 2012).

2.3.2. Pasta dentífrica para a prevenção e tratamento da doença periodontal

Para a prevenção da doença periodontal é importante remover a placa bacteriana regularmente através da limpeza mecânica dos dentes e impedir o crescimento bacteriano através de diversas substâncias antissépticas e antibacterianas, nomeadamente o triclosan, a clorhexidina, o peróxido de hidrogénio, o bicarbonato de

sódio, a iodopovidona, o cloreto/citrato de zinco, cloreto/fluoreto de estanho, o cloreto de cetilpiridínio, entre outras (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Maldupa et al., 2012, Sanz et al., 2013).

O triclosan é um agente antiplaca que possui um efeito anti-inflamatório, tendo a capacidade de diminuir os sinais de gengivite através da inibição do crescimento de bactérias e da redução da produção de citocinas e mediadores inflamatórios. Deste modo, a inibição das vias da cicloxigenase e da lipoxigenase reduz a síntese de prostaglandinas e leucotrienos. Este é usado em combinação com o copolímero de ácido maleico e polivinilmetil-éter, o citrato de zinco ou o pirofosfato, o que aumenta a substantividade do triclosan na cavidade oral (Hemalatha et al., 2022; Maldupa et al., 2012; Sanz et al., 2013).

A clorohexidina (CHX) é uma bisbiguanida catiónica que tem a capacidade de romper a membrana celular bacteriana e, conseqüentemente, provocar lise celular. Possui uma elevada atividade antibacteriana, podendo ser bactericida ou bacteriostática dependendo da sua concentração (mecanismo de ação dose-dependente). A CHX atua sobre leveduras, vírus e bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, conseguindo neutralizar agentes periodontopatogénicos como *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Para além do seu efeito antimicrobiano, esta possui a capacidade de interferir na adesão bacteriana, isto é, interage com glicoproteínas salivares e reduz a atividade de enzimas bacterianas envolvidas na produção de glicano (glicosil transferase C). Possui também elevada substantividade, permanecendo na cavidade oral durante várias horas. Pode ser encontrada em 3 modos: digluconato (mais comum), acetato e sais de cloridrato. Devido à sua elevada eficácia, esta é considerada o *gold standard* dos agentes antiplaca. No entanto, possui algumas desvantagens como pigmentação dentária e de restaurações a resina composta, descamação epitelial do tecido oral, alteração temporária do paladar, reações alérgicas e aumento da formação de cálculo dentário (Maldupa et al., 2012; Martu et al., 2021; Perry et al., 2014; Rajendiran et al., 2021; Sanz et al., 2013).

O bicarbonato de sódio é um abrasivo, no entanto demonstrou ter a capacidade de reduzir a flora microbiana patogénica e regular o pH (Martu et al., 2021).

As pastas dentífricas à base de zinco controlam a placa bacteriana, prevenindo a gengivite, a halitose e a formação de cálculo dentário. Estas pastas demonstraram possuir ação antibacteriana, tendo a capacidade de inibir a adesão bacteriana, a atividade

metabólica e o crescimento bacteriano. O zinco pode ser encontrado em forma de cloreto de zinco ou citrato de zinco (Martu et al., 2021; Sanz et al., 2013).

O cloreto de cetilpiridínio (CPC) é um composto de amónio quaternário com atividade antimicrobiana de amplo espectro. Atua sobre vírus, leveduras e bactérias, podendo ser bactericida e bacteriostático. Este tem a capacidade de interagir com a membrana celular bacteriana provocando a perda dos componentes celulares, alterações no metabolismo, inibição no crescimento celular e, finalmente, morte celular. Possui menor eficácia na redução da placa bacteriana e inflamação gengival do que a clorhexidina. No entanto, quando combinado com a clorhexidina, aumenta a atividade antimicrobiana e reduz os efeitos adversos da clorhexidina. Trata-se de um composto seguro e eficaz na higiene oral, no entanto também tem alguns efeitos adversos como gengivas irritadas e leve coloração dentária (Rajendiran et al., 2021; Sanz et al., 2013).

Também podem ser utilizadas pastas dentífricas com extratos naturais de plantas, óleos essenciais, enzimas ou vitaminas, uma vez que estas substâncias possuem eficácia antibacteriana. O uso de antioxidantes tópicos evita os efeitos negativos provocados pela resposta imunológica do hospedeiro nos tecidos, sem impedir o seu efeito nos microrganismos (Hemalatha et al., 2022; Maldupa et al., 2012).

Para remover o cálculo dentário formado nos dentes, está indicado o uso de substâncias que estabilizam a quantidade de cálcio na saliva e provocam mudanças na estrutura cristalina do cálculo, como por exemplo, os pirofosfatos, o citrato de zinco e o cloreto de zinco (Madhuri & Buggapati, 2017).

2.3.3. Pasta dentífrica para o tratamento da hipersensibilidade

A hipersensibilidade dentinária é caracterizada como uma dor dentária aguda e transitória que resulta imediatamente após a ocorrência de estímulos na dentina exposta (Sharda et al., 2018). O tratamento da hipersensibilidade pode ser realizado através da dessensibilização nervosa (efeito analgésico) ou do bloqueio físico dos túbulos dentinários (Lippert, 2013).

As pastas dentífricas analgésicas que contêm nitrato de potássio, cloreto de potássio ou citrato de potássio fornecem o ião potássio (K^+) e são utilizadas com o intuito de bloquear a transmissão neuronal. Apesar do seu uso generalizado, a sua eficácia ainda

está a ser discutida, no entanto acredita-se que a solução salina de potássio presente nestas pastas dentífricas, ao manter um nível elevado de K^+ extracelular, evita a repolarização da membrana da célula nervosa e inibe a transmissão de impulsos sem causar alterações na polpa dentária (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Maldupa et al., 2012).

As pastas dentífricas responsáveis pelo bloqueio físico dos túbulos dentinários podem conter fluoreto de estanho, acetato de estrôncio, cloreto de estrôncio, fosfosilicato de sódio e cálcio (biovidro) ou bicarbonato de arginina em combinação com carbonato de cálcio (Lippert, 2013).

Os compostos de flúor através da sua capacidade de remineralização aumentam a resistência da dentina aos ácidos e criam uma barreira de fluoretos que bloqueia os túbulos dentinários. O fluoreto de estanho bloqueia os túbulos dentinários e forma uma camada protetora na superfície dentária, criando uma reação do ião de estanho (Sn^{2+}) libertado com os compostos de sódio, cálcio e fosfato que leva à formação de hexametáfosfato de estanho e sódio (Hemalatha et al., 2022; Maldupa et al., 2012).

2.3.4. Pasta dentífrica para o branqueamento dentário

As pastas dentífricas específicas para o branqueamento dentário podem ser divididas em dois grupos, pasta dentífrica *whitening* ou pasta dentífrica *bleaching* (Hemalatha et al., 2022; Maldupa et al., 2012).

As pastas dentífricas *whitening* proporcionam aos dentes uma recuperação do branco natural dos dentes ao remover a placa bacteriana manchada através de substâncias abrasivas ou químicas. O processo de branqueamento desempenhado pelas pastas dentífricas *whitening* com substâncias abrasivas depende da dureza, tamanho, forma e concentração das partículas e da pressão exercida durante a escovagem dentária. As substâncias abrasivas utilizadas englobam o dióxido de sílica, o dióxido de sílica hidratado, o carbonato de cálcio, o fosfato de cálcio dihidratado, o pirofosfato de cálcio, o óxido de alumínio, a perlita e o bicarbonato de sódio, que, juntamente com as cerdas da escova de dentes, removem a placa dentária manchada, mas não alteram a cor original dos dentes. Já as pastas dentífricas *whitening* com substâncias químicas, como o pirofosfato de sódio, o tripolifosfato de sódio, entre outros pirofosfatos, são responsáveis pela deslocação das proteínas da película e das manchas ligadas à película e pela prevenção da adesão de outras moléculas de coloração. Outras substâncias com

ação química que possuem um efeito branqueador são as enzimas que aderem às proteínas da película, como a papaína. Uma das grandes vantagens das pastas dentífricas com substâncias químicas em relação às substâncias abrasivas é que o seu efeito de branqueamento ocorre em todos os locais onde a pasta dentífrica contacta incluindo superfícies interproximais e margens cervicais, isto é, zonas onde é difícil alcançar com as cerdas da escova de dentes (Hemalatha et al., 2022; Lippert, 2013; Madhuri & Buggapati, 2017; Maldupa et al., 2012).

As pastas dentífricas *bleaching* contêm substâncias químicas, como o peróxido de hidrogénio ou o peróxido de cálcio, que ao entrar em contacto com a superfície dentária ou penetrar no tecido dentário, quebram as moléculas das manchas e proporcionam um efeito de branqueamento. A concentração de peróxido de hidrogénio e de peróxido de cálcio nas pastas dentífricas é insignificante, 1% e 0,5-0,7%, respetivamente. Há falta de evidência científica em relação à melhoria da cor dentária interna, tendo em conta a baixa concentração dos peróxidos e o curto tempo de exposição durante a escovagem dentária (Hemalatha et al., 2022; Madhuri & Buggapati, 2017; Maldupa et al., 2012).

2.3.5. Pasta dentífrica com finalidade específica

Há pastas dentífricas responsáveis por tratar situações específicas, como a diminuição da secreção salivar ou problemas de origem viral. Por exemplo, as pastas dentífricas com azeite, betaína ou xilitol estimulam a secreção salivar em repouso, e as pastas dentífricas que possuem larifano podem ser recomendadas para pacientes propensos a infeções herpéticas ou reações autoimunes, como aftas (Hemalatha et al., 2022; Madhuri & Buggapati, 2017; Maldupa et al., 2012).

2.4. Controlo químico da placa bacteriana

Os agentes químicos antiplaca, para fornecerem os efeitos mais benéficos para o controlo da placa bacteriana, devem apresentar determinadas características, incluindo a ação antiplaca, a substantividade, a baixa toxicidade, a ausência de reações de irritação e a baixa permeabilidade (Perry et al., 2014).

Estes agentes antiplaca podem assumir uma função bactericida, quando causam a morte celular da bactéria, ou bacteriostática, quando afetam a adesão, o crescimento ou o metabolismo bacteriano, tornando assim a bactéria menos virulenta. A substantividade trata-se da capacidade de o agente presente na pasta dentífrica aderir às estruturas da

cavidade oral e de ser progressivamente libertado ao longo do tempo, exercendo um efeito mais contínuo e aumentando a duração da sua eficácia. Devido à baixa toxicidade e à ausência de reações de irritação, os agentes podem exercer as suas funções sem danificar os tecidos do hospedeiro. Sendo o tecido da mucosa oral facilmente atravessado por produtos químicos, é fundamental que estes agentes tenham uma baixa permeabilidade, de modo a ficarem retidos na cavidade oral (Perry et al., 2014).

As pastas dentífricas com atividade antiplaca podem possuir diversos mecanismos de ação, como prevenir a adesão bacteriana, limitar o crescimento bacteriano e/ou coagregação, romper o biofilme já estabelecido e alterar a composição e/ou patogenicidade do biofilme (Sanz et al., 2013).

2.5. Regulamentos da Comissão Europeia e selo de aceitação da *American Dental Association* (ADA)

A Comissão Europeia estabeleceu valores máximos de concentração de flúor, triclosan e peróxido de hidrogénio presentes nas pastas dentífricas. Os compostos com flúor são permitidos na composição das pastas dentífricas numa concentração entre 0,1% e 0,15%, calculada em flúor. Sendo que está autorizada a mistura de vários compostos de flúor desde que a concentração máxima em flúor não exceda os 0,15% (1500 ppm) (Martu et al., 2021; Regulamento (UE) n.º 344/2013 da comissão de 4 de abril de 2013). O triclosan é permitido na composição das pastas dentífricas até uma concentração máxima de 0,3%, enquanto em produtos de lavagem da cavidade oral é de apenas 0,2% (Regulamento (UE) n.º 358/2014 da comissão de 9 de abril de 2014).

Em produtos orais de venda ao público, incluindo produtos de lavagem da cavidade oral, pastas dentífricas e produtos de branqueamento dentário, o peróxido de hidrogénio está autorizado na concentração máxima de 0,1%. Já os produtos de branqueamento dentário vendidos exclusivamente por médicos dentistas podem ter concentrações de peróxido de hidrogénio entre os 0,1% e os 6% (Regulamento (UE) n.º 1197/2013 da comissão de 25 de novembro de 2013).

A *American Dental Association* (ADA) é uma fonte de informação sobre a saúde da cavidade oral para médicos dentistas e pacientes. Em 1931, foi concebido o primeiro selo de aceitação da ADA. Todos os produtos que possuem esse selo contêm flúor e podem ser usados com a garantia de que demonstraram segurança e eficácia (Valkenburg et al., 2019).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESES

1. Objetivos do estudo

Este estudo tem como **objetivo geral** avaliar a atividade antibacteriana de pastas dentífricas, comparando a eficácia das pastas dentífricas “não especializadas” com as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas”. Deste modo, será verificado se as pastas “especializadas para as gengivas” são, ou não, mais eficazes no combate a bactérias periodontopatogénicas.

Como **objetivos específicos**, este estudo pretende:

- Comparar a eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas que serão testadas, e assim identificar qual a mais eficaz na prevenção e no combate à doença periodontal.
- Aprofundar o estudo das pastas utilizadas, identificando os seus principais constituintes e, através dos dados previamente obtidos, verificar a existência de uma correlação entre a presença desses constituintes e a atividade antibacteriana de uma pasta dentífrica.

2. Hipóteses do estudo

Foram formuladas as seguintes **hipóteses de estudo**:

1. **Verificar se as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” são mais eficazes, quanto à atividade antibacteriana, que as pastas dentífricas “não especializadas”.**
 - **H1.0** (hipótese nula): Não existem diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” e as “não especializadas”, sendo que as pastas “especializadas para as gengivas” não são mais eficazes que as “não especializadas”.
 - **H1.1** (hipótese alternativa): Existem diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” e as “não especializadas”, sendo que as pastas “especializadas para as gengivas” são mais eficazes que as “não especializadas”.

2. Verificar se existem diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” testadas.

- **H2.0** (hipótese nula): Não existem diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” testadas.
- **H2.1** (hipótese alternativa): Existem diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” testadas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Tipo de estudo e local da realização do estudo

Trata-se de um estudo de investigação experimental *in vitro* realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto Universitário Egas Moniz.









2. Estirpes bacterianas utilizadas

As estirpes *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 28984) e *Prevotella intermedia* (ATCC 20706) utilizadas foram conservadas conforme as instruções do fabricante.

3. Amostra

A amostra foi constituída por 8 pastas dentífricas, 4 “especializadas para as gengivas” (Parodontax Original, PerioGard Colgate, Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas e Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) e 4 “não especializadas” (Colgate Tripla Ação, Oral-B 1-2-3, Elgydium: Multi-Ação e Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca) (tabela 1).

Tabela 1 - Pastas dentífricas utilizadas no estudo

Pastas dentífricas “especializadas para as gengivas”	Pastas dentífricas “não especializadas”
Parodontax Original 	Colgate Tripla Ação 
PerioGard Colgate 	Oral-B 1-2-3 
Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas 	Elgydium Multi-Ação 
Arthrodont Classic Gengivas Irritadas 	Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca 

4. Composição química das pastas dentífricas

A composição química de cada uma das pastas dentífricas está disponível nas respetivas embalagens, de onde foram identificados individualmente todos os ingredientes das pastas dentífricas em análise, sendo estes posteriormente categorizados na tabela 2.

Tabela 2 - Composição Química das Pastas Dentífricas adaptada do Radzki et al. (2022)

	<i>Parodontax</i> ® <i>Original</i>	<i>PerioGard</i> <i>Colgate</i> ®	<i>Elgydium</i> ® <i>Placa</i> <i>Bacteriana &</i> <i>Gengivas</i>	<i>Arthorodont</i> ® <i>Classic</i> <i>Gengivas</i> <i>Irritadas</i>	<i>Oral-B</i> ®: <i>1-2-3</i>	<i>Aquafresh</i> ® <i>Tripla</i> <i>Proteção</i> <i>Menta</i> <i>Fresca</i>	<i>Elgydium</i> ® <i>Multi-Ação</i>	<i>Colgate</i> ® <i>Tripla</i> <i>Ação</i>
Abrasivos	Bicarbonato de Sódio	Sílica Hidratada	Carbonato de Cálcio Sílica Hidratada	Carbonato de Cálcio	Sílica Hidratada	Sílica Hidratada	Sílica Hidratada	Sílica Hidratada
Humectantes	Glicerina	Sorbitol	Glicerina PEG-8	Glicerina	Sorbitol	Sorbitol Glicerina PEG-6/PEG-8	Hidrolisados de Amido Hidrogenado Glicerina PEG-12	Sorbitol Glicerina PEG-12
Aglutinantes	Goma Xantana	Hidroxietilcelulose	Hidroxietilcelulose	Algina Carragenina	Goma Celulósica Carbómero	Goma Xantana Carragenina	Goma Celulósica	Goma Celulósica
Surfactantes	Lauril Sulfato de Sódio Cocoamidopropil Betaina	Cocoamidopropil Betaina PEG-40 Óleo de Ricino Hidrogenado PEG-3 <i>Tallow Aminopropylamine</i> Fluoreto de Amina (Olaflur)	Lauril Glicosídeo PEG-40 Óleo de Ricino Hidrogenado	Metil Cocoil Taurato de Sódio Aminoácidos Cocoil de Sódio de Maçã	Lauril Sulfato de Sódio Polissorbato 80	Lauril Sulfato de Sódio	Metil Cocoil Taurato de Sódio	Lauril Sulfato de Sódio
Conservantes							Benzoato de sódio	
Corantes	CI 77491	CI 74160			CI 77891 CI 74260	Dióxido de Titânio CI 73360 CI 74160	CI 42090	CI 74160 CI 74260 CI 77891

Aromatizantes + Adoçantes	Aroma Sacarina Sódica Glicosídeos de Esteviol Limoneno	Aroma Limoneno Sacarina Sódica	Aroma Sucralose Floretilina	Aroma Óleo Derivado das Frutas e Sementes do Anis Estrelado Chinês Limoneno Óleo de Hortelã-pimenta Mentol Sacarina Eugenol	Aroma Sacarina Sódica	Aroma Limoneno Sacarina Sódica	Aroma Limoneno Sacarina Sódica	Aroma Sacarina Sódica
Quelantes (estabilizador)		Gluconato de Sódio Fluoreto de Amina (Olaflur)		Diacetato de Glutamato Tetrassódico				
Reguladores de pH		Hidróxido de Potássio Ácido Clorídrico		Hidróxido de Sódio	Fosfato Trissódico Hidróxido de Sódio		Lactato de Cálcio Lactato de Magnésio	
Emolientes aquosos							PEG-12 Éter Alílico PEG-12 Dimeticona Extracto de <i>Phormidium uncinatum</i>	
Absorventes							Maltodextrina	
Solventes	Água	Água	Água	Água Hexileno glicol	Água	Água	Água	Água
Ingredientes Ativos	Bicarbonato de Sódio Fluoreto de Sódio Limoneno	Fluoreto de Estanho Fluoreto de Amina (Olaflur) Limoneno	Carbonato de Cálcio Cloreto de Cetilpiridínio Digluconato de Clorohexidina Floretilina	Carbonato de Cálcio Cloreto de Cetilpiridínio Ácido Glicirretínico Óleo Derivado das Frutas e Sementes do Anis Estrelado Chinês Limoneno Óleo de Hortelã-pimenta Mentol Eugenol	Fluoreto de Sódio	Fluoreto de Sódio Limoneno	Álcool nicotínico HF PEG-12 Dimeticona Extracto de <i>Phormidium uncinatum</i> Limoneno	Fluoreto de Sódio

5. Questão PICOST

A questão motivadora para a realização deste estudo foi elaborada de acordo com os critérios da metodologia PICOST (População, Intervenção, Comparação, Resultados, Desenho do Estudo e Tempo).

Com este estudo pretendeu-se procurar dar resposta às seguintes perguntas de partida: 1 - As pastas dentífricas “especializadas para as gengivas”, quando comparadas com as pastas dentífricas “não especializadas”, são mais eficazes quanto à atividade antibacteriana nas bactérias periodontopatogénicas *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*? 2 - Qual a pasta dentífrica mais eficaz na prevenção e combate à doença periodontal?

5.1. População (P)

Foram definidos 10 grupos de estudo. Os grupos “CHX” e “ADE” correspondem aos grupos de controlo positivo e negativo, respetivamente, e são colocados em todas as placas de petri. Os grupos “PTAX”, “PGARD”, “EL-PBG” e “AC-GI” correspondem às pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” e os grupos “COLG-3A”, “OB123”, “EL-MULT” e “AQUA-3P” correspondem às pastas dentífricas “não especializadas” (tabela 3).

Tabela 3 - Grupos de estudo

PLACA 1	Pastas dentífricas especializadas para as gengivas	PTAX	Parodontax Original	n= 3 x 2
		PGARD	PerioGard Colgate	
		EL-PBG	Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas	
		AC-GI	Arthrodont Classic Gengivas Irritadas	
	Controlo Positivo	CHX	Solução de Clorohexidina a 2%	
	Controlo Negativo	ADE	Água Destilada Estéril	
PLACA 2	Pastas dentífricas não especializadas	COLG-3A	Colgate Tripla Ação	n= 3 x 2
		OB123	Oral-B 1-2-3	
		EL-MULT	Elgydium: Multi-Ação	
		AQUA-3P	Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca	
	Controlo Positivo	CHX	Solução de Clorohexidina a 2%	
	Controlo Negativo	ADE	Água Destilada Estéril	

Legenda: n - número de amostras; 3 - experiência em triplicado; 2 - experiência em *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*.

5.2. Intervenção (I)

Avaliar a atividade antibacteriana em *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* de pastas dentífricas “não especializadas” e de pastas dentífricas “especializadas para as gengivas”.

5.3. Comparação (C)

Comparar a eficácia antibacteriana das pastas dentífricas “não especializadas” com as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” e comparar a eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas”.

5.4. Resultados (O)

Aparecimento de halo de inibição do crescimento com morte ou inibição bacteriana e, em caso de não aparecimento de halo, redução ou não do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

5.5. Desenho do estudo (S)

Para uma melhor compreensão, a figura 2 apresenta de forma visual o desenho do estudo de investigação experimental realizado.

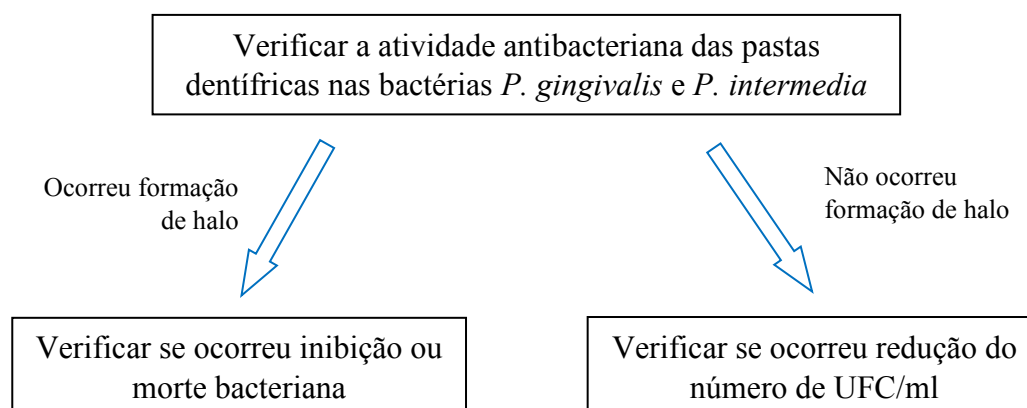


Figura 2 - Esquematização do estudo de investigação experimental

Neste estudo de investigação experimental *in vitro*, para verificar a atividade antibacteriana das pastas dentífricas, foram utilizadas as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (figura 3 e 4):

- Placa 1: Controlo negativo (ADE) + Controlo positivo (CHX) + 4 pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” (PTAX, PGARD, EL-PBG e AC-GI)
- Placa 2: Controlo negativo (ADE) + Controlo positivo (CHX) + 4 pastas dentífricas “não especializadas” (COLG-3A, OB123, EL-MULT e AQUA-3P)

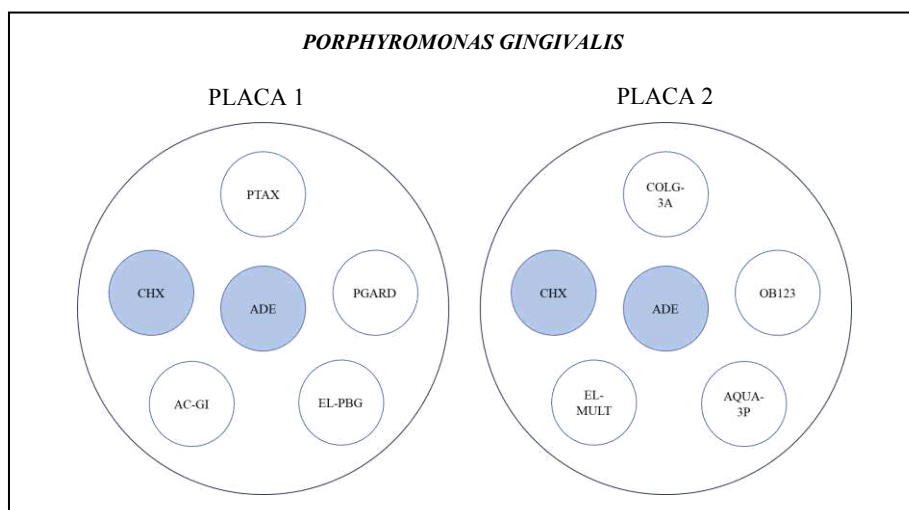


Figura 3 - Esquematização do método de difusão em ágar para verificar a atividade antibacteriana das pastas dentífricas em *P. gingivalis*

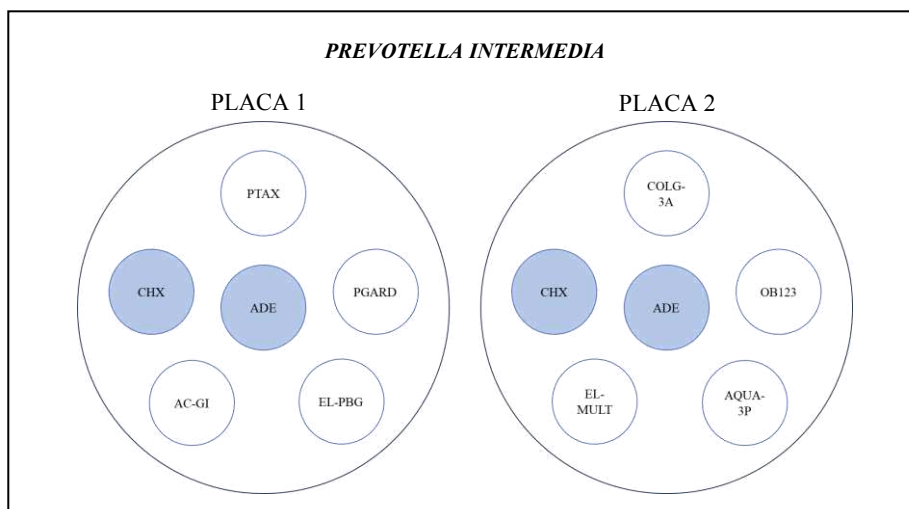


Figura 4 - Esquematização do método de difusão em ágar para verificar a atividade antibacteriana das pastas dentífricas em *P. intermedia*

5.6. Tempo (T)

Após a incubação de 72h verificar-se-á, ou não, um halo de inibição do crescimento.

6. Metodologia

6.1. Método de difusão em ágar

Neste estudo laboratorial foi utilizado um método de difusão em ágar, de modo a avaliar a suscetibilidade bacteriana a agentes antimicrobianos incorporados em pastas dentífricas.

O teste de difusão em disco consiste em inocular o microrganismo em estudo e, em seguida, colocar discos de papel de filtro que contêm o composto em estudo na concentração desejada sobre a superfície do ágar. O agente antimicrobiano difunde-se no ágar e inibe a multiplicação e o crescimento do microrganismo inoculado, criando halos de inibição do crescimento. No entanto, a inibição do crescimento bacteriano não significa a morte bacteriana, uma vez que este método não tem a capacidade de diferenciar efeitos bactericidas de efeitos bacteriostáticos (Balouiri et al., 2016).

Para esta investigação experimental, o método utilizado foi baseado no teste de difusão em disco, no entanto, não foram utilizados discos de papel de filtro, decidindo-se colocar a solução de pasta dentífrica diretamente na superfície de ágar. Foi tomada esta decisão uma vez que, ao utilizar os discos de papel de filtro, seria necessário remover o material particulado e apenas a parte líquida seria impregnada. No entanto, durante a utilização rotineira de pastas dentífricas, não ocorre essa remoção. Para além disso, não existe evidência científica de que ao remover os agentes particulados não serão alteradas as propriedades antibacterianas das pastas dentífricas. Ainda assim, antes do início da experiência, foi testado o efeito da remoção do material particulado e, sob as mesmas condições, a pasta dentífrica em que foi removido o material particulado através de centrifugação não criou halo de inibição ao invés da pasta dentífrica que não foi sujeita a essa remoção que criou halo de inibição do crescimento.

As soluções de pastas dentífricas foram obtidas misturando-se a pasta dentífrica com água destilada estéril numa proporção próxima de 1:3 (p/p) para simular as concentrações das pastas dentífricas quando utilizadas na cavidade oral (Vajrabhaya et al., 2022).

6.2. Método turbidimétrico

Nas amostras onde se verificou a presença de halo de inibição do crescimento foram efetuadas sub-inoculações da zona de inibição para meio de cultura líquido, para verificar se os microrganismos tinham sofrido morte bacteriana ou se apenas teria existido inibição do crescimento. Assim, a presença de turvação no meio demonstra a presença de bactérias viáveis, enquanto a ausência de turvação indica a ausência de crescimento bacteriano, ou seja, que a pasta dentífrica provocou a morte total dos microrganismos presentes (Retamozo et al., 2010).

6.3. Teste de suspensão quantitativo

A diluição em série da suspensão bacteriana reduz o número de microrganismos por unidade de volume e permite a sua contagem (Silva et al., 2010). Os microrganismos em estudo foram colocados em contacto com as pastas dentífricas durante 2 minutos, o tempo mínimo recomendado de escovagem dentária (Iba & Adamu, 2021). Após esse intervalo de tempo, foi inoculada uma alíquota da mistura (solução de pasta dentífrica + suspensão de bactéria) em meio Columbia ágar (5% de sangue de ovelha). Foi adicionado *Tween* 80 estéril para inibir as substâncias com capacidade antimicrobiana. Após a incubação, efetuou-se a contagem do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/ml), determinando a redução provocada pela pasta dentífrica.

7. Protocolo experimental

Este estudo experimental *in vitro* iniciou-se com a verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas nas bactérias periodontopatogénicas *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* através do método de difusão em ágar, ou seja, observando a formação, ou não, de halo de inibição do crescimento nas placas inoculadas (Passo 1).

Após os resultados obtidos, nas pastas que formaram halo de inibição do crescimento verificou-se a ocorrência de morte ou inibição bacteriana (Passo 2A) e nas pastas que não formaram halo de inibição efetuou-se o teste de suspensão quantitativo, verificando-se a capacidade de redução do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/ml) pelas pastas dentífricas (Passo 2B).

Passo 1: Verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas nas bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*

Preparação das soluções das pastas dentífricas

1. Foi pesado 10 g de pasta dentífrica com recurso a uma balança analítica e juntou-se 20 ml de água destilada estéril (ADE).
2. A solução foi homogeneizada com recurso a um agitador magnético.
3. Repetiu-se para todas as pastas dentífricas em análise.

Verificação da atividade antibacteriana

1. Num tubo, foram efetuadas isoladamente as suspensões das bactérias em estudo (*P. gingivalis* e *P. intermedia*) com ADE, com uma densidade de 1.2 da escala de *McFarland* (10^8 UFC/ml).
2. Com uma zaragatoa, foram inoculadas, isoladamente, as bactérias em estudo num meio Columbia ágar (5% de sangue de ovelha).
3. Foi colocado, isoladamente, 15 µl da solução de cada uma das pastas dentífricas no respetivo meio inoculado.
4. Foi colocado, isoladamente, 15 µl de solução de clorhexidina a 2% (controlo positivo) e 15 µl de água destilada estéril (controlo negativo) em todas as placas utilizadas.
5. Os meios foram incubados a 37°C por 72h em atmosfera de anaerobiose.

Após a incubação, foi avaliada a formação, ou não, de halo de inibição do crescimento em torno das amostras das pastas dentífricas utilizadas.

Passo 2A: Verificando-se a formação de halo de inibição do crescimento com diâmetro suficiente para efetuar a sub-inoculação, foi testado se ocorreu inibição ou morte bacteriana:

1. Efetuaram-se sub-inoculações da zona do halo formado (figura 5) para meio de cultura líquido fresco (caldo de BHI) através do corte de um fragmento de gelose.
2. Os meios foram incubados a 37°C por 72h em atmosfera de anaerobiose.

3. Foi verificada a presença de turvação através de inspeção visual.

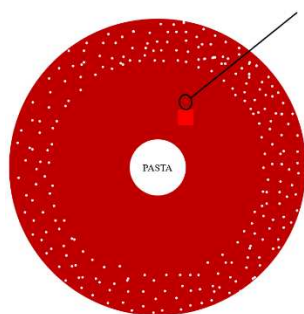


Figura 5 - Imagem representativa da zona de onde foi retirado o fragmento de gelose para efetuar a sub-inoculação.

Passo 2B: Verificando-se a ausência de formação de halo de inibição do crescimento, ou o halo formado não permitir efetuar a sub-inoculação devido ao seu diâmetro reduzido, foi efetuado com essa pasta dentífrica um teste de suspensão quantitativo para verificar a redução do número de unidades formadoras de colônias por mililitro:

1. Foi repetida a “Preparação das soluções das pastas dentífricas” descrita anteriormente.
2. Foi preparada a suspensão da bactéria *P. gingivalis* com ADE numa densidade de 1.2 da escala de *McFarland*.
3. Foram efetuadas diluições em série da suspensão bacteriana até uma concentração de 1:100000 (figura 6).
4. Foi inoculado 100 μ l da solução final num meio Columbia ágar (5% de sangue de ovelha) (permitiu determinar o número inicial de UFC/ml presentes na suspensão).

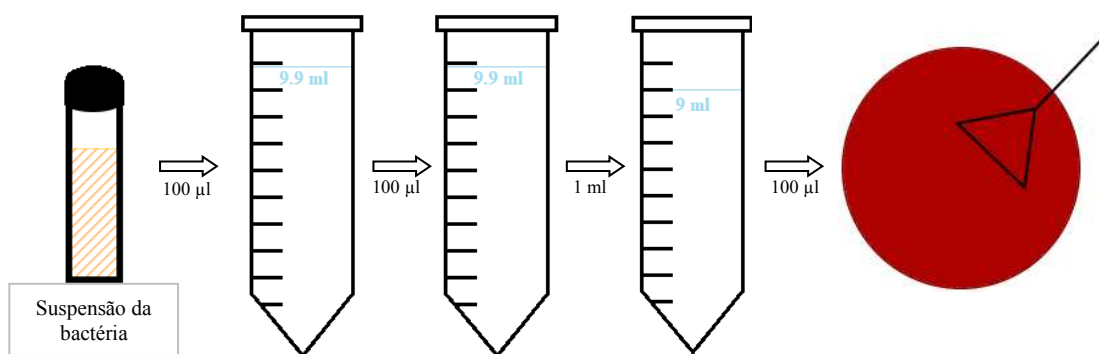


Figura 6 - Representação esquemática das diluições em série da suspensão bacteriana para inoculação no meio

5. Foi colocado 100 μ l de suspensão bacteriana em contacto com 900 μ l de solução de cada pasta dentífrica durante 2 minutos.

- Foi inoculado 100 μl da mistura e, aquando do espalhamento, foi adicionado 50 μl de *Tween* 80 estéril num meio Columbia ágar (5% de sangue de ovelha) (figura 7).

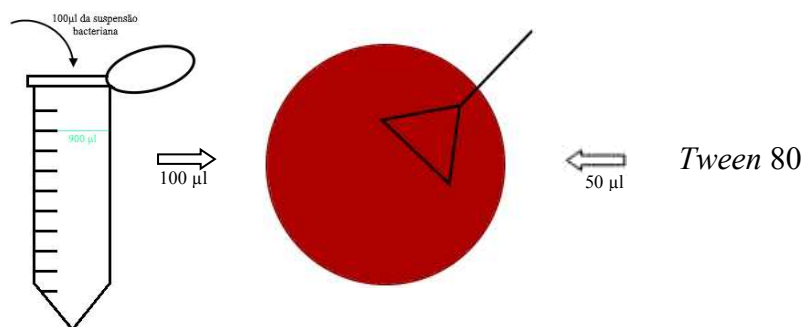


Figura 7 - Representação esquemática do ensaio quantitativo com a solução de pasta dentífrica

- Repetiu-se o procedimento para *P. intermedia*.
- Os meios foram incubados a 37°C por 72h em atmosfera de anaerobiose.
- Após a incubação, foi determinado o número de UFC/ml e avaliada a redução.

V. RESULTADOS

1. Verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas

Após a incubação, foi avaliada a formação, ou não, de halo de inibição do crescimento em torno das amostras das pastas dentífricas utilizadas. Cada experiência foi realizada em triplicado. Em todas as placas inoculadas, houve a formação de halo de inibição do crescimento com a solução de clorohexidina a 2% que serviu como controlo positivo e não houve formação de halo de inibição do crescimento com a água destilada estéril que serviu como controlo negativo (figura 8 a 19).

1.1. Resultados das amostras de pastas “não especializadas” em *Porphyromonas gingivalis*

Não se verificou a formação de halo de inibição do crescimento nas amostras de pastas dentífricas “não especializadas” COLG-3A (Colgate Tripla Ação), OB123 (Oral-B 1-2-3), EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação) e AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca) em nenhuma das placas inoculadas com *P. gingivalis* (figura 8, 9 e 10).

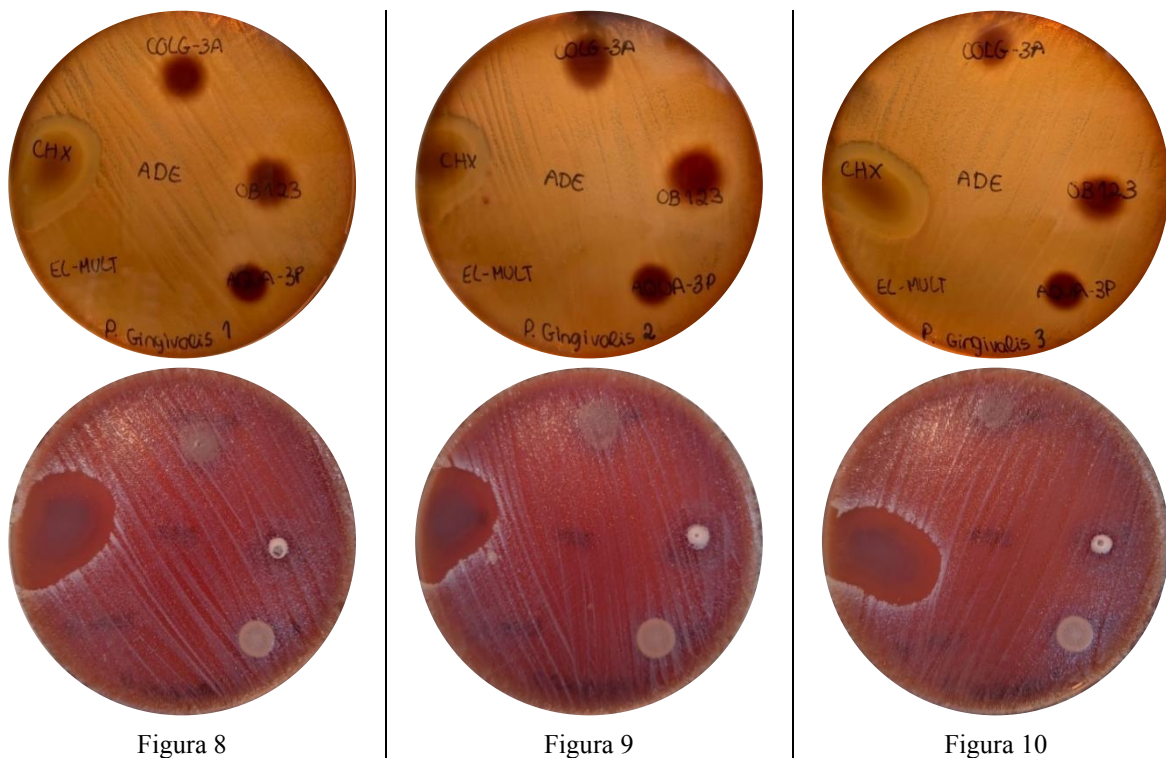


Figura 8, 9 e 10 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas COLG-3A, OB123, EL-MULT e AQUA-3P em *P. gingivalis*. ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.

1.2. Resultados das amostras de pastas “não especializadas” em *Prevotella intermedia*

Não se verificou a formação de halo de inibição do crescimento nas amostras de pastas dentífricas “não especializadas” COLG-3A (Colgate Tripla Ação), OB123 (Oral-B 1-2-3), EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação) e AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca) em nenhuma das placas inoculadas com *P. intermedia* (figura 11, 12 e 13).

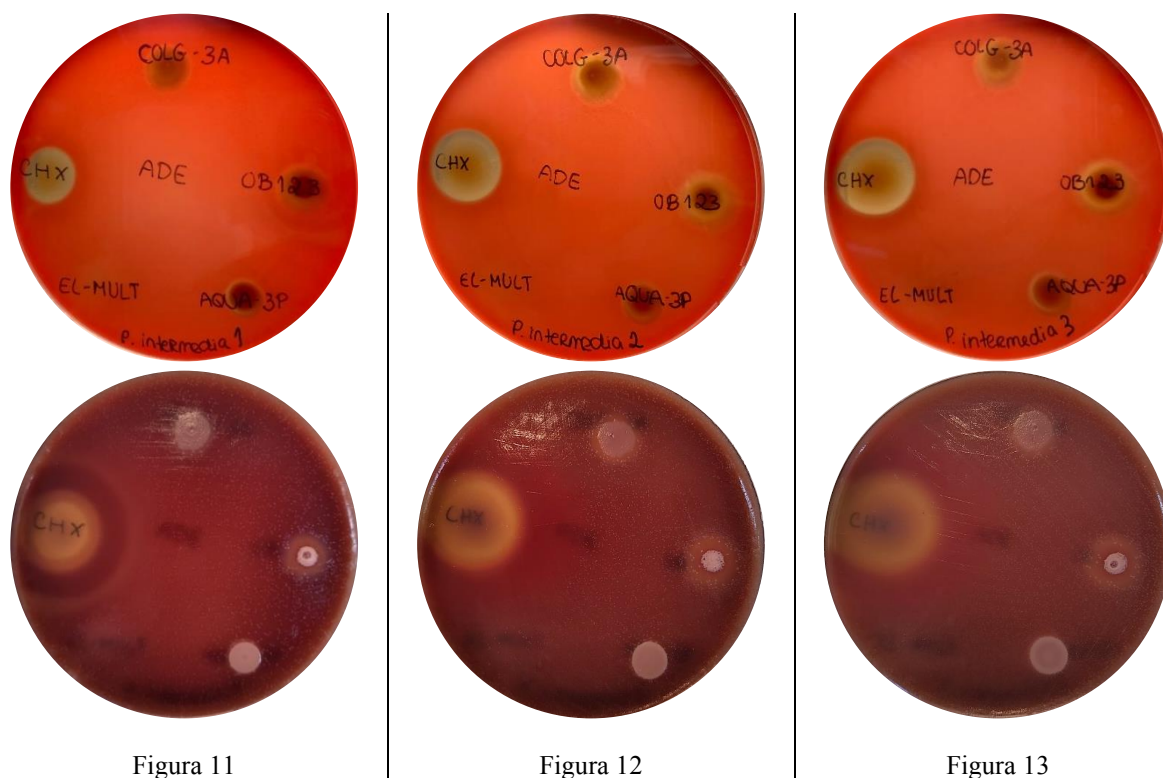


Figura 11, 12 e 13 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas COLG-3A, OB123, EL-MULT e AQUA-3P em *P. intermedia*. ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.

1.3. Resultados das amostras de pastas “especializadas para as gengivas” em *Porphyromonas gingivalis*

Verificou-se a formação de halos de inibição do crescimento nas amostras de pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” PGARD (PerioGard Colgate), AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) e EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas) nas placas inoculadas com *P. gingivalis*, sendo que a amostra de EL-PBG originou o maior halo de inibição e a amostra de PGARD o menor halo de inibição. No entanto, não se verificou a formação de halo de inibição do crescimento na amostra de PTAX (Parodontax Original) em nenhuma das placas inoculadas com *P. gingivalis* (figura 14, 15 e 16).



Figura 14



Figura 15



Figura 16

Figura 14, 15 e 16 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas PTAX, PGARD, EL-PBG e AC-GI em *P. gingivalis*. ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.

1.4. Resultados das amostras de pastas “especializadas para as gengivas” em *Prevotella intermedia*

Verificou-se a formação de halos de inibição do crescimento nas amostras de pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas) e AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) nas placas inoculadas com *P. intermedia*, sendo que a amostra de EL-PBG originou o maior halo de inibição. No entanto, não se verificou a formação de halo de inibição do crescimento na amostra de PTAX (Parodontax Original) nem na amostra de PGARD (PerioGard Colgate) em nenhuma das placas inoculadas com *P. intermedia* (figura 17, 18 e 19).

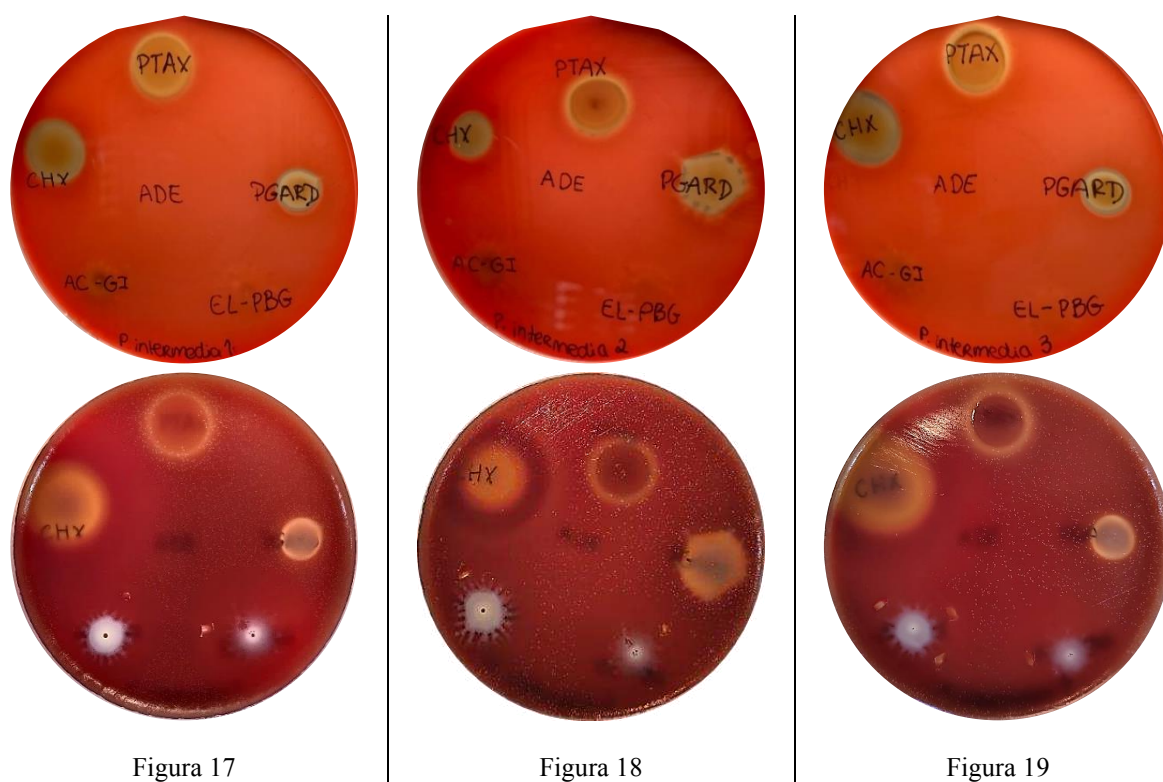


Figura 17, 18 e 19 - Teste da eficácia antibacteriana das amostras das pastas dentífricas PTAX, PGARD, EL-PBG e AC-GI em *P. intermedia*. ADE é o controlo negativo e CHX é o controlo positivo. Perspetiva inferior da placa com a identificação das amostras (em cima) e perspetiva superior da placa com a visualização das colónias (em baixo). A experiência foi realizada em triplicado.

1.5. Resultados de todas as amostras de pastas dentífricas estudadas em *P. gingivalis* e *P. intermedia*

Na tabela 4, pode-se identificar quais as amostras das pastas dentífricas que levaram à formação, ou não, de halo de inibição do crescimento em *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

Tabela 4 - Verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas através da identificação da formação de halo de inibição do crescimento

Amostras das pastas dentífricas	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
COLG-3A	Não houve formação de halo	Não houve formação de halo
OB123	Não houve formação de halo	Não houve formação de halo
EL-MULT	Não houve formação de halo	Não houve formação de halo
AQUA-3P	Não houve formação de halo	Não houve formação de halo
PTAX	Não houve formação de halo	Não houve formação de halo
PGARD	Houve formação de halo, mas com diâmetro insuficiente para realizar sub-inoculação	Não houve formação de halo
AC-GI	Houve formação de halo	Houve formação de halo
EL-PBG	Houve formação de halo	Houve formação de halo

Legenda: COLG-3A (Colgate Tripla Ação); OB123 (Oral-B 1-2-3); EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação); AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca); PTAX (Parodontax Original); PGARD (PerioGard Colgate), AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas); EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas).

2. Verificação da atuação bactericida ou bacteriostática das amostras das pastas dentífricas com formação de halo de inibição do crescimento com diâmetro suficiente para realizar sub-inoculação em ambas as bactérias

Através do método turbidimétrico, procurou-se verificar a atuação bactericida ou bacteriostática das amostras das pastas dentífricas AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) e EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas), uma vez que estas formaram um halo de inibição do crescimento com diâmetro suficiente para realizar sub-inoculação em *P. gingivalis* e *P. intermedia*. O tubo correspondente ao controlo positivo (CHX) não apresentou turvação e o correspondente ao controlo negativo (ADE) apresentou turvação. Nos tubos correspondentes às amostras de AC-GI e de EL-PBG em *P. gingivalis* e *P. intermedia*, verificou-se a ausência de turvação do meio

líquido de caldo de BHI (Brain Heart Infusion), o que demonstra que as pastas dentífricas provocaram a morte total dos microorganismos estudados (figura 20 e 21).

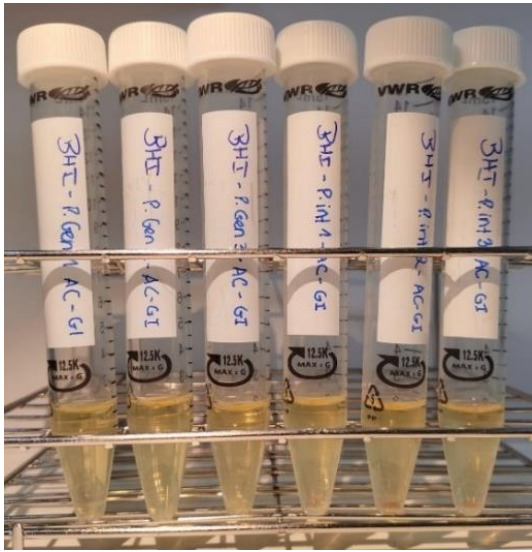


Figura 20 - Ensaio para verificação da atividade bactericida ou bacteriostática das amostras de AC-GI em *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

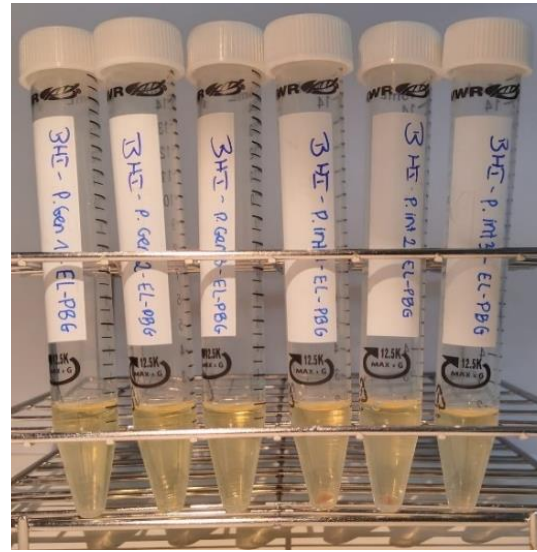


Figura 21 - Ensaio para verificação da atividade bactericida ou bacteriostática das amostras de EL-PBG em *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

3. Verificação da redução do número de UFC/ml quando não há formação de halo de inibição do crescimento ou o halo formado não permite efetuar a sub-inoculação devido ao seu diâmetro reduzido

Em *Porphyromonas gingivalis*, o crescimento bacteriano obtido através da inoculação de 100 µl da solução com diluição de 1:100000 da suspensão bacteriana representa o controlo com contagens de 1×10^7 UFC/ml. A amostra de COLG-3A resultou numa contagem de 1×10^2 UFC/ml, representando uma redução de 10^5 UFC/ml. A amostra de OB123 resultou numa contagem de 2×10 UFC/ml, representando uma redução de 10^6 UFC/ml. A amostra de AQUA-3P resultou numa contagem de 10 UFC/ml, representando uma redução de 10^6 UFC/ml. As amostras de PTAX, PGARD e EL-MULT resultaram numa contagem inferior a 10 UFC/ml, representando uma redução superior a 10^6 UFC/ml (tabela 5).

Tabela 5 - Contagem e redução de UFC/ml de *P. gingivalis*

<i>P. gingivalis</i>		Contagem de UFC/ml	Redução de UFC/ml
CONTROLO		1×10^7	
AMOSTRAS	PTAX	< 10	$> 10^6$
	PGARD	< 10	$> 10^6$
	COLG-3A	1×10^2	10^5
	OB123	2×10	10^6
	EL-MULT	< 10	$> 10^6$
	AQUA-3P	10	10^6

Legenda: PTAX (Parodontax Original); PGARD (PerioGard Colgate); COLG-3A (Colgate Tripla Ação); OB123 (Oral-B 1-2-3); EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação); AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca).

Em *Prevotella intermedia*, o crescimento bacteriano obtido através da inoculação de 100 µl da solução com diluição de 1:100000 da suspensão bacteriana representa o controlo com contagens de 1×10^6 UFC/ml. A amostra de EL-MULT resultou na presença de 2×10 UFC/ml, representando uma redução de 10^5 UFC/ml. A amostra de OB123 resultou na presença de 10 UFC/ml, representando uma redução de 10^5 UFC/ml. As amostras de PTAX, PGARD, COLG-3A e AQUA-3P resultaram numa contagem inferior a 10 UFC/ml, representando uma redução superior a 10^5 UFC/ml (tabela 6).

Tabela 6 - Contagem e redução de UFC/ml de *P. intermedia*

<i>P. intermedia</i>		Contagem de UFC/ml	Redução de UFC/ml
CONTROLO		1×10^6	
AMOSTRAS	PTAX	< 10	$> 10^5$
	PGARD	< 10	$> 10^5$
	COLG-3A	< 10	$> 10^5$
	OB123	10	10^5
	EL-MULT	2×10	10^5
	AQUA-3P	< 10	$> 10^5$

Legenda: PTAX (Parodontax Original); PGARD (PerioGard Colgate); COLG-3A (Colgate Tripla Ação); OB123 (Oral-B 1-2-3); EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação); AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca).

4. Comparação da eficácia antibacteriana das pastas dentífricas em estudo

Na tabela 7, encontram-se os resultados obtidos de todas as amostras das pastas dentífricas testadas em ambas as bactérias, de forma a facilitar a análise da atividade antibacteriana de cada pasta dentífrica e a comparação dessa atividade entre as pastas “não especializadas” e as pastas “especializadas para as gengivas”.

Tabela 7 - Quadro síntese da atividade antibacteriana apresentada pelas pastas dentífricas testadas em *P. gingivalis* e em *P. intermedia*

Amostras das Pastas Dentífricas		<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
Não Especializadas	COLG-3A	Redução de 10^5	Redução $> 10^5$
	OB123	Redução de 10^6	Redução de 10^5
	EL-MULT	Redução $> 10^6$	Redução de 10^5
	AQUA-3P	Redução de 10^6	Redução $> 10^5$
Especializadas para as gengivas	PTAX	Redução $> 10^6$	Redução $> 10^5$
	PGARD	Redução $> 10^6$	Redução $> 10^5$
	AC-GI	Morte bacteriana total	Morte bacteriana total
	EL-PBG	Morte bacteriana total	Morte bacteriana total

Legenda: COLG-3A (Colgate Tripla Ação); OB123 (Oral-B 1-2-3); EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação); AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca); PTAX (Parodontax Original); PGARD (PerioGard Colgate), AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas); EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas).

VI. DISCUSSÃO

Antes de mais, é importante referir que este trabalho de investigação experimental corresponde a um estudo pioneiro, que procura dar resposta à carência de estudos que comparem as pastas dentífricas testadas em relação à sua atividade antibacteriana nas bactérias *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Assim, ao constatar a atividade antibacteriana, previamente comprovada na literatura, de determinados ingredientes das pastas dentífricas testadas, é objetivado verificar a correlação desta atividade antibacteriana conhecida dos ingredientes com os resultados obtidos em cada pasta dentífrica.

1. Verificação da atividade antibacteriana das pastas dentífricas

As amostras das pastas “especializadas para as gengivas” AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) e EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas) formaram halos de inibição do crescimento nas placas inoculadas com *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Sendo que em ambas as bactérias, a amostra de EL-PBG originou o maior halo de inibição. No entanto, a formação de um halo não significa necessariamente morte bacteriana, uma vez que este método de difusão em ágar não distingue os efeitos bactericidas dos efeitos bacteriostáticos (Balouiri et al., 2016). Deste modo, avançou-se para a fase seguinte da experiência para verificar se apenas ocorreu inibição ou se ocorreu morte bacteriana (Passo 2A).

A amostra da pasta “especializada para as gengivas” PGARD (PerioGard Colgate) formou um pequeno halo de inibição do crescimento nas placas inoculadas com *P. gingivalis*, no entanto este não tinha um diâmetro suficiente para realizar a sub-inoculação e, assim, verificar se ocorreu inibição ou morte bacteriana. Deste modo, decidiu-se avançar para o Passo 2B para confirmar a redução do número de unidades formadoras de colónias por mililitro desta bactéria. Nas placas inoculadas com *P. intermedia*, esta pasta dentífrica não formou halo de inibição do crescimento, então realizou-se um ensaio quantitativo para determinar se, mesmo assim, existiria redução do número de UFC/ml (Passo 2B).

As amostras das pastas “não especializadas” COLG-3A (Colgate Tripla Ação), OB123 (Oral-B 1-2-3), EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação) e AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca) e a amostra da pasta “especializada para as gengivas” PTAX (Parodontax Original) não formaram halos de inibição do crescimento em nenhuma das placas inoculadas com *P. gingivalis* nem com *P. intermedia*. Deste modo,

avançou-se para a fase seguinte da experiência para verificar se, mesmo não havendo halo de inibição, ocorreu redução do número de UFC/ml (Passo 2B).

2. Verificação da atuação bactericida ou bacteriostática das amostras das pastas dentífricas com formação de halo de inibição do crescimento com diâmetro suficiente para realizar sub-inoculação em ambas as bactérias

Verificou-se que não houve turvação do meio líquido de caldo de BHI (Brain Heart Infusion) nos tubos correspondentes às amostras retiradas da área do halo de inibição do crescimento criado pela amostra de AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) e de EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas) em *P. gingivalis* e *P. intermedia*. A ausência de turvação demonstra que as amostras das pastas dentífricas AC-GI e EL-PBG provocaram a morte bacteriana total na zona do halo de inibição em ambas as bactérias, demonstrando que estas apresentam efeitos bactericidas contra *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

Ambas as pastas dentífricas foram testadas com a mesma concentração e quantidade e provocaram a morte bacteriana tanto em *P. gingivalis* como em *P. intermedia*. Como a amostra de EL-PBG originou um maior halo de inibição do crescimento, poderá indicar que esta pasta dentífrica tem uma maior concentração de substâncias com capacidade antimicrobiana e/ou que essas substâncias se difundem melhor na gelose, permitindo inativar o crescimento bacteriano num raio de ação maior.

Analisando os ingredientes ativos de todas as pastas dentífricas, pode-se verificar que apenas as pastas dentífricas AC-GI e EL-PBG possuem cloreto de cetilpiridínio (CPC) e carbonato de cálcio, que só a pasta dentífrica AC-GI possui ácido glicirretínico e que só a pasta dentífrica EL-PBG possui digluconato de clorohexidina.

O carbonato de cálcio é um ingrediente que funciona como abrasivo, sendo um agente de polimento da placa bacteriana e que, em conjunto com o fosfato, forma fosfato de cálcio que promove a remineralização dentária (Li et al., 2014; Subramanian et al., 2017). Contudo, neste estudo experimental, nem a sua capacidade abrasiva nem a sua capacidade de remineralização dentária influenciaram os resultados obtidos. No entanto, uma vez que em contacto com ADE o carbonato de cálcio produz CO₂ na sua forma gasosa e liberta iões de Ca e OH⁻ para a solução, este conduz a um aumento de pH (Nakashima et al., 2009). As bactérias periodontopatogénicas crescem em ambientes moderadamente ácidos, nomeadamente *P. intermedia* cresce em meios com 5 a 7 de pH

e *P. gingivalis* em meios com 6,5 a 7 de pH (Rodríguez-Agurto et al., 2023). Assim, não se pode descartar a possibilidade de que parte da atividade antibacteriana ocorreu como resultado da criação de um meio menos favorável para o crescimento e desenvolvimento das bactérias em estudo por parte do carbonato de cálcio.

O cloreto de cetilpiridínio (CPC) apresenta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativo presentes na cavidade oral, incluindo *P. gingivalis* e *P. intermedia*. O seu mecanismo de ação ocorre através da interação com a membrana celular bacteriana e provoca a perda dos componentes celulares, o que inibe o crescimento celular e, por fim, causa a morte celular (Rajendiran et al., 2021; Sreenivasan et al., 2012). Os resultados obtidos podem ser analisados perante a literatura existente, que demonstra que um colutório com 0,05% de CPC possui maior eficácia na prevenção e redução da placa bacteriana do que um colutório oral de controlo sem CPC (Hernandez-Cott et al., 2009; Lotufo et al., 2009). Um colutório com CPC possui uma capacidade de inibição microbiana superior, quando comparada com um colutório com flúor de concentração idêntica (Sreenivasan et al., 2012). Deste modo, coloca-se a possibilidade de que o CPC teve uma influência positiva na atividade antibacteriana apresentada pelas pastas dentífricas AC-GI e EL-PBG.

O digluconato de clorhexidina é o composto de CHX mais amplamente utilizado, tendo elevada atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativo incluindo *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Martu et al., 2021; Rajendiran et al., 2021). Deste modo, é espectável que este composto seja significativamente responsável pela atividade antibacteriana apresentada pela EL-PBG.

A floretina é uma molécula de dihidrocalcona encontrada na maçã. Esta apresenta propriedades antioxidantes e antibacterianas contra bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, suprimindo a produção de fímbrias, a adesão às células hospedeiras e a resposta inflamatória induzida pelo TNF- α (Betts et al., 2018; Moghaddam et al., 2022). Assim, não se pode eliminar a possibilidade de que esta também possa ter propriedades antibacterianas contra as bactérias em estudo e, consequentemente, ter influenciado positivamente os resultados da EL-PBG.

O ácido glicirretínico, ingrediente obtido do alcaçuz, é um agente antibacteriano natural contra diversas bactérias periodontopatogénicas, demonstrando ter uma maior atividade em *P. gingivalis* do que em *P. intermedia*. Também demonstra ser, em determinadas concentrações, capaz de inibir a coagregação entre *P. gingivalis* e

Streptococcus gordonii, etapa responsável pela génese da formação da placa bacteriana supragengival (Dewake et al., 2021; Rajendiran et al., 2021). No entanto, perante este estudo experimental, a capacidade do ácido glicirretínico de inibir a coagregação entre *P. gingivalis* com outras bactérias é de limitada relevância, uma vez que esta se encontrava inoculada de forma isolada. Não obstante, a capacidade antibacteriana inerente poderá ser um dos fatores explicativos da atividade antibacteriana demonstrada pela pasta dentífrica AC-GI.

Tanto os óleos essenciais (óleo de anis estrelado chinês e óleo de hortelã-pimenta) como os componentes de óleos essenciais (limoneno, mentol e eugenol) podem ter influenciado positivamente os resultados da pasta dentífrica AC-GI. O óleo derivado das frutas e sementes do anis estrelado chinês apresenta efeitos antibacterianos capazes de inibir o crescimento de vários microrganismos potencialmente patogénicos (Assiry et al., 2021). O óleo de hortelã-pimenta possui atividade antibacteriana, ainda que fraca, sendo mais tipicamente utilizado devido ao seu sabor agradável e não propriamente ao seu efeito antimicrobiano. No entanto, apesar disso, considera-se que quanto maior o teor de mentol melhor a atividade antimicrobiana. Sabendo que a pasta dentífrica AC-GI possui óleo de hortelã-pimenta e mentol, pode-se colocar a possibilidade de que, em conjunto, estes possam contribuir para o efeito antibacteriano apresentado por esta pasta dentífrica (Wińska et al., 2019). É provável que o eugenol possa ter contribuído para o efeito antibacteriano, pois já demonstrou ter atividade antibacteriana para as bactérias *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Marchese et al., 2017).

Ainda assim, é necessário avaliar as pastas dentífricas não somente pelos seus componentes isolados, mas como uma multiplicidade de ingredientes que atuam simultaneamente e, por vezes, em sinergia.

A AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) apresenta como ingredientes ativos o carbonato de cálcio, o cloreto de cetilpiridínio e o ácido glicirretínico, o primeiro sendo um tampão capaz de subir o pH da solução e os restantes sendo agentes antibacterianos. Todos estes ingredientes são capazes de afetar positivamente a atividade antibacteriana desta pasta dentífrica. Também é importante referir que, apesar da principal função dos óleos essenciais (óleo de anis estrelado chinês e óleo de hortelã-pimenta) e dos componentes de óleos essenciais (limoneno, mentol e eugenol) ser aromatizar a pasta dentífricas, estes podem ter contribuído com as suas propriedades antibacterianas para o efeito desta pasta dentífrica.

A EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas) apresenta como ingredientes ativos o carbonato de cálcio, o cloreto de cetilpiridínio (CPC) e o digluconato de clorohexidina (CHX), o primeiro sendo um tampão capaz de subir o pH da solução e os restantes sendo agentes antibacterianos. Estes dois últimos ingredientes são extremamente eficientes como agentes antibacterianos, e, quando em conjunto, como é o caso nesta pasta dentífrica, a atividade antibacteriana é exacerbada pela sinergia entre os compostos. Dado que o CPC, quando combinado com a CHX, aumenta a atividade antimicrobiana da CHX e reduz os seus efeitos adversos. Sendo que, um colutório com CHX a 0,12% + CPC a 0,05% fornece a mesma eficácia na redução de placa bacteriana e hemorragia gengival do que um colutório com CHX a 0,2% e possui reduzidos efeitos adversos (Guerra et al., 2018; Rajendiran et al., 2021).

3. Verificação da redução do número de UFC/ml quando não há formação de halo de inibição do crescimento ou o halo formado não permite efetuar a sub-inoculação devido ao seu diâmetro reduzido

Analisando os resultados, verificou-se que só as amostras das pastas dentífricas especializadas PGARD (PerioGard Colgate) e PTAX (Parodontax Original) é que apresentaram, em simultâneo, uma redução superior a 10^6 UFC/ml de *P. gingivalis* e uma redução superior a 10^5 UFC/ml de *P. intermedia*. As amostras de pastas não especializadas provocaram uma redução superior a 10^6 UFC/ml de *P. gingivalis* ou superior a 10^5 UFC/ml de *P. intermedia*, mas nunca em ambas as bactérias em simultâneo. A amostra de OB123 (Oral-B 1-2-3) não atingiu esse grau de redução em nenhuma das bactérias.

No entanto, qualquer uma destas reduções bacterianas demonstra que as pastas dentífricas testadas apresentam capacidade antibacteriana. As normas ISO_EN 1276 (Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas) e ISO – EN 13727 (Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area), nas quais este ensaio se baseou, indicam que se os produtos provocarem uma redução no número de bactérias, após um determinado tempo de contacto, de 10^5 UFC/ml (5 log) ou superior, possuem atividade bactericida. Assim, pode-se afirmar que todas as pastas dentífricas testadas possuem efeito bactericida.

Analisando os ingredientes ativos de todas as pastas dentífricas, o fluoreto de sódio foi um dos mais comuns nas pastas dentífricas estudadas, estando presente na PTAX (Parodontax Original), na OB123 (Oral-B 1-2-3), na AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca) e na COLG-3A (Colgate Tripla Ação). Este fluoreto apresenta efeitos anti-inflamatórios, que não são relevantes para este estudo experimental, e efeitos bacteriostáticos através dos iões de flúor (F^-) que têm a capacidade de interferir no metabolismo bacteriano por meio da inibição enzimática (Marinho et al., 2022; Rajendiran et al., 2021; Wang et al., 2022). Assim, a redução bacteriana apresentada pelas pastas dentífricas que apenas apresentam fluoreto de sódio como ingrediente ativo (OB123, AQUA-3P e COLG-3A), deve-se maioritariamente a este composto.

O bicarbonato de sódio, presente na pasta dentífrica PTAX (Parodontax Original), é um ingrediente que reduz o biofilme oral através do polimento da superfície dentária, mas a sua função de abrasivo não parece influenciar diretamente os resultados deste estudo. No entanto, tal como o carbonato de cálcio, o bicarbonato de sódio tem a capacidade de regular o pH, dificultando a criação de meios ácidos favoráveis ao crescimento e à multiplicação das bactérias periodontopatogénicas em estudo (Martu et al., 2021; Rodríguez-Agurto et al., 2023).

Assim, sendo o bicarbonato de sódio compatível com o fluoreto de sódio, coloca-se a possibilidade de que esta combinação de ingredientes presentes na pasta dentífrica PTAX resultou numa redução bacteriana, superior a 10^6 UFC/ml de *P. gingivalis* e superior a 10^5 UFC/ml de *P. intermedia*, devido ao efeito do fluoreto de sódio em interferir com o metabolismo bacteriano e ao efeito do bicarbonato de sódio em regular o pH.

O fluoreto de estanho tem ação anti-inflamatória e demonstra ter a capacidade de reduzir a placa bacteriana e a hemorragia gengival. O ião de estanho, tal como o ião de flúor, tem a capacidade de interferir no metabolismo bacteriano. Aparenta ser mais eficaz no controlo da placa bacteriana e na redução da gengivite do que o fluoreto de sódio, sendo capaz de alterar a composição microbiana dentro do biofilme oral. Frequentemente, é combinado com fluoreto de amina (também designado por olaflur), como é no caso da pasta dentífrica PGARD (PerioGard Colgate). Esta combinação apresenta uma maior atividade antibacteriana em comparação com o uso isolado de fluoreto de amina e uma maior redução da placa bacteriana do que o fluoreto de sódio. O efeito antiplaca apresentado pelo fluoreto de amina ocorre através da inibição da

adesão bacteriana (Cheng et al., 2017, Rajendiran et al., 2021; Sanz et al., 2013; Sh et al., 2013). Assim, pode-se colocar a possibilidade de que a redução bacteriana, superior a 10^6 UFC/ml de *P. gingivalis* e superior a 10^5 UFC/ml de *P. intermedia*, se possa dever a esta combinação de fluoretos bastante eficaz e com melhores resultados do que as pastas dentífricas que possuíam apenas fluoreto de sódio.

O hidrofluoreto de álcool nicotínico (álcool nicotínico HF), presente na pasta dentífrica EL-MULT (Elgydium: Multi-Ação), consiste em fluoridrato de nicometanol, um ingrediente patenteado pelos Laboratórios Pierre Fabre como fluorinol (Radzki et al., 2022). Trata-se de um sal orgânico de flúor que possui um ião de flúor ionicamente ligado ao resto da molécula. O fluoridrato de nicometanol leva a uma maior e mais rápida absorção de flúor na superfície dentária do que o fluoreto de sódio. Apresenta um papel relevante durante as fases de remineralização, permitindo uma melhor resistência aos ataques ácidos, promovendo a fixação dos iões flúor no esmalte e prevenindo a formação da cárie dentária. No entanto, para este estudo experimental, o seu efeito de remineralização e anticárie não apresenta relevância nos resultados. Contudo, este também demonstrou ter um efeito inibitório na glicólise salivar, levando a uma menor redução de pH e, conseqüentemente a meios menos ácidos (Sharkov, 2017). Assim, pode-se colocar a possibilidade de que o álcool nicotínico HF, contribuiu para a redução bacteriana efetuada pela EL-MULT, uma vez que a atividade antiglicolítica pode ter dificultado o crescimento bacteriano, criando um meio menos favorável para o desenvolvimento das bactérias em estudo, e que o ião de fluor presente possa ter interferido no metabolismo bacteriano.

O polietilenoglicol (PEG)-12 dimeticona, também presente na pasta dentífrica EL-MULT, é um ingrediente também denominado por siliglicol, que em combinação com o álcool nicotínico HF, promove uma maior absorção do flúor. Para além disso, previne a adesão bacteriana na superfície do esmalte, ajudando a prevenir o aparecimento da placa bacteriana (Sharkov, 2017). Apesar de ser um agente de revestimento, no estudo experimental, este não conseguiu prevenir totalmente essa adesão bacteriana no meio de ágar, no entanto não se pode retirar a possibilidade de que tenha influenciado de forma positiva os resultados.

O extrato de *phormidium uncinatum*, também presente na pasta dentífrica EL-MULT, é um ingrediente também denominado por *aquacyanee*, protege as gengivas graças às suas propriedades antioxidantes (Mourelle et al., 2017). Contudo, este

ingrediente, apesar de benéfico na prevenção e no combate à doença periodontal, aparentou não ser capaz de influenciar os resultados neste estudo experimental.

A EL-MULT possui diversos ingredientes que nenhuma das outras pastas dentífricas em estudo apresenta, incluindo os seus ingredientes ativos (álcool nicotinílico HF, do PEG-12 dimeticona e do extrato de *phormidium uncinatum*). A combinação de álcool nicotinílico HF e PEG-12 dimeticona pode explicar a redução superior a 10^6 de *P. gingivalis* e a redução de 10^5 de *P. intermedia*.

O limoneno é um componente de óleos essenciais que apresenta baixa atividade antimicrobiana quando usado isoladamente, principalmente em bactérias Gram-negativo, uma vez que estas possuem uma membrana externa praticamente impermeável a moléculas hidrofóbicas, apesar de algumas dessas moléculas conseguirem passar pelas proteínas porinas (canais transmembrana hidrofílicos). No entanto, não se pode eliminar a possibilidade de que, em conjunto com os outros agentes antibacterianos, o limoneno interferiu positivamente na atividade antibacteriana apresentada pelas pastas dentífricas AC-GI, PTAX, PGARD e AQUA-3P e EL-MULT (Gupta et al., 2021; Nazzaro et al., 2013).

No método de difusão em ágar, as propriedades físico-químicas de cada agente antimicrobiano, tais como o coeficiente de difusão e a solubilidade, influenciam a sua difusão pela matriz de ágar e, conseqüentemente, os resultados obtidos (Marinho et al., 2022). Assim, a influência dessas propriedades na difusão pelo ágar poderá explicar o porquê de algumas amostras de pastas dentífricas não criarem halo de inibição do crescimento, mas, quando realizado o ensaio quantitativo para avaliar a redução bacteriana, apresentarem reduções bacterianas bastantes elevadas.

4. Comparação da eficácia antibacteriana das pastas dentífricas em estudo

Este estudo de investigação permitiu verificar que todas as pastas dentífricas em estudo apresentaram efeito bactericida em *P. gingivalis* e *P. intermedia*. As amostras das pastas especializadas EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas) e AC-GI (Arthrodont Classic Gengivas Irritadas) provocaram a morte total das bactérias em estudo e as amostras das pastas especializadas PGARD (PerioGard Colgate) e PTAX (Parodontax Original) provocaram reduções superiores a 10^5 UFC/ml (5 log) em ambas as bactérias. Relativamente às pastas não especializadas, a amostra de AQUA-3P (Aquafresh Tripla Proteção Menta Fresca) provocou uma redução superior a 10^5

UFC/ml (5 log) em ambas as bactérias, enquanto as restantes apresentaram reduções superiores a 10^5 UFC/ml (5 log) em apenas uma das bactérias.

As amostras das pastas especializadas EL-PBG e AC-GI apresentaram resultados que aparentam indicar uma ação antibacteriana superior às restantes pastas dentífricas, apresentando a formação de halos de inibição do crescimento com morte bacteriana total em ambas as bactérias. A EL-PBG foi a pasta dentífrica que originou o maior halo de inibição do crescimento, indiciando que, dentro das pastas estudadas, esta é a pasta dentífrica que tem um maior efeito antibacteriano em relação a estas duas espécies periodontopatogénicas, o que poderá indicar que se trata da pasta dentífrica mais eficaz na prevenção e no combate à doença periodontal. Já a amostra de AC-GI, apesar de não ter sido capaz de criar um halo de inibição da mesma magnitude, continuou a demonstrar possuir uma importante capacidade como agente bactericida. Contudo, a aparente superioridade da EL-PBG poderá estar conectada com uma maior concentração dos ingredientes ativos com capacidade antibacteriana e/ou com uma composição química que permite uma melhor difusão dos compostos antibacterianos pela matriz de ágar. As amostras de PGARD e PTAX não formaram halos de inibição do crescimento passíveis de serem submetidos a sub-inoculação, aparentando demonstrar uma menor capacidade antibacteriana do que as amostras de EL-PBG e AC-GI, ainda assim, provocaram reduções superiores a 10^6 para *P. gingivalis* e superiores a 10^5 para *P. intermedia*.

VII. CONCLUSÃO

Atendendo aos dados obtidos, não foi possível efetuar tratamento estatístico, o que impossibilitou a verificação das hipóteses de estudo.

Ainda assim, foi possível verificar que aparentam existir diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” e as “não especializadas”, sendo que as pastas “especializadas para as gengivas” aparentam ser mais eficazes que as “não especializadas”.

Verificou-se ainda que aparentam existir diferenças na eficácia antibacteriana entre as pastas dentífricas “especializadas para as gengivas” testadas, sendo que a EL-PBG (Elgydium Placa Bacteriana & Gengivas) é a pasta dentífrica que aparenta ter um maior efeito antibacteriano em relação às bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, o que poderá indicar que esta se trata da pasta dentífrica mais eficaz na prevenção e no combate à doença periodontal.

VIII. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS

De realçar que este estudo experimental, para além de pioneiro, não existindo na literatura estudos idênticos com estas bactérias ou com o foco do presente estudo, trata-se também de um estudo piloto, que poderá ser continuado com um maior número de amostras e com mais ensaios, de modo a validar os resultados obtidos e reforçar as conclusões obtidas.

Ainda assim, é importante ter em conta que este estudo experimental foi realizado *in vitro* e as pastas dentífricas foram criadas para serem utilizadas na cavidade oral, para além de perspetivarem um uso conjunto com a limpeza mecânica. Para além disso, a atividade antibacteriana foi testada em bactérias isoladas, enquanto na cavidade oral, as bactérias estão organizadas em biofilmes complexos. Assim sendo, seria interessante realizar este estudo experimental *in vivo*, de modo confirmar a eficácia antibacteriana demonstrada pelas pastas dentífricas sob as características em que são utilizadas.

Não se pode descartar a possibilidade de na cavidade oral, com o seu uso rotineiro, as pastas dentífricas resultarem com níveis de eficácia ligeiramente díspares daqueles que aqui se verificaram, uma vez que num estudo *in vitro* não se consegue usufruir da totalidade das propriedades dos ingredientes ativos presentes nas pastas dentífricas. Ainda assim, os resultados aqui expostos representam fortes preditores da eficácia antibacteriana das pastas dentífricas sob análise para a prevenção e o combate à doença periodontal.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, A., & Gupta, A. (2020). Exploring the Factors Influencing the Choice of Oral Care Products: A Review on Personalized Approach. *International Journal of Oral and Dental Health*, 6(2), 1-6. <https://doi.org/10.23937/2469-5734/1510109>

Aleksijević, L. H., Aleksijević, M., Škrlec, I., Šram, M., Šram, M., & Talapko, J. (2022). Porphyromonas gingivalis Virulence Factors and Clinical Significance in Periodontal Disease and Coronary Artery Diseases. *Pathogens*, 11(10), 1-19. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens11101173>

Antunes, A., Botelho, J., Mendes, J. J., Delgado, A. S., Machado, V., & Proença, L. (2022). Geographical Distribution of Periodontitis Risk and Prevalence in Portugal Using Multivariable Data Mining and Modeling. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13634), 1-8. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013634>

Aruni, A. W., Dou, Y., Mishra, A., & Fletcher, H. M. (2015). The Biofilm Community: Rebels with a Cause. *Current Oral Health Reports*, 2, 48-56. <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0044-5>

Aspinall, S. R., Parker, J. K., & Khutoryanskiy, V. V. (2021). Oral care product formulations, properties and challenges. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 200(111567), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111567>

Assiry, A. A., Karobari, M. I., Bhavikatti, S. K., & Marya, A. (2021). Crossover Analysis of the Astringent, Antimicrobial, and Anti-inflammatory Effects of Illicium verum/Star Anise in the Oral Cavity. *Biomed Research International*, 2021(5510174), 1-6. <https://doi.org/10.1155/2021/5510174>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Betts, J. W., Hornsey, M., & La Ragione, R. M. (2018). Novel Antibacterials: Alternatives to Traditional Antibiotics. *Advances in Microbial Physiology*, 73, 123-169. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2018.06.001>

Bobetsis, Y. A., Graziani, F., Gürsoy, M., & Madianos, P. N. (2020). Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. *Periodontology 2000*, 83(1), 154-174. <https://doi.org/10.1111/prd.12294>

Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), 1-8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>

Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival

diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(1), 74-84. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>

Cheng, X., Liu, J., Li, J., Zhou, X., Wang, L., Liu, J., & Xu, X. (2017). Comparative effect of a stannous fluoride toothpaste and a sodium fluoride toothpaste on a multispecies biofilm. *Archives of Oral Biology*, 74, 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.030>

Cong, S., Tong, Q., Peng, Q., Shen, T., Zhu, X., Xu, Y., & Qi, S. (2020). In vitro antibacterial activity of diosgenin on *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Molecular Medicine Reports*, 22(6), 5392-5398. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11620>

Cugini, C., Ramasubbu, N., Tsiagbe, V. K., & Fine, D. H. (2021). Dysbiosis From a Microbial and Host Perspective Relative to Oral Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 12(617485), 1-23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.617485>

Daalderop, L. A., Wieland, B. V., Tomsin, K., Reyes, L., Kramer, B. W., Vanterpool, S. F., & Been, J. V. (2018). Periodontal Disease and Pregnancy Outcomes: Overview of Systematic Reviews. *JDR Clinical & Translational Research*, 3(1), 10-27. <https://doi.org/10.1177/2380084417731097>

Dewake, N., Ma, X., Sato, K., Nakatsu, S., Yoshimura, K., Eshita, Y., Fujinaka, H., Yano, Y., Yoshinari, N., & Yoshida, A. (2021). β -Glycyrrhetic acid inhibits the bacterial growth and biofilm formation by supragingival plaque commensals. *Microbiology and Immunology*, 65(9), 343-351. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12884>

EN 13727: 2015 - Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1); CEN.

EN 1276:2019 - Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1), CEN.

Do, L. G., & Australian Research Centre for Population Oral Health. (2019). Guidelines for use of fluorides in Australia: update 2019. *Australian Dental Journal*, 65(1), 30-38. <https://doi.org/10.1111/adj.12742>

Gasner, N. S., & Schure, R. S. (2023). Periodontal Disease. *StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554590/>

Gautam, B., Dongol, E., & Shrestha, A. (2017). In-vitro antimicrobial activity of different toothpastes. *Journal of Kathmandu Medical College*, 6(2), 52-58. <https://doi.org/10.3126/jkmc.v6i2.19803>

Guerra, F., Pasqualotto, D., Rinaldo, F., Mazur, M., Corridore, D., Nofroni, I., Ottolenghi, L., & Nardi, G. M. (2018). Therapeutic efficacy of chlorhexidine-based

mouthwashes and its adverse events: Performance-related evaluation of mouthwashes added with Anti-Discoloration System and cetylpyridinium chloride. *International Journal of Dental Hygiene*, 17(3), 229-236. <https://doi.org/10.1111/idh.12371>

Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021). Journey of Limonene as an Antimicrobial Agent. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3), 1094-1110. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.01>

Harvey, J. D. (2017). Periodontal Microbiology. *Dental Clinics of North America*, 61(2), 253-269. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.005>

Hemalatha, D. M., Chandran, N., Arjun, M. R., Geethu, M. K., & Gokulavardhini, S. (2022). Dentifrice - Fricare your Teeth. *Journal of Dental Science Research Reviews & Reports*, 4(4), 1-4. <https://www.onlinescientificresearch.com/articles/dentifrice-fricare-your-teeth.pdf>

Hernandez-Cott, P. L., Boneta, A. E., Stewart, B., DeVizio, W., & Proskin, H. M. (2009). Clinical investigation of the efficacy of a commercial mouthrinse containing 0.05% cetylpyridinium chloride in reducing dental plaque. *The Journal of Clinical Dentistry*, 20(2), 39-44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19591335/>

Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., & Maeda, N. (2009). Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *Journal of Dental Research*, 88(11), 982-990. <https://doi.org/10.1177/0022034509346811>

How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, 7(53), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>

Iba, B., & Adamu, V. E. (2021). Tooth brushing: An effective oral hygiene measure. *Orapuh Journal*, 2(2), 1-7. <https://www.orapuh.org/ojs/ojs-3.1.2-4/index.php/orapj/article/view/39>

Janakiram, C., Kumar, C. V. D., & Joseph J. (2017). Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 8(1), 16-21. <https://doi.org/10.4103%2F0976-9668.198344>

Jia, L., Han, N., Du, J. Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of Porphyromonas gingivalis via Toll-Like Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(262), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>

Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17038), 1-14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>

Kwon, T., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*, 71(6), 462-476. <https://doi.org/10.1111/idj.12630>

Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *Journal of Periodontology*, 89(1), 9-16. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0517>

- Leite, F. R. M., Nascimento, G. G., Scheutz, F., & López, R. (2018). Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. *American Journal of Preventive Medicine*, 54(6), 831-841. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.02.014>
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42(1), 12-20. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6)
- Lippert, F. (2013). An Introduction to Toothpaste – Its Purpose, History and Ingredients. *Monographs in Oral Science*, 23, 1-14. <https://doi.org/10.1159/000350456>
- Lopes, L. C. F., & Soares, L. E. S. (2022). Dentifricos contendo fitoterápicos em sua composi o e seus benefcios: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*, 11(8), 1-7. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i8.31508>
- Lotufo, R., Calil, C. M., Feng, H. S., Sekiguchi, R. T., Stewart, B., DeVizio, W., & Proskin, H. M. (2009). Clinical investigation of the efficacy of a commercial mouthrinse containing 0.05% cetylpyridinium chloride in preventing dental plaque. *The Journal of Clinical Dentistry*, 20(2), 50-54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19591337/>
- Luan, X., Zhou, X., Naqvi, A., Francis, M., Foyle, D., Nares, S., & Diekwisch, T. G. H. (2018). MicroRNAs and immunity in periodontal health and disease. *International Journal of Oral Science*, 10(24), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0025-y>
- Machado, V., Botelho, J., Neves, J. A., Proença, L., Delgado, A. S., & Mendes, J. J. (2020). The prevalence of periodontal diseases in Portugal and correspondent digital awareness for the period 2004-2017: analysis of data from Global Burden of Disease and Google Trends. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 61(1), 10-16. <https://revista.spemd.pt/article/1522>
- Madhuri, S. V., & Buggapati, L. (2017). Dentifrices: An overview from past to present. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 3(4), 352-355. <https://www.oraljournal.com/pdf/2017/vol3issue4/PartE/3-4-42-955.pdf>
- Madiba, T. K., & Bhayat, A. (2018). Periodontal disease - Risk factors and treatment options. *South African Dental Journal*, 73(9), 571-575. http://www.scielo.org.za/scielo.php?pid=S0011-85162018000900005&script=sci_abstract
- Maldupa, I., Brinkmane, A., Rendeniece, I., & Mihailova, A. (2012). Evidence based toothpaste classification, according to certain characteristics of their chemical composition. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 14(1), 12-22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22617330/>
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Izadi, M., Abdollahi, M., Nabavi, S. M., & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 668-689. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>
- Marinho, V. T., Reis, A. C. D., & Valente, M. L. D. C. (2022). Efficacy of Antimicrobial Agents in Dentifrices: A Systematic Review. *Antibiotics*, 11(10), 1-17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101413>

- Martu, M. A., Stoleriu, S., Pasarin, L., Tudorancea, D., Sioustis, I. A., Taraboanta, I., Sandu, D., & Solomon, S. M. (2021). Toothpastes composition and their role in oral cavity hygiene. *Romanian Journal of Medical and Dental Education*, 10(3), 6-15. <https://journal.adre.ro/wp-content/uploads/2021/08/TOOTHPASTES-COMPOSITION-AND-THEIR-ROLE-IN.pdf>
- Mehrotra, N., & Singh, S. (2023). Periodontitis. *StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541126/>
- Mei, F., Xie, M., Huang, X. Long, Y., Lu, X., Wang, X., & Chen, L. (2020). Porphyromonas gingivalis and Its Systemic Impact: Current Status. *Pathogens*, 9(11), 1-23. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110944>
- Minty, M., Canceil, T., Serino, M., Burcelin, R., Tercé, F., & Blasco-Baque, V. (2019). Oral microbiota-induced periodontitis: a new risk factor of metabolic diseases. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20, 449-459. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09526-8>
- Moghaddam, A., Ranjbar, R., Yazdani, M., Tahmasebi, E., Alam, M., Abbasi, K., Hosseini, Z. S., & Tebyaniyan, H. (2022). The Current Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Synthetic/Herbal/Biomaterials in Dental Application. *BioMed Research International*, 2022(8856025), 1-26. <https://doi.org/10.1155/2022/8856025>
- Mohanty, R., Asopa, S. J., Joseph, M. D., Singh, B., Rajguru, J. P., Saidath, K., & Sharma, U. (2019). Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(11), 3480-3486. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_759_19
- Mourelle, M. L., Gómez, C. P., Legido, J. L. (2017). The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy, *Cosmetics*, (4)46, 1-14. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040046>
- Münchow, E. A., Oliveira, H. D. L., Valente, L. L., Isolan, C. P., & Piva, E. (2015). Prevotella intermedia: Uma breve revisão. *Braz J Periodontol*, 25(1), 21-27. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-784767>
- Nakashima, S., Yoshie, M., Sano, H., & Bahar, A. (2009). Effect of a test dentifrice containing nano-sized calcium carbonate on remineralization of enamel lesions in vitro. *Journal of Oral Science*, 51(1), 69-77. <https://doi.org/10.2334/josnusd.51.69>
- Nayak, A., Bhat, K., Shivanaikar, S., Pushpa, P., Kugaji, M., & Kumbar, V. (2018). Detection of red complex organisms in chronic periodontitis by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Advanced Clinical & Research Insights*, 5(5), 139-144. https://www.researchgate.net/publication/330779957_Detection_of_red_complex_organisms_in_chronic_periodontitis_by_multiplex_polymerase_chain_reaction
- Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 1(2), 72-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28539867/>

Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L. D., Coppola, R., & Feo, V. D. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

Neves, M. C., Neves, J. S., Gouveia, M., Estevinho, F., Subtil, P., & Leite-Moreira, J. (2019). Diabetes Mellitus e Doença Periodontal. *Revista Portuguesa de Diabetes*, 14(2), 63-70. <http://www.revportdiabetes.com/wp-content/uploads/2019/07/RPD-Junho-2019-Artigo-de-Revis C3%A3o-p C3%A1gs-63-70.pdf>

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(1), 173-182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>

Park, O. J., Yi, H., Jeon, J. H., Kang, S. S., Koo, K. T., Kum, K. Y., Chun, J., Yun, C. H., & Han, S. H. (2015). Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *Journal of Dental Research*, 94(7), 921-927. <https://doi.org/10.1177/0022034515583531>

Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herre o, C. C., Kearns, C., Benzian, H., Allison, P., & Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249-260. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)31146-8)

Perry, D. A., Beemsterboer, P. L., & Essex, G. (2014). *Periodontology for the Dental Hygienist* (4th ed.). Elsevier.

Pollick, H. (2018). The Role of Fluoride in the Prevention of Tooth Decay. *Pediatric Clinics of North America*, 65(5), 923-940. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.05.014>

Prashanthi S., Reshma M., Prasad, P. A. K., Nalini, H. E., & Devi, R. R. (2021). Genetic polymorphisms in periodontal disease. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 7(3), 252-257. <https://doi.org/10.22271/oral.2021.v7.i3d.1310>

Radzki, D., Wilhelm-W glarz, M., Pruska, K., Kusiak, A., & Ordyniec-Kwa snica, I. (2022). A Fresh Look at Mouthwashes-What Is Inside and What Is It For?. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 19(7),1-27. <https://doi.org/10.3390/ijerph19073926>

Rajendiran, M., Trivedi, H. M., Chen, D., Gajendrareddy, P., & Chen, L. (2021). Recent Development of Active Ingredients in Mouthwashes and Toothpastes for Periodontal Diseases. *Molecules*, 26(7), 1-21. <https://doi.org/10.3390/molecules26072001>

Ramos, H. (2014). Bactérias Anaeróbias. In H. Barroso, A. Melio-Silvestre, & N. Taveira (Eds.), *Microbiologia Médica* (1st ed., pp. 427-443). Lidel.

Regulamento (UE) n.  344/2013 da comissão de 4 de abril de 2013 que altera os anexos II, III, V e VI do Regulamento (CE) n.  1223/2009 do Parlamento Europeu e do

Conselho relativo aos produtos cosméticos. Jornal Oficial da União Europeia L 114/1. Comissão Europeia.

Regulamento (UE) n.º 1197/2013 da comissão de 25 de novembro de 2013 que altera o anexo III do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos produtos cosméticos. Jornal Oficial da União Europeia L 315/34. Comissão Europeia.

Regulamento (UE) n.º 358/2014 da comissão de 9 de abril de 2014 que altera os anexos II e V do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos produtos cosméticos. Jornal Oficial da União Europeia L 107/5. Comissão Europeia.

Retamozo, B., Shabahang, S., Johnson, N., Aprecio, R. M., & Torabinejad, M. (2010). Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 36(3), 520-523. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.12.005>

Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., & Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2), 94-100. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)00034-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)00034-3)

Rocha, E. F. D., Seibel, A. B., Nogueira, A. N., Rocha, V. C. F. D. (2019). Envelhecimento humano e desenvolvimento da doença periodontal. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 26(775), 1-6. <https://doi.org/10.25248/reas.e775.2019>

Rodríguez-Agurto, A., Bravo, M., Magán-Fernandez, A., López-Toruño, A., Muñoz, R., Ferrer, J., & Mesa, F. (2023). Randomized clinical trial on the clinical effects of a toothpaste containing extra virgin olive oil, xylitol, and betaine in gingivitis. *Scientific Reports*, 13(6294), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33521-4>

Salvi, G. E., Rocuzzo, A., Imber, J. C., Stähli, A., Klinge, B., & Lang, N. P. (2023). Clinical periodontal diagnosis. *Periodontology 2000*. <https://doi.org/10.1111/prd.12487>

Santos, F. A. D. L., Faustino, J., Ribeiro, M. A. A., Gonçalves, L. A. C., & Rocha, V. F. B. (2021). O tratamento da doença periodontal e a influência do tabaco nas suas diversas formas de utilização. *Revista do CROMG*, 20(2), 34-39. <https://doi.org/10.61217/rcromg.v20i2.207>

Sanz, M., Serrano, J., Iniesta, M., Cruz, I. S., & Herrera, D. (2013). Antiplaque and Antigingivitis Toothpastes. *Monographs in Oral Science*, 23, 27-44. <https://doi.org/10.1159/000350465>

Schaefer, A. S. (2018). Genetics of periodontitis: Discovery, biology, and clinical impact. *Periodontology 2000*, 78(1), 162-173. <https://doi.org/10.1111/prd.12232>

Sh, P., Raghu, R., Shetty, A., Gautham, P., Reddy, S., & Srinivasan, R. (2013). Effect of organic versus inorganic fluoride on enamel microhardness: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, 16(3), 203-207. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.111314>

- Sharda, S., Prasad, K. V. V., Shetty, P. J., & Nikhil, K. (2018). Effectiveness of Desensitizing Dentifrice and Mouthwash on Dentin Hypersensitivity and Tooth Remineralization. *Contemporary Clinical Dentistry*, 9(3), 415-420. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_167_18
- Sharkov N. (2017). Effects of nicomethanol hydrofluoride on dental enamel and synthetic apatites: a role for anti-caries protection. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 18, 411-418. <https://doi.org/10.1007/s40368-017-0314-8>
- Sharma, G., Garg, N., Hasan, S., & Shirodkar, S. (2022). Prevotella: An insight into its characteristics and associated virulence factors. *Microbial Pathogenesis*, 169(105673), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105673>
- Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M. K. (2016). Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomarker insights*, 11, 95-104. <https://doi.org/10.4137/BMI.S38440>
- Silva, N. D., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. D. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S. D., & Gomes, R. A. R. (2010). *Manual de M todos de Análise Microbiol gica de Alimentos e água*. (4th ed.). Livraria Varela.
- Smalley, J. W., & Olczak, T. (2016). Heme acquisition mechanisms of Porphyromonas gingivalis – strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. *Molecular Oral Microbiology*, 32(1), 1-23. <https://doi.org/10.1111/omi.12149>
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000, 38, 135-187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent Jr, R. L., (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Sreenivasan, P. K., Haraszthy, V. I., & Zambon, J. J. (2012). Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Letters in Applied Microbiology*, 56(1), 14-20. <https://doi.org/10.1111/lam.12008>
- Subramanian, S., Appukuttan, D., Tadepalli, A., Gnana, P. P. S., & Victor, D. J. (2017). The Role of Abrasives in Dentifrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(2), 221-224. https://www.researchgate.net/publication/316696976_The_role_of_abrasives_in_dentifrices
- Umanah, A. U., & Braimoh, O. B. (2017). Oral Hygiene Practices and Factors Influencing the Choice of Oral Hygiene Materials among Undergraduate Students at the University of Port Harcourt, Rivers State, Nigeria. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 6(1), 3-7. <https://doi.org/10.4103/2277-4696.205440>
- Vajrabhaya, L. O., Korsuwannawong, S., Ruangsawasdi, N., Phruksaniyom, C., & Srichan, R. (2022). The efficiency of natural wound healing and bacterial biofilm inhibition of Aloe vera and Sodium Chloride toothpaste preparation. *BMC*

Complementary Medicine and Therapies, 22(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03548-7>

Valkenburg, C., Van der Weijden, F. A., & Slot, D. E. (2019). Plaque control and reduction of gingivitis: The evidence for dentifrices. *Periodontology 2000*, 79(1), 221-232. <https://doi.org/10.1111/prd.12257>

Wang, X., Tewari, N., Sato, F., Tanimoto, K., Thangavelu, L., Makishima, M., & Bhawal, U. K. (2022). Biphasic Functions of Sodium Fluoride (NaF) in Soft and in Hard Periodontal Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 1-15. <https://doi.org/10.3390/ijms23020962>

Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative?. *Molecules*, 24(11), 1-21. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>

World Health Organization (WHO). (2022). *Global oral health status report: Towards universal health coverage for oral health by 2030*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>

Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 120, 45-84. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>

Zhang, Z., Liu, D., Liu, S., Zhang, S., & Pan, Y. (2021). The Role of Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles in Periodontal Disease and Related Systemic Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(585917), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585917>