



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

EFICÁCIA *IN VITRO* DE DOIS VEÍCULOS DE ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE NISINA A
ENTEROCOCCI ISOLADOS DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

Tiago Miguel Martins Trovão

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

Doutora Lisa Alexandra Pereira
Mestrinho

ORIENTADOR

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

CO-ORIENTADOR

Dra. Carina Faria Ferreira

2017
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

EFICÁCIA *IN VITRO* DE DOIS VEÍCULOS DE ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE NISINA A
ENTEROCOCCI ISOLADOS DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

Tiago Miguel Martins Trovão

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

Doutora Lisa Alexandra Pereira
Mestrinho

ORIENTADOR

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

CO-ORIENTADOR

Dra. Carina Ferreira

2017
LISBOA

Qualquer agradecimento que não começasse pela minha família não seria sincero, os meus pais sempre fizeram tudo o que podem por mim e é graças a eles que cheguei até aqui. Um enorme obrigado, sem vocês nada disto seria possível, espero deixar-vos orgulhosos.

Obrigado Catarina, por me ajudares a aturar os pais há 18 anos e me ajudares sempre que preciso.

Obrigado Soraia, viste-me a tirar este curso, durante os meus anos de estudante, espero que agora possas também estar presente nos meus anos de profissional.

Obrigado Ana Rodrigues pelas horas de estudo ao telefone, obrigado Carlota Gil pelas manhãs na marginal, obrigado João Figueiredo por todo o vocabulário que me ensinaste, obrigado João Poças por todos os factos à toa com que nos brindaste, obrigado Mariana Lopes por seres tão seletiva, sendo que me seleccionaste a mim. Sobretudo obrigado por tantos risos que partilhei com vocês.

Obrigado Eva, muito deste trabalho é mérito teu e não me podia ter calhado uma doutoranda mais fixe, ensinaste-me muito, mas também me ri muito contigo.

Obrigado Professora Manuela, tem uma paciência de santo para nós, eu a Filipa e o Luís, devemos-lhe ter dado muitas dores de cabeça, mas sempre foi incansável comigo. Um obrigado também a eles os dois porque tornaram o laboratório mais divertido.

Obrigado Professora Berta pela sua disponibilidade para os alunos, sempre me recebeu de porta aberta nas muitas vezes que a si recorri. Ainda hei de recorrer mais vezes.

Obrigado a toda a equipa da VetOeiras, por me terem recebido sempre com um sorriso na cara e por tudo o que me ensinaram.

Obrigado aos meus amigos dos Salesianos, em particular ao Bruno, ao Guerreiro, ao Rodrigo, ao Tiago e ao Tomás, pelas horas de estudo e noites de copos, e à professora Maria José por todo o apoio e carinho que me deu.

Obrigado a todos aqueles que se cruzaram comigo no meu percurso académico dos Salesianos de Manique à Faculdade de Medicina Veterinária.

Eficácia *in vitro* de dois veículos de administração tópica de nisina a *Enterococci* isolados de cães com doença periodontal.

A doença periodontal (DP) é uma das doenças mais frequentes no cão, afetando 80 a 85% dos animais com mais de dois anos. É uma doença inflamatória crônica de etiologia multifatorial, inicia-se com o desenvolvimento de placa bacteriana que origina uma reação inflamatória do organismo, que conduz às alterações que ocorrem na gengiva e no periodonto.

O *Enterococcus* spp. é um microrganismo frequentemente isolado a partir da cavidade oral do cão, sendo comensal do trato gastrointestinal e estando associado a complicações sistêmicas enquanto oportunista.

Uma possível estratégia para prevenir e tratar a DP é a utilização de péptidos antimicrobianos (PAM) como a nisina, um composto com atividade antimicrobiana contra microrganismos gram-positivos e aprovado como aditivo alimentar (E234).

O objetivo deste estudo foi avaliar se a nisina A (2,5%) mantém a sua atividade antimicrobiana quando incorporada em dois veículos de administração. Para tal, a atividade inibitória da nisina incorporada em pasta dentífrica e gel de goma de guar foi testada numa coleção de 46 *Enterococcus* spp., obtidos a partir de cães com DP.

O potencial da pasta dentífrica foi avaliado através de uma técnica de difusão em poço com a medição dos diâmetros dos halos de inibição de multiplicação bacteriana. A combinação de nisina com gel goma de guar foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB).

Em suma, a avaliação da nisina como composto inibitório de *Enterococcus* spp. mostrou resultados muito promissores, uma vez que este PAM manteve a sua atividade antimicrobiana quando incorporado em qualquer um dos dois veículos de administração testados.

A pasta dentífrica, demonstrou ser capaz de inibir a multiplicação de 4 dos 46 isolados (8,7 %) mesmo não estando suplementada com nisina; quando suplementada, teve a capacidade de inibir 42 dos 46 isolados (91,3 %). A solução de nisina e gel de goma de guar, apresentou uma CMI média de 0,9 mg/mL e CMB média de 2,3 mg/mL, demonstrando que a solução é eficaz em concentrações clinicamente alcançáveis.

As doses de nisina correspondentes às concentrações testadas e com eficácia comprovada neste estudo são consideravelmente mais baixas que a dose diária aceitável (DDA) de 0 – 2 mg/Kg, estabelecida pela WHO.

Palavras-chave: doença periodontal, *Enterococcus* spp., gel de goma de guar, nisina, pasta dentífrica veterinária, veículos de administração

In vitro efficacy of two topical delivery systems of nisin to Enterococci isolated from dogs with periodontal disease.

Periodontal disease (PD) is one of the most frequent diseases in dogs, affecting 80 to 85% of the animals older than 2 years of age. It is a chronic inflammatory disease with a multifactorial aetiology, being promoted by the development of a bacterial plaque that causes an inflammatory reaction that leads to the alterations in the gingiva and periodontum.

Enterococcus spp. is a microorganism frequently present in the oral cavity of dogs, being a commensal microorganism of the gastrointestinal tract, and being associated with systemic complications as an opportunistic bacteria.

A possible strategy to prevent and treat PD is to use antimicrobial peptides such as nisin, an approved food preservative (E234) with antimicrobial activity against gram-positive bacteria.

This study aimed to evaluate if nisin A (2,5%) maintains its antimicrobial activity when incorporated in two delivery systems. The inhibitory activity of nisin incorporated into a veterinary toothpaste and in guar gum gel was tested against 46 *Enterococcus* spp. collected from dogs with PD.

The potential of the veterinary toothpaste to be used as a delivery system was evaluated by a well diffusion assay measuring inhibition halos diameters caused by the different solutions. The inhibitory potential of nisin incorporated in guar gum gel was assessed by the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

To summarize, nisin shows very promising results maintaining its antimicrobial activity when incorporated in either of the two delivery systems tested.

The veterinary toothpaste by itself was capable of inhibiting the growth of 4 of the 46 isolates (8,7%) but when supplemented with nisin its inhibitory capabilities increased, being able to inhibit 42 out of the 46 isolates (91,3 %).

Nisin retained its effectiveness when diluted in guar gum gel with a mean MIC value of 0,9 mg/mL and a mean MBC value of 2,3 mg/mL. This proves this solution is effective in clinical achievable concentrations.

The nisin dosages corresponding to the tested concentrations, and proved effective, are much lower than the acceptable daily intake (ADI), 0 – 2 mg/Kg, set by the WHO.

Key-words: delivery systems, *Enterococcus* spp., guar gum gel, nisin, periodontal disease, veterinary toothpaste.

Índice Geral

Índice Geral	vii
Índice de Imagens	x
Índice de Figuras	x
Índice de Gráficos.....	xi
Índice de Tabelas	xi
Índice de Anexos	xi
Lista de abreviaturas	xiii
I. Relatório de estágio	1
1. Estágio VetOeiras	1
2. Estágio no Laboratório Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária	3
II. Revisão bibliográfica.....	5
1. Doença Periodontal.....	5
1.1 A cavidade oral do cão	5
1.2 Microbiota da cavidade oral do cão	7
1.3 Patogenia da doença periodontal.....	7
1.4 Sinais clínicos e fases.....	9
1.5 Diagnóstico.....	12
1.6 Tratamento	13
1.7 Estratégias de prevenção	16
1.8 Consequências locais.....	17
1.9 Consequências sistémicas	18
2. Género Enterococcus.....	19
2.1 Características gerais.....	19
2.2 Ecologia.....	22
2.3 Infecção por Enterococcus spp.	22
2.4 Resistência a compostos antimicrobianos	23

3.	Nisina.....	26
3.1	Características gerais.....	26
3.2	Biossíntese.....	27
3.3	Modo de ação	28
3.4	Resistência à nisina	29
3.5	Aplicações da nisina.....	29
3.6	Nisina no tratamento da doença periodontal	30
3.7	Veículos de administração	31
3.7.1	Gel de goma de guar	32
III.	Desenvolvimento experimental	33
1.	Objetivos.....	33
2.	Materiais e métodos.....	34
2.1	Isolados bacterianos	34
2.2	Nisina	34
2.3	Veículos de administração	35
2.3.1	Pasta dentífrica.....	35
2.3.2	Gel de goma de guar	35
2.4	Avaliação do potencial inibitório da solução de pasta dentífrica C.E.T.® e nisina, através do método de difusão em poço.....	35
2.5	Determinação da concentração mínima inibitória da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina.....	36
2.6	Determinação da concentração mínima bactericida da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina.....	38
3.	Análise estatística	39
4.	Resultados e discussão	40
4.1	Avaliação do potencial inibitório da solução de pasta dentífrica C.E.T.® e nisina, através do método de difusão em poço.....	41
4.2	Determinação da concentração mínima inibitória da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina.....	45

4.3	Determinação da concentração mínima bactericida da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina.....	48
4.4	Atividade bactericida.....	50
4.5	Dose Diária Aceitável	51
4.6	Limitações do estudo.....	52
4.7	Perspetivas futuras.....	53
5.	Conclusões.....	55
	Bibliografia.....	56
	Anexos.....	66

Índice de Imagens

Imagem 1: Exposição de furca de grau III (imagem gentilmente cedida por Veterinary Transplant Services, 2014).	10
Imagem 2: Recessão gengival (imagem gentilmente cedida por Niemiec, B.).....	10
Imagem 3: Diferentes estádios da DP (imagens gentilmente cedidas por Niemiec, B.).....	12
Imagem 4: Padrão horizontal de perda de osso alveolar (imagens gentilmente cedidas por dogdentist).	12
Imagem 5: Abscesso da raiz de um dente com inchaço ventral ao olho (imagem gentilmente cedida por Niemiec, B.).....	18
Imagem 6: Halos de inibição de multiplicação bacteriana obtidos no ensaio de pasta dentífrica suplementada com nisina (original do autor).	36
Imagem 7: Leitura de uma microplaca (original do autor).....	37
Imagem 8: Exemplo dos resultados obtidos na determinação da CMB para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (original do autor).....	38

Índice de Figuras

Figura 1: Corte sagital de um molar canino (original do autor).....	5
Figura 2: Corte sagital de um dente canino (original do autor).....	6
Figura 3: Comparação de uma gengiva saudável com gengivas afetadas por doença periodontal (original do autor).....	11
Figura 4: Esquema representativo das cadeias peptídicas e das pontes inter-peptídicas presentes na parede celular de <i>Enterococcus</i> spp. (adaptada de Coyotte & Hancock, 2002). .	21
Figura 5: Molécula de nisina (adaptado de Shin et al., 2015).	26
Figura 6: Biossíntese da nisina (adaptado de Cheigh, 2005).....	28
Figura 7: Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CMI da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (original do autor).	37
Figura 8: Esquema representativo de uma placa de TSA para determinação da CMB, realizada para uma estirpe com CMI = 1 mg/mL (original do autor).....	38
Figura 9: Subunidade de uma molécula de goma de guar (original do autor).....	47

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição de horas do estágio curricular pelos diversos serviços.....	1
Gráfico 2: Distribuição relativa das consultas de especialidade nas diferentes áreas.	2
Gráfico 3: Relação entre as concentrações de nisina presentes na pasta dentífrica suplementada e a observação dos primeiros halos de inibição de multiplicação bacteriana de cada estirpe.	41
Gráfico 4: Gráfico representativo das três categorias de estirpes, classificadas de acordo com a sua resposta à pasta dentífrica suplementada.	42
Gráfico 5: Média dos diâmetros dos halos de inibição de multiplicação consoante a concentração de nisina presente na pasta dentífrica suplementada.	44
Gráfico 6: Comparação entre os valores médios de CMI obtidos para cada estirpe no ensaio com a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina e os valores médios de CMI obtidos para cada estirpe no estudo de Pinheiro, 2016.....	46
Gráfico 7: Comparação entre os valores médios de CMB obtidos para cada estirpe no ensaio com a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina e os resultados de Pinheiro, 2016.	49

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características que permitem a distinção entre <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> (adaptada de Kilpper-Balz e Schleifer, 1984 e de Mundt, 1986).....	20
--	----

Índice de Anexos

Anexo 1: Diâmetros dos halos de inibição de multiplicação bacteriana obtidos no ensaio para a solução pasta dentífrica suplementada com nisina (mm).	66
Anexo 2: CMI para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (mg/mL)....	67
Anexo 3: CMI obtida para a nisina (mg/mL) (Pinheiro, 2016).	68
Anexo 4: Comparação com os valores da CMI (mg/mL) obtidos para a nisina e para o gel de goma de guar suplementado com nisina.....	69
Anexo 5: CMB para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (mg/mL)...	70

Anexo 6: CMB obtida para a nisina (mg/mL) (Pinheiro, 2016).....	71
Anexo 7: Comparação com os valores da CMB (mg/mL) obtidos para a nisina e para o gel de goma de guar suplementado com nisina.....	72
Anexo 8: Caracterização das diferentes estirpes de Enterococcus spp. (Tavares, 2014).	73
Anexo 9: Caracterização do perfil de resistência das estirpes de Enterococcus spp. (Tavares, 2014).....	75
Anexo 10: Atividade bactericida; rácio CMB/CMI.	76
Anexo 11: Resumo do artigo: “Canine periodontal disease and its systemic implications”....	77
Anexo 12: Resumo da comunicação oral: “Prevention of enterococcal periodontal disease in dogs: An experimental approach using an antimicrobial peptide”.....	78

Lista de abreviaturas

μL – Microlitro

AINE – Anti-inflamatório não esteroide

APA – American psychological association

ATP – Adenosina trifosfato

aW – Atividade da água

BHI – Brain heart infusion

BPW – Bufferd peptone water

CAL – Clinical attachment loss

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

cm – Centímetros

CMB – Concentração mínima bactericida

CMEB – Concentração mínima de erradicação de biofilme

CMI – Concentração mínima inibitória

CMIB – Concentração mínima de inibição de biofilme

DDA – Dose diária aceitável

DP – Doença periodontal

FAO – Food and agriculture organization

FDA – Food and drug administration

HCl – Ácido clorídrico

IFRA – Instituto de Fisioterapia e Reabilitação Animal

LIPUS – Low intensity pulsed utrasound

mg/mL – Miligrama por mililitro

mm – Milímetro

MMP – Metaloproteinases de matriz

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

NaCl – Cloreto de sódio

NAG – N-acetilglucosamina

NAM – Ácido-N-acetilmurâmico

NSR – Péptido de resistência à nisina

°C – Grau centígrado

PDH – Péptido de defesa do hospedeiro

PG – Peptidoglicano

PGE2 – Prostaglandina E2

PPD – Pocket probing depth

pv – Peso vivo

TSA – Tryptic soy agar

TSB – Tryptic soy broth

UFC – Unidades formadoras de colónia

UFC/mL – Unidades formadoras de colónia por mililitro

VRE – *Enterococcus* resistente à Vancomicina

WHO – World Health Organization

I. Relatório de estágio

1. Estágio VetOeiras

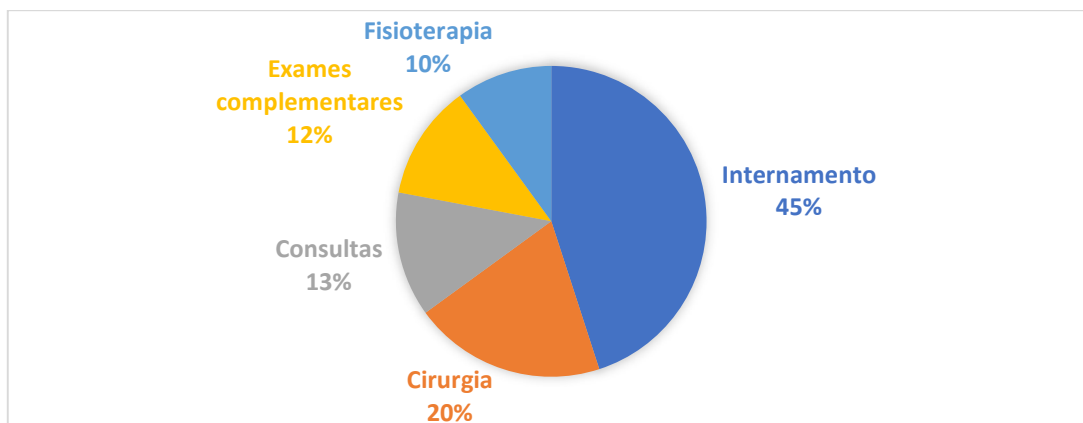
Sendo a minha dissertação de mestrado baseada sobretudo em trabalho laboratorial, não me quis privar de fazer o meu estágio curricular em clínica de animais de companhia, tanto pelos conhecimentos que sabia que ia adquirir, como pelas perspetivas de futuro que me deu.

O meu período de estágio curricular na VetOeiras, Hospital Central da Linha de Cascais (HVCLC), foi iniciado no dia 19 de setembro de 2016, sob a orientação da Dra. Carina Ferreira, com a perspetiva de realizar um estágio de 4 meses de forma a perfazer as 500 horas de estágio exigidas no plano de estudos do MIMV. O período de estágio terminou a 30 de dezembro de 2016, tendo realizado 15 semanas de estágio, o corresponde a aproximadamente a 712 horas (600 horas semanais e 112 em turnos realizados aos fins de semana). Durante este período adquiri muitos conhecimentos, tendo ganho progressivamente autonomia para desempenhar tarefas cada vez mais complexas, embora sempre com a supervisão de um profissional responsável.

A casuística do Hospital VetOeiras prende-se sobretudo com cão e gato, com particular prevalência de cães braquicefálicos como Bulldog Francês, Bulldog Inglês, Boxer e outras raças semelhantes. Dos casos clínicos que acompanhei, num total aproximado de 450 animais, contactei com aproximadamente 42% de felídeos e 58% de canídeos, dos quais 40% corresponderam a raças braquicéfalas.

O estágio curricular incluiu rotações por diversos serviços como internamento, consultas, cirurgia, fisioterapia ou realização de exames complementares. A grande maioria das horas de estágio foram despendidas no internamento (cerca de 45 %), sendo o restante distribuído pelos serviços acima referidos, tal como se pode observar no gráfico 1:

Gráfico 1: Distribuição de horas do estágio curricular pelos diversos serviços.

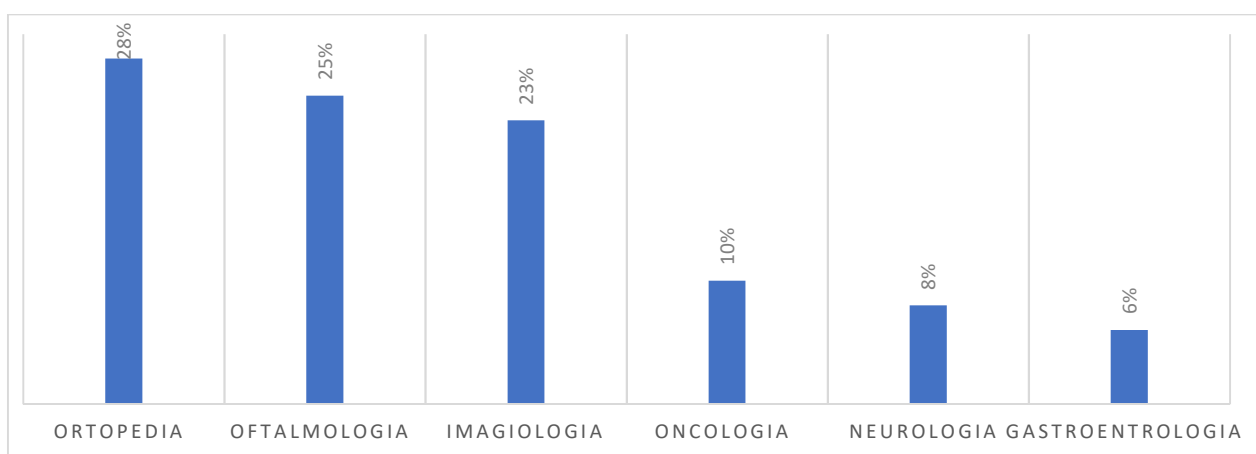


Tanto no internamento geral como no internamento para animais com doenças infectocontagiosas os estagiários têm um papel muito ativo, realizando tarefas como a monitorização dos animais e a realização de exames físicos, preparação e administração de fármacos, alimentação, limpeza, colocação de cateteres e preparação de sistemas de soro, contenção de animais, recolha de amostras de sangue e realização de análises hematológicas. Foi também possível de participar noutros procedimentos mais avançados como monitorização de transfusões sanguíneas, algaliação, tratamento de feridas e colocação de pensos e colocação de tubos esofágicos. Além dos procedimentos realizados foi também possível participar na discussão de casos clínicos, um passo muito importante para estimular o raciocínio médico.

A participação na área cirúrgica consistiu inicialmente na execução de protocolos de preparação pré-cirúrgica, pré-medicação e anestesia. Como assistente de cirurgião do Dr. Luís Chambel, assisti a várias cirurgias ortopédicas, artroscopias, endoscopias, e cirurgias de tecidos moles; participei também em cirurgias de tecidos moles com o Dr. Rui Almeida, Dra. Leonor Iglésias e Dr. Diogo Santos, e em cirurgias oftalmológicas com a Dra. Cristina Seruca (Dip. ECVO). Foi ainda possível participar diretamente na realização de suturas em alguns pacientes, na realização de orquiectomias e ovariectomias e no acompanhamento pós-cirúrgico dos pacientes.

Em consultas, de rotina, urgência ou especialidade, desempenhei funções de assistente, participei em discussões clínicas e contactei diretamente com proprietários, o gráfico 2 ilustra quais as especialidades mais frequentemente observadas em consulta.

Gráfico 2: Distribuição relativa das consultas de especialidade nas diferentes áreas.



Na área dos exames complementares, principalmente composta por diagnóstico imagiológico, tive a oportunidade de participar, realizar e avaliar procedimentos radiológicos, como despiste

de displasia da anca e displasia do cotovelo, avaliação pós-cirúrgica, pesquisa de corpo-estranho ou avaliação da cavidade torácica (as situações mais comuns), e participar em procedimentos ecográficos como ecografia abdominal, muitas vezes associada a cistocentese, e ecocardiografia.

Foi ainda possível efetuar outros procedimentos incluindo a realização de análises sanguíneas (hemograma e painel bioquímico), esfregaços sanguíneos, citologias, urianálise, eletrocardiograma, medição de pressão arterial, realização de testes rápidos para diagnóstico de doenças infecciosas ou tipificação de sangue. Para além do referido, foi também possível praticar necrópsias, relembrando o protocolo adequado e ainda recolher amostras para análise histopatológica.

A colaboração com o Instituto de Fisioterapia e Reabilitação Animal (IFRA), constituiu o primeiro contacto com a fisioterapia animal. Foi possível participar em procedimentos como a hidroterapia, tratamento com ultrassons, com laser e electroestimulação, bem como realizar exercícios articulares passivos e ativos, como marcha controlada, percursos com obstáculos e exercícios de proprioção e equilíbrio.

2. Estágio no Laboratório Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária

No dia 9 de janeiro de 2017, iniciei o meu estágio no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária, inserido num projeto de investigação com o objetivo de avaliar a utilização de um péptido antimicrobiano, a nisina, no tratamento e prevenção da doença periodontal, uma doença muito frequente nos cães e relacionada com complicações sistémicas que podem ser fatais. Durante 4 meses trabalhei com a Dra. Eva Cunha, médica veterinária e estudante de doutoramento na faculdade, sobre a orientação da Professora Manuela Oliveira.

Durante este período desenvolvi o trabalho laboratorial que me permitiu construir a minha dissertação de mestrado e adquiri conhecimentos relativamente a técnicas laboratoriais, procedimentos e manuseamento de instrumentos e equipamentos laboratoriais, situações com as quais já me tinha deparado durante o curso, mas que agora pude praticar com mais frequência e autonomia.

Efetuei diversas atividades nesta etapa do estágio, tais como o manuseamento de amostras biológicas e diversos procedimentos necessários à sua manutenção; realizei diversas tarefas relacionadas com as atividades de rotina de quem trabalha num laboratório, como a preparação de meios de cultura, preparação de material para esterilização e participação em

reuniões para discussão de estratégias de trabalho; realizei técnicas de microbiologia clássica como testes de difusão em poço e de determinação da concentração mínima inibitória e bactericida com o objetivo de avaliar a eficácia da solução de nisina e de dois veículos, uma pasta dentífrica para cães e um polissacárido natural, o gel de goma de guar, para a eventual administração tópica de nisina na cavidade oral de cães. Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e avaliados e discutidos com os meus colegas de laboratório, que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar.

A investigação desenvolvida possibilitou que participasse na elaboração de um artigo científico, aceite na Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias sobre o título “Canine Periodontal Disease and its Systemic Implications”, publicada em 2017 no volume 113 da revista (anexo 11) e também na elaboração de uma comunicação oral com o título “Prevention of enterococcal periodontal disease in dogs: an experimental approach using an antimicrobial peptide”, apresentada no XIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro, distinguida com o prémio de melhor comunicação oral (anexo 12).

Por fim, resta-me referir que graças aos profissionais com os quais trabalhei, tanto no hospital veterinário VetOeiras, como no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária e às condições que me foram proporcionadas, adquiri muitos conhecimentos e ganhei prática em muitos procedimentos, mas principalmente cresci tanto a nível profissional como a nível pessoal.

II. Revisão bibliográfica

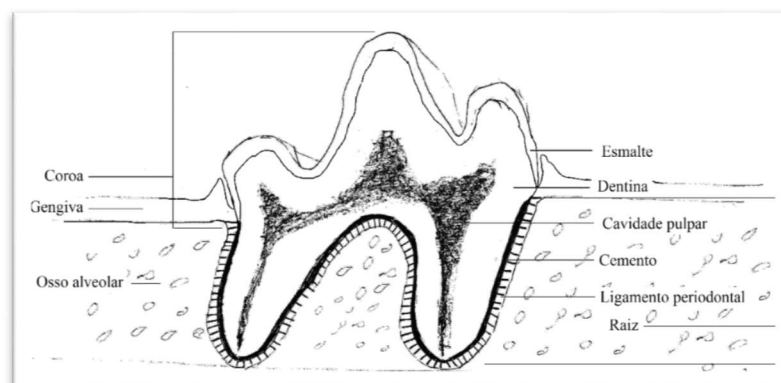
1. Doença Periodontal

1.1 A cavidade oral do cão

A avaliação da cavidade oral do cão pelo médico veterinário constitui uma etapa importante no exame de estado geral dos animais que se apresentam à consulta, uma vez que esta região pode ser alvo de diversas doenças que podem, eventualmente, possuir implicações sistêmicas. O dente é constituído por duas regiões: a região que se projeta para além da gengiva, designada por coroa, e uma ou mais raízes dentárias localizadas dentro do alvéolo dentário. O ponto de transição entre a coroa e a raiz é denominado por colo dentário, enquanto que a zona em que as raízes dentárias divergem designa-se por furca dentária (Junqueira & Carneiro, 1995).

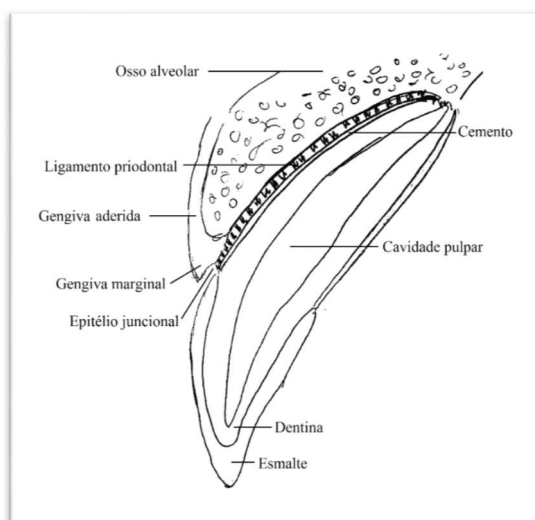
Os dentes são constituídos por uma porção não calcificada e por uma porção calcificada. A primeira designa-se polpa, presente na cavidade pulpar e constituída por tecido ricamente innervado e vascularizado, contendo vasos e nervos que penetram no dente através do forâmen apical localizado no ápice da raiz. A porção calcificada divide-se em: esmalte, a estrutura mais dura de todo o organismo, constituído sobretudo por sais de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita, tendo contacto direto com o ambiente bucal; a dentina, também constituída por sais de cálcio, embora em menor proporção, coberta apicalmente pelo osso alveolar e coronalmente pelo esmalte; e, por fim, o cemento, estrutura também calcificada pertencente ao periodonto, local de inserção do ligamento periodontal (figura 1) (Junqueira & Carneiro, 1995).

Figura 1: Corte sagital de um molar canino (original do autor).



A estrutura que suporta e rodeia os dentes designa-se por periodonto, constituído pela gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (American Veterinary Dental College, 1988; Bellows, 2004). A gengiva é uma membrana mucosa, firmemente aderida ao periosteio, de epitélio pavimentoso estratificado e divide-se em três categorias: gengiva aderida que cobre os processos alveolares que rodeiam o dente e constituída por epitélio bem queratinizado; gengiva marginal, a mais próxima da coroa do dente, constituída por uma vertente livre queratinizada e por uma vertente dentária não queratinizada que forma o sulco gengival, com uma profundidade entre 0 e 3 mm na gengiva saudável; e epitélio juncional, que corresponde a uma região muito especializada na qual o epitélio gengival adere à superfície do esmalte, na zona da junção amelo-cementária (figura 2) (Junqueira & Carneiro, 1995; Bellows, 2004; Niemiec, 2008a; Soukup, 2010).

Figura 2: Corte sagital de um dente canino (original do autor).



O cemento é o tecido que cobre a dentina da raiz e é um dos locais de inserção do ligamento periodontal (Junqueira & Carneiro, 1995). A transição deste tecido para o esmalte denomina-se junção amelo-cementária (Penman, 1992; Bellows, 2004).

O osso alveolar é o local onde se insere a raiz do dente, sendo formado por osso imaturo. Este caracteriza-se por ser pouco denso, apresentando um equilíbrio entre a formação de osso e a sua reabsorção; neste tipo de osso as fibras de colagénio não estão arranjadas no padrão lamelar típico do osso adulto, o que possibilita a inserção das fibras de colagénio do ligamento periodontal no osso alveolar (Junqueira & Carneiro, 1995; Bellows, 2004).

O ligamento periodontal é formado por um tipo especial de tecido conjuntivo denso organizado em feixes grossos, as fibras de Sharpey. As suas fibras de colagénio inserem-se tanto no periosteio do osso alveolar como no cemento, conferindo resistência à estrutura,

permitindo movimentos limitados do dente, impedindo a penetração de detritos em zonas profundas e atuando como um amortecedor para evitar que as forças da mastigação afetem diretamente o osso alveolar (Junqueira & Carneiro, 1995; Penman, 1992; Bellows, 2004).

1.2 Microbiota da cavidade oral do cão

A microbiota oral do cão é constituída especialmente por microrganismos pertencentes aos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Spirochetes. Entre os cocos gram-positivos destacam-se os pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Peptoniphilus*, enquanto que os bacilos gram-positivos isolados mais frequentemente pertencem aos géneros *Actinomyces* e *Propionibacterium*. Relativamente às bactérias gram-negativas destacam-se os géneros anaeróbios facultativos *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Eikenella* e *Capnocytophaga*, e também os géneros *Bacteriodes*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium*, anaeróbios estritos (Braga et al., 2005; Davis et al., 2013; Wallis et al., 2015).

A espécie *Porphyromonas cangingivalis*, pertencente ao filo Bacteroidetes, é geralmente descrita como a mais prevalente no ambiente da cavidade oral, estando presente tanto em animais saudáveis como em animais com periodontite (Dewhirst et al., 2012; Davis et al., 2013; Wallis et al., 2015).

O género *Enterococcus*, é composto por microrganismos naturalmente presentes no trato gastrointestinal de mamíferos e aves. Este género bacteriano foi associado, em medicina veterinária e em medicina humana, a doenças distantes, tais como, bacteriemia, endocardite infecciosa, meningite, infeção de feridas ou infeções urinárias (Ferreira et al., 2006; Oliveira et al., 2016).

A nível micológico, os géneros mais frequentemente isolados a partir da cavidade oral de animais saudáveis são *Malassezia* spp., *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Rhondotorula* spp. e *Cryptococcus* spp., com a possibilidade de serem responsáveis por infeções oportunistas. A espécie *M. pachydermatis* destaca-se como a espécie mais frequentemente isolada (Santin et al., 2013).

1.3 Patogenia da doença periodontal

A doença periodontal (DP) é uma das afeções mais frequentes no cão, afetando especialmente raças pequenas, em particular animais braquicefálicos e com má oclusão dentária (Lobprise, 2006; Marshall et al., 2014). Dos cães com mais de 2 anos, 80 a 85% exibem pelo menos um

dos sinais de DP, presentes em praticamente todos os animais com mais de 4 anos (Lund, Armstrong, Kirk, Kolar & Klausner, 1999).

A DP é uma doença inflamatória crónica de etiologia multifatorial, dependendo de vários fatores incluindo o ambiente que rodeia o animal, o seu património genético, o tipo de alimentação, o seu estatuto imunitário e fisiológico. De entre dos fatores predisponentes destacam-se a retenção de dentes decíduos, má oclusão dentária, a presença de dentes supranumerários, a hiperplasia gengival e o consumo de dietas húmidas (Penman & Harvey, 1992; Bellows, 2004).

O estabelecimento da DP inicia-se pela adesão de glicoproteínas e polissacáridos à coroa e colo do dente, região seguidamente colonizada por diversos microrganismos que estabelecem um biofilme. Este biofilme, ou placa bacteriana, é composto por uma comunidade de microrganismos que estabelecem interações complexas entre si, sendo envolvida por uma matriz protetora de exopolissacáridos. Quando a placa bacteriana é supragengival é geralmente constituída por bacilos e cocos gram-positivos, aeróbios facultativos e imóveis. Quando a placa bacteriana atinge o sulco gengival e se torna subgengival, possibilita a multiplicação de bactérias potencialmente patogénicas, gram-negativas, anaeróbias e móveis (Bellows, 2004; Niemiec, 2008a; Soukup, 2010).

Posteriormente ocorre a formação de cálculo dentário, devido aos sais de carbonato e fosfato de cálcio presentes na saliva, que mineralizam na placa bacteriana, juntamente com detritos e restos de alimentos. Assim, é compreensível que os dentes mais próximos dos ductos das glândulas salivares sejam especialmente afetados pela formação de cálculo, particularmente o quarto pré-molar e o molar maxilar, dada a sua proximidade ao ducto da glândula parotídea e ao ducto da glândula zigomática (Bellows, 2004).

A DP evolui devido à presença da placa bacteriana e à reação inflamatória do organismo à presença dessa placa (Soukup, 2001).

Numa primeira fase ocorre gengivite, caracterizada por uma resposta inflamatória da gengiva, sendo reversível; numa segunda fase ocorre periodontite, de carácter irreversível, uma vez que a reação inflamatória que ocorre nesta fase danifica os tecidos moles e destrói o osso alveolar que suporta os dentes (Niemiec, 2008a; Soukup, 2010). Esta fase é caracterizada por hiperemia gengival, que pode progredir para edema, podendo também ocorrer halitose e hemorragias aquando da mastigação. Sendo que nesta fase ainda não ocorreu reabsorção óssea nos alvéolos dentários, não são detetáveis alterações radiográficas. Este é o único estadio da DP que pode ser revertido com a realização de protocolos terapêuticos adequados, sem necessidade de recorrer a tratamento cirúrgico (Niemiec, 2008a; Soukup, 2010).

Numa segunda fase ocorre a periodontite, irreversível e que resulta de uma persistência cíclica do estímulo inflamatório e uma modificação dos microrganismos que constituem a placa bacteriana e que agora se instalam a nível subgengival, devido à produção de alguns compostos tais como enzimas proteolíticas, endotoxinas, citotoxinas e produtos de metabolismo, como amónia e compostos sulfurados voláteis. A atividade local de neutrófilos, monócitos, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos resulta na libertação de citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e proteases que induzem a reação inflamatória e processos catabólicos como a reabsorção óssea e a destruição de colagénio (Niemiec, 2008a; Pavlica, Petelin, Erzen, Crossley & Skaleric, 2008).

1.4 Sinais clínicos e fases

O sinal clínico mais comum de DP é a halitose, observando-se menos frequentemente disfagia, anorexia, sialorreia e hemorragia (Penman & Harvey, 1992).

A gengivite pode ser classificada em função de diversos graus de inflamação, edema e hemorragia. A periodontite pode ser caracterizada por diversos graus de recessão gengival, exposição da furca dentária, formação de bolsas periodontais, perda de adesão periodontal e mobilidade dentária (Soukup, 2010)

A mobilidade de um dente pode apresentar-se aumentada em consequência de forças de oclusão, trauma ou forças normais exercidas num periodonto fragilizado, podendo ser classificada em 4 graus. No grau 0 o dente não apresenta mobilidade, ou apresenta mobilidade fisiológica ($< 0,2$ mm); no grau 1 ocorrem movimentos em qualquer direção, exceto a axial, com mobilidade entre 0,2 e 0,5 mm de amplitude; no grau 2 ocorre mobilidade entre 0,5 e 1 mm, em qualquer direção, exceto a axial; por fim, no grau 3 ocorrem movimentos em qualquer direção, de amplitude superior a 1 mm (Bellows, 2004).

Relativamente à exposição da furca dentária, esta também pode ser dividida em três tipos. No Tipo I é apenas detetável o início da furca, observando-se normalmente uma exposição inferior a 1 mm. No Tipo II já é possível inserir uma sonda de exploração na furca dentária, mas esta ainda não é visível no outro lado do dente. Finalmente, no Tipo III toda a furca se encontra exposta e é possível introduzir a sonda de exploração até esta ser visível do outro lado do dente. (imagem 1) (Bellows, 2004).

Imagem 1: Exposição de furca de grau III (imagem gentilmente cedida por Veterinary Transplant Services, 2014).



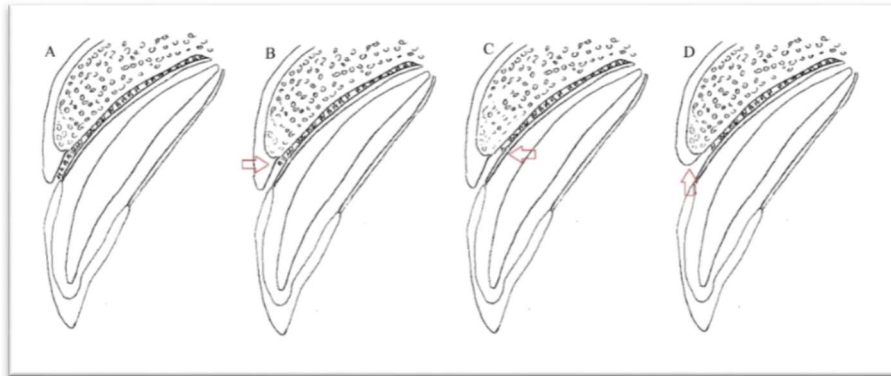
O principal aspecto clínico da DP é a alteração do periodonto e a perda de massa óssea que conduz a mobilidade dentária e, em casos extremos, à perda do dente. Nestas situações ocorre a migração apical do epitélio juncional, que pode ser acompanhada de recessão gengival (imagem 2) e exposição das raízes dentárias, ou a gengiva pode permanecer com a mesma altura, formando-se bolsas periodontais com sondagens de grande profundidade, superiores a 4 mm. Ambas as apresentações podem ocorrer no mesmo animal e até no mesmo dente (Niemiec, 2008a).

Imagem 2: Recessão gengival (imagem gentilmente cedida por Niemiec, B.).



As bolsas periodontais avaliam-se pela sua dimensão, medida entre a margem gengival e o epitélio juncional, e dividem-se em dois tipos: supra-óssea, quando o fundo da bolsa é coronal ao osso alveolar; e infra-ósseas, quando o fundo da bolsa é apical em relação ao osso alveolar adjacente (figura 3). As bolsas periodontais supra-ósseas estão geralmente associadas a um padrão horizontal de perda de osso alveolar, enquanto as bolsas periodontais infra-ósseas associam-se a um padrão vertical de perda de osso alveolar, sendo por esta razão, de pior prognóstico (Soukup, 2010).

Figura 3: Comparação de uma gengiva saudável com gengivas afetadas por doença periodontal (original do autor).

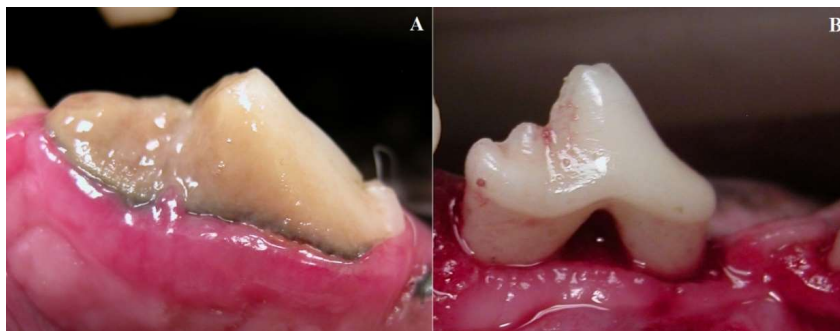


Legenda: A – gengiva saudável; B – Bolsa periodontal supra-óssea; C – Bolsa periodontal infra-óssea; D – Recessão gengival.

A doença periodontal apresenta quatro estádios determinados a partir da avaliação do dente mais afetado, com as seguintes características (Wiggs & Lobprise 1997):

- Estadio I: apenas gengivite, sem mobilidade dentária, sulcos gengivais com 3 mm ou menos (normal) e sem perda de massa óssea detetável radiograficamente;
- Estadio II: periodontite inicial, sem mobilidade dentária, bolsas periodontais com dimensão até 4 mm e/ou recessão gengival, exposição da furca de tipo I e 0 a 25% de perda de massa óssea;
- Estadio III: periodontite moderada, podendo observar-se mobilidade dentária em dentes de apenas uma raiz, bolsas periodontais com dimensão entre 4 e 6 mm e/ou recessão gengival, exposição da furca de tipo II e 25 a 50% de perda de massa óssea detetável radiograficamente;
- Estadio IV: periodontite grave, mobilidade dentária, bolsas periodontais com dimensão superior a 6 mm e/ou recessão gengival, exposição da furca do tipo III e mais de 50% de perda de massa óssea detetável radiograficamente.

Imagem 3: Diferentes estádios da DP (imagens gentilmente cedidas por Niemiec, B).



Legenda: a imagem A, corresponde ao estadio II, periodontite ligeira, com acumulação de cálculo dentário; a imagem B, corresponde ao estadio IV, periodontite severa, apesar de não existir acumulação de cálculo, observa-se uma exposição de furca de grau III e bastante recessão gengival

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de DP é realizado com base nos sinais clínicos, medições clínicas como CAL (Perda de Osso Clínica) e PPD (Profundidade de Bolsa Periodontal) e radiografias intraorais, sendo necessário submeter o animal a anestesia geral.

A avaliação de radiografias intra-orais permite analisar aspetos como o tamanho do espaço periodontal, perda de massa óssea do osso alveolar, que só se torna evidente ao raio-x após uma perda de mineralização do dente de 30 a 50 %, o arredondamento da crista óssea alveolar e perda de integridade da lâmina dura (Bellows, 2004; Hoskins, 2004; Niemiec 2008b; Soukup, 2010).

Existem dois padrões de perda de osso alveolar identificáveis ao raio-x, o padrão horizontal (imagem 4) e o padrão vertical, também designado como defeito ósseo angular.

Imagem 4: Padrão horizontal de perda de osso alveolar (imagens gentilmente cedidas por dogdentist).



Legenda: a seta A indica a altura normal da crista alveolar; a seta B indica um padrão horizontal de perda de osso alveolar.

A utilização de sondas permite a realização de medições para avaliar a profundidade das bolsas periodontais, devendo ser feitas 6 medições por dente. A distância, em milímetros, da margem da gengiva até ao extremo apical da bolsa periodontal, designada PPD, e a distância, em milímetros, da junção amelo-cementária até ao extremo apical da bolsa periodontal, designada CAL são também valores importantes no estadiamento, no planeamento terapêutico e no prognóstico da doença (Kortegaard, Eriksen & Baelum, 2014).

1.6 Tratamento

O tratamento da DP divide-se em duas fases: a fase inicial, não cirúrgica, e a fase cirúrgica.

A fase não cirúrgica consiste na realização da remoção mecânica do cálculo dentário, curetagem e aplanamento radicular, precedida por uma lavagem com clorexidina para reduzir a carga bacteriana da cavidade oral e diminuir assim o risco de bacteriemia transitória. Para o efeito, existem formulações apropriadas com concentrações de clorexidina de 0,12% (Niemic, 2008b; Soukup, 2010).

A remoção do cálculo, realizada com ultrassons, permite remover a placa e o cálculo dentário tanto a nível supragengival como a nível subgengival. Os destartarizadores automáticos são utilizados para a remoção supragengival, já para a remoção do cálculo subgengival devem ser utilizados destartarizadores manuais. O aplanamento radicular, realizado com uma cureta de *Gracey*, que alguns autores consideram já pertencer à fase cirúrgica do tratamento, permite remover o cálculo residual na superfície do cimento, na raiz do dente, e retardar a formação de nova placa dentária (Niemic, 2008b; Soukup, 2010; Cunha et al., 2017).

Após os procedimentos anteriormente referidos é também recomendável realizar uma lavagem do sulco gengival com solução salina ou clorexidina a 0,12%. Durante a destartarização ocorre a acumulação de detritos no sulco gengival e, caso não seja realizada a lavagem, a sua presença permite a manutenção da inflamação e da infeção (Niemic, 2008b). A aplicação de fluor é muito debatível na clínica de pequenos animais. O fluor tem ação bacteriostática e aumenta a resistência do esmalte; no entanto, a sua toxicidade é o principal obstáculo à sua aplicação, pois a margem de segurança é bastante reduzida (Buzalaf, Pessan, Honório & Cate, 2011).

Apesar de terem uma ação muito diminuta a nível da redução do biofilme bacteriano formado na superfície do dente, os antibióticos sistémicos podem ser utilizados no tratamento DP quando as circunstâncias clínicas assim o determinam, nomeadamente a ocorrência de doenças cardiovasculares prévias, situações que comprometam a cicatrização ou estados imunitários debilitados. Os antibióticos utilizados mais frequentemente no tratamento da DP

são a associação amoxicilina e ácido clavulânico, a clindamicina, a doxiciclina e o metronidazol (Soukup, 2010).

Verificou-se que doses sub-inibitórias de doxiciclina, na ordem dos 20% da dose mínima inibitória têm a capacidade de reprimir a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular. Além disso, promovem também o aumento da produção de colagénio, diminuindo assim a CAL (Soukup, 2010; Kim et al., 2013).

A aplicação tópica de antibióticos é também uma estratégia possível, existindo disponível no mercado um gel de doxiciclina para aplicação nas bolsas periodontais. Este tipo de aplicação permite que o antibiótico possa atingir localmente concentrações eficazes que atuem a nível do biofilme (Niemic, 2008b; Soukup, 2010).

Como referido anteriormente, o sistema imunitário do animal e a reação inflamatória que este desencadeia em resposta à formação da placa bacteriana têm um papel muito importante na patogenia da DP. Assim, a administração de anti-inflamatórios não esteroides (AINE) inibe a produção de prostaglandinas, especialmente a PGE2 que contribui para a destruição dos tecidos do periodonto. Apesar da administração de AINE ter de ser realizada durante longos períodos de tempo, é eficaz na redução da reabsorção óssea ao nível dos alvéolos dentários (Soukup, 2010).

A segunda fase do tratamento da DP, a fase cirúrgica, tem por objetivo a regeneração do periodonto. É utilizada nos casos mais graves de DP, classificados nos estadios III e IV e caracterizados por perdas de massa óssea superiores a 25% e lesões de exposição da furca de grau II ou III (Niemic, 2008b; Soukup, 2010).

As técnicas cirúrgicas aplicadas à região da gengiva, como a curetagem gengival, a gengivectomia ou a realização de retalhos, têm como objetivo a resolução de várias alterações tais como remoção de gengiva alterada, resolução de hiperplasia gengival, correção de bolsas periodontais e de recessão da gengiva. Para que se obtenham os resultados desejados devem ser aplicadas algumas regras básicas. Assim durante a cirurgia deve ser preservado no mínimo 2 mm de gengiva aderida; as bolsas periodontais com menos de 4 mm devem ser tratadas de forma conservadora, reservando-se o tratamento cirúrgico para as bolsas que têm mais de 4 mm de profundidade; nas superfícies dentárias a serem intervencionadas devem ser realizados, com especial cuidado, os procedimentos de remoção do calculo, polimento e aplanamento radicular, especialmente em zonas que recebam retalhos ou enxertos (Penman & Harvey, 1992).

A simples exérese de gengiva em excesso, a gengivectomia, é aplicada para resolução de hiperplasia gengival e epúlides (Penman & Harvey, 1992).

O desbridamento periodontal é uma técnica que combina aplanamento radicular com curetagem gengival e que pode ser realizada com aparelhos automáticos. Esta combinação visa remover os tecidos danificados e assim promover a regeneração dos tecidos normais (Mestrinho, 2017).

Para efetuar procedimentos que necessitem de acesso direto à raiz do dente realizam-se retalhos gengivais, de forma a criar uma janela de acesso à zona que se pretende observar, preservando a gengiva aderida e permitindo a remodelação gengival necessária para, por exemplo, reduzir bolsas periodontais ou reduzir exposições da furca (Bellows, 2004). Um retalho consiste no levantamento de numa porção de tecido mantendo a sua zona de origem, o pedículo, responsável por manter a sua circulação e nutrição (Penman & Harvey, 1992; Bellows, 2004).

Antes da realização dos retalhos toda a cavidade oral deve ser abundantemente lavada com clorexidina, em particular na zona a intervencionar. As técnicas cirúrgicas de realização de retalhos devem seguir certos critérios, nomeadamente: é necessário que o tamanho da base do retalho seja pelo menos 1,5 vezes superior ao tamanho da sua margem livre; é preferível que ocorra cicatrização primária ao invés de cicatrização por segunda intenção; é necessário a estabilização do retalho para evitar que este se desloque ou que ocorram hemorragias, hematomas ou infeção; e as suturas devem ser realizadas no sentido da zona livre para o pedículo, para que não esteja sobre tensão, e de modo contínuo, pois assim é possível reduzir o número de nós e conseqüentemente os locais de acumulação de placa bacteriana (Penman & Harvey, 1992; Bellows, 2004):

Consoante o objetivo, existem diversas técnicas cirúrgicas para a realização de retalhos, mas todas possuem indicações pós-cirúrgicas semelhantes: administração temporária de dietas húmidas, remoção dos brinquedos de roer, realização de lavagens da cavidade oral bi-diárias com clorexidina e instituição de antibioterapia e terapêutica anti-inflamatória (Penman & Harvey, 1992; Bellows, 2004).

Para além da realização dos procedimentos cirúrgicos na região da gengiva, pode também ser necessário intervencionar o próprio osso alveolar na tentativa de restaurar a sua normal arquitetura, através da realização de um enxerto ósseo. O material a utilizar no enxerto pode ter várias origens: autógena, obtida a partir do próprio paciente e colhidos da margem alveolar de um dente não afetado ou de um osso longo (úmero ou tibia); alogena, enxertos de um indivíduo da mesma espécie, muitas vezes obtidos a partir de cadáveres; sintética, realizados com material não biológico, como cerâmica ou vidro bioativo. Estes vão atuar como materiais osteocondutivos, oferecendo estrutura aos osteoblastos para que ocorra regeneração óssea (Bellows, 2004; Soukup, 2010; Stepanaiuk & Gingerich, 2015).

A regeneração de tecido guiada é outra técnica que pode ser utilizada no tratamento cirúrgico da DP. Visa impedir a migração apical do epitélio juncional, o aumento das bolsas periodontais e a proliferação de epitélio gengival ao longo da raiz exposta do dente, tentando promover a sua cobertura por cimento para que se possa voltar a formar o ligamento periodontal. Esta técnica utiliza membranas que são colocadas subgengivalmente, podendo ser reabsorvíveis ou não. Encontram-se disponíveis membranas reabsorvíveis impregnadas com doxiciclina, que, como referido anteriormente, têm a capacidade estimular o aumento da síntese de colagénio, diminuindo também a expressão de MMP (Bellows, 2004; Soukup, 2010).

Várias técnicas de engenharia de tecidos têm sido desenvolvidas para fornecer suporte ósseo e promover uma regeneração mais eficaz dos tecidos do periodonto, como a aplicação de membranas de duas camadas biodegradáveis que veiculam células estaminais, obtidas a partir de células adiposas, que demonstram ter potencial de facilitar a osteogénese e evitar a migração de células epiteliais para os locais das alterações (Requicha et al. 2014).

Recentemente foi desenvolvida uma técnica baseada na aplicação de ultrassons pulsáteis de baixa intensidade, LIPUS (Low Intensity Pulsed Ultrasound), que constitui um tratamento não invasivo capaz de acelerar a regeneração dos tecidos do periodonto, promovendo a rápida deposição de sais de cálcio e a maturação do tecido ósseo (Gu et al., 2014).

Todas as técnicas referidas anteriormente podem ser combinadas de modo a garantir o sucesso do restauro da anatomia normal do periodonto. Em casos mais graves e irreversíveis é necessário recorrer à extração do dente, tratamento que permite a cura definitiva para a DP (Niemiec, 2008b; Soukup, 2010).

1.7 Estratégias de prevenção

Os proprietários ocupam um papel muito relevante na prevenção da DP. A escovagem dos dentes pelos proprietários é facilitada pelo facto de a maioria da placa bacteriana dos cães se encontrar na face labial dos dentes, permitindo assim a escovagem dos dentes de boca fechada, realizando movimentos circulares com a escova formando um ângulo de 45° com a gengiva marginal. Idealmente a escovagem é realizada pelo menos uma vez por dia, podendo ser utilizadas pastas dentárias veterinárias, com adição de sabores e outros compostos como clorexidina ou enzimas antimicrobianas, que aumentam a palatabilidade e proporcionam uma limpeza mais eficaz (Niemiec, 2008b; Soukup, 2010; Harvey, Serfilippi & Barnvos, 2015).

Por outro lado, a remoção mecânica da placa pode ser realizada através de recompensas e rações com características específicas de textura, forma e tamanho. Estas podem também

conter substâncias como polifosfatos, que atuam como quelantes do cálcio presente na saliva, diminuindo assim a formação do cálculo dentário (Niemiec, 2008b; Soukup, 2010).

Encontram-se também disponíveis várias preparações comerciais para completar a higiene oral, como soluções a base de clorexidina, géis de ascorbato de zinco e aditivos para a água com xilitol, estas preparações são aplicadas com o objetivo de reduzir a placa bacteriana e a ocorrência de gengivite (Niemiec, 2008b; Soukup, 2010).

A destartarização e o polimento, embora utilizados no tratamento das fases iniciais da DP, deveriam ser encarados como técnicas profiláticas, ou seja, antes de existir doença. A destartarização, o aplanamento radicular, o polimento e uma avaliação oral cuidada devem ser realizadas em intervalos de 3 a 12 meses, consoante a avaliação do estado da cavidade oral do animal. Esta recomendação torna-se mais difícil de aplicar dada a necessidade de anestésiar o animal para que seja possível realizar estas técnicas (Soukup, 2010).

Com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de DP, foi desenvolvida uma vacina que oferecia imunização contra *Porphyromonas* spp., disponibilizada no mercado em 2007. Apesar da sua segurança ter sido comprovada, esta vacina foi descontinuada pois não foi possível demonstrar em estudos de comparação de DP em cães vacinados e cães não vacinados, que contribuía para a redução da DP a longo prazo (Leuchtefeld, 2011).

1.8 Consequências locais

Para além da perda de dentes, podem ocorrer complicações locais derivadas da DP. Principalmente no caso dos caninos maxilares, podem ocorrer fístulas oronasais quando a progressão da DP atinge a superfície do palato; a comunicação com a cavidade nasal origina sinusite, com sinais clínicos como descargas nasais crónicas, espirros e halitose grave. Com a progressão apical da doença podem ocorrer infeções endodônticas em dentes com raízes múltiplas, denominados abscessos perio-endodônticos, ou de classe II, caracterizados por lesões primárias do periodonto com envolvimento secundário da cavidade pulpar, que podem progredir para outros dentes.

Também podem ocorrer fraturas patológicas, principalmente na mandíbula, na região dos caninos e primeiros molares, como consequência de traumas ligeiros ou durante procedimentos orais. A DP pode provocar osteomielite na cavidade oral. Dada a proximidade das raízes dos quartos pré-molares e molares à órbita ocular, a inflamação das raízes desses dentes pode eventualmente causar cegueira (imagem 5) (Verstraete, 1999; Niemiec, 2008a).

Imagem 5: Abscesso da raiz de um dente com inchaço ventral ao olho (imagem gentilmente cedida por Niemiec, B.).



1.9 Consequências sistêmicas

Em medicina humana existem bastantes estudos que relacionam a ocorrência de DP com outras doenças sistêmicas. Em 2011, Glickman e colaboradores demonstraram que adultos com DP tinham uma probabilidade 4,5 vezes superior de desenvolverem concomitantemente doença renal crônica, comparativamente a adultos saudáveis, devido à afinidade das bactérias da cavidade oral para o endotélio renal e à deposição de imunocomplexos nos glomérulos. Outros estudos, também em medicina humana, revelam a relação entre uma higiene oral deficiente e a possibilidade de desenvolver endocardite infecciosa secundária a bacteriemia (Lockhart et al, 2009).

As doenças inflamatórias e infecciosas crônicas como a DP originam bacteriemia transitória e circulação de mediadores inflamatórios que mantêm o organismo num estado de inflamação generalizado o que proporciona o desenvolvimento de doenças crônicas e reações exacerbadas do sistema imunitário. Assim, é necessário compreender a DP não apenas como uma patologia dentária que causa halitose e perda de dentes, mas também como um cofator muito importante para a ocorrência de doenças sistêmicas graves como a endocardite infecciosa e doenças tromboembólicas associadas, doença hepática, doença renal, Diabetes mellitus e aterosclerose. Entre os microrganismos frequentemente associados a estas situações destacam-se os pertencentes ao género *Enterococcus* (Ito, 2006; Pavlica et al., 2008; Niemiec, 2008a; Peddle, Drobatz, Harvey, Adams, Sleeper, 2009; Semedo-Lamsaddek, Tavares, Braz, Tavares, Oliveira, 2016).

2. Género *Enterococcus*

2.1 Características gerais

O género *Enterococcus* foi descrito pela primeira vez em 1899 por Thiercelin como sendo constituído por diplococos gram-positivos, tendo deste modo proposto a classificação de "Enterocoque" para este género, de forma a dar ênfase à sua morfologia e origem intestinal (Thiercelin & Jouhaud, 1899; Gilmore, Clewell, Ike & Shanka, 2014). Apesar de ter isolado este agente a partir de fezes humanas, Thiercelin desde cedo descreveu a possibilidade deste microrganismo ser potencialmente patogénico para humanos (Thiercelin & Jouhaud, 1899).

Inicialmente as bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* foram classificadas como *Streptococcus* do grupo serológico D, de acordo com a classificação de Lancefield baseada nas diferenças da estrutura do ácido lipoteicóico (Mundt, 1986; Willey, Sherwood & Woolverton, 2008). Este género encontrava-se dividido em dois grupos fisiológicos, o grupo dos Enterococci, constituído por bactérias das espécies *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis*, e o grupo Viridans, composto por *Streptococcus equinus* e *Streptococcus bovis* (Sherman, 1937). Posteriormente, as espécies *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* foram reclassificadas como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Schleifer & Kilpper-Balz, 1984), tendo por base não só estudos comparativos de diferenças bioquímicas e imunológicas, mas principalmente estudos de biologia molecular (Kilpper-Balz, Fischer & Schleifer, 1982; Farrow, Jones, Phillips & Collins, 1983).

Enterococcus spp. são cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados, com uma gama de temperatura ideal para multiplicação entre os 35 e os 37 °C, tendo ainda a capacidade de se multiplicar em meios com concentrações de NaCl de 6,5% e pH 9,6, (Kilpper-Balz & Schleifer, 1984; Mundt, 1986; Lemsaddek & Tenreiro, 2012).

As bactérias do género *Enterococcus* tanto podem ser consideradas comensais como potencialmente patogénicas. Dentro das 35 espécies do género destacam-se as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, consideradas as mais relevantes pela sua prevalência e capacidade de virulência (Lemsaddek & Tenreiro, 2012; Tavares, 2014).

Enterococcus faecalis são geralmente células ovoides de 0,5 a 1 µm de diâmetro, alongadas na direção das pequenas cadeias que formam, maioritariamente imóveis e raramente pigmentadas (Mundt, 1986). Formam colónias circulares, regulares, lisas, de cor branca ou creme (Kilpper-Balz & Schleifer 1984; Mundt, 1986). A maioria das estirpes são não-hemolíticas, sendo raro existirem isolados com capacidade de produção de β-hemolisinas (Kilpper-Balz & Schleifer, 1984). *E. faecalis* tem a capacidade de se multiplicar entre 10 e 45

° C, sobrevivendo, no entanto, a temperaturas de 60 °C por um período máximo de 30 minutos, em meios com pH neutro (Kilpper-Balz & Schleifer, 1984; Mundt, 1986; Lemsaddek & Tenreiro, 2012).

Enterococcus faecium são células esféricas ou ovoides podendo também ter uma apresentação alongada, agrupadas em pares ou cadeias curtas, sendo maioritariamente imóveis e não pigmentadas. Estas bactérias formam colónias circulares, regulares, lisas e de cor branca (Kilpper-Balz & Schleifer, 1984; Mundt, 1986). Algumas estirpes apresentam capacidade de produção de α -hemolisinas (Kilpper-Balz & Schleifer, 1984). A gama de temperaturas de multiplicação de *E. faecium* situa-se entre os 10 e os 50 °C, tendo também a capacidade de sobreviver a temperaturas de 60 °C durante 30 minutos em meios com pH neutro (Kilpper-Balz & Schleifer, 1984, Lemsaddek & Tenreiro, 2012).

Os isolados das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* podem ser distinguidos entre si através da avaliação de alguns parâmetros como a produção de ácido a partir de vários açúcares, fonte de energia utilizada, capacidade de redução do telurito de potássio e cloreto de tetrazólio ou o tipo de subunidades envolvidas nas ligações inter-peptídicas estabelecidas ao nível da parede celular bacteriana (tabela 1).

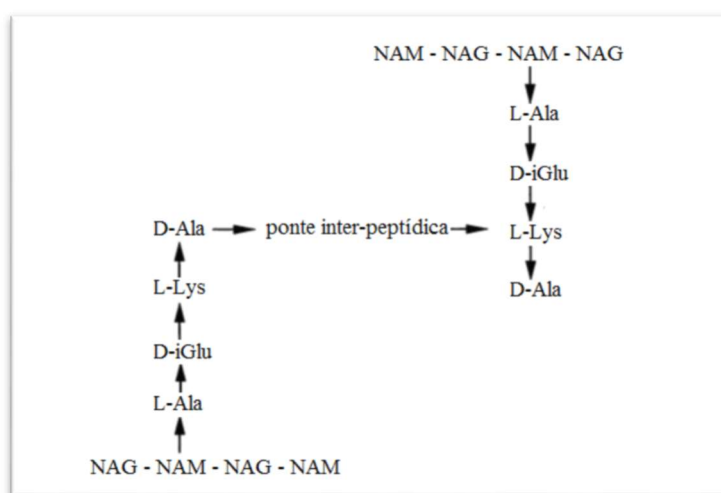
Tabela 1: Características que permitem a distinção entre *E. faecalis* e *E. faecium* (adaptada de Kilpper-Balz e Schleifer, 1984 e de Mundt, 1986).

Característica		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Ligações inter-peptídicas		L-Ala-L-Ala	D-Asp
Produção de ácido a partir de:	Arabinose	-	d
	Tagatose	+	-
	Arbutina	-	+
	Melezitose	+	-
	Melibiose	-	+
	Sorbitol	+	d
	Sorbose	-	+
Redução de:	Cloreto de terazólio	+	-
	Telurito de potássio	+	d
Energia a partir de:	Piruvato	+	-
	Citrato	+	-
	Malato	+	-
	Serina	+	-

Legenda: + - positividade em 90%, ou mais, das estirpes; - - negatividade em 90%, ou mais, das estirpes; d - positividade em 11 a 89% das estirpes.

A distinção entre membros destas duas espécies também pode ser realizada através da caracterização das moléculas do peptidoglicano (PG) da parede celular que rodeia a membrana citoplasmática da célula (ver anexo 8) (Willey, Sherwood & Woolverton, 2008). O PG corresponde a 35 – 40% de toda a parede celular (Coyette & Hancock, 2002; Huycke & Hancock, 2012), sendo composto por unidades alternadas de dois monossacarídeos, N-acetilglucosamina (NAG) e Ácido-N-acetilmurâmico (NAM). Estas sequências alternadas ocorrem devido a ligações amina de D- e L- aminoácidos que ocorrem entre o grupo terminal amino do NAG e o grupo carboxil do NAM (figura 4) (Navarre & Schneewind, 1999; Coyette & Hancock, 2002; Willey et al., 2008; Gilmore et al., 2014).

Figura 4: Esquema representativo das cadeias peptídicas e das pontes inter-peptídicas presentes na parede celular de *Enterococcus* spp. (adaptada de Coyotte & Hancock, 2002).



As cadeias peptídicas ligadas às cadeias NAM podem também ligar-se entre si, formando pontes inter-peptídicas (figura 4) graças à ação de PBP (penicillin binding proteins – proteínas de ligação à penicilina) responsáveis pela reação de transpeptidação que permite a formação de uma ponte peptídica entre o grupo amino da L-Lisina (L-Lys) na posição 3 e o grupo carboxil da D-Alanina (D-Ala) na posição 4 da cadeia adjacente (Gilmore et al., 2014). As pontes inter-peptídicas têm a função de fornecer estabilidade estrutural à parede celular e a sua constituição permite diferenciar membros da espécie *E. faecalis* da maioria das outras espécies do género *Enterococcus*. Na maior parte das espécies do género, esta ligação inter-peptídica é composta por apenas um resíduo D-Ácido aspártico (D-Asp), ao contrário do que se observa nas bactérias pertencentes à espécie *E. faecalis*, em que a ligação inter-peptídica é estabelecida por 2-3 resíduos de L-Ala (Schleifer & Kandler, 1972, Huycke & Hancock, 2012, Gilmore et al., 2014).

2.2 Ecologia

O principal nicho ecológico das bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* é o trato gastrointestinal de animais homeotérmicos incluído humanos e cães e de animais poiquilotérmicos, podendo também ser isolado a partir de insetos e plantas (Mundt, 1986). Encontram-se frequentemente em alimentos como laticínios, carne, produtos à base de carne fermentados ou alimentos congelados, estando muitas vezes associados a contaminação fecal. Podem também ser isolados a partir do ambiente, como por exemplo, de águas salgadas e sedimentos, águas estagnadas, águas fluviais ou até mesmo do ar de ambientes industriais ou domésticos. A contaminação ambiental encontra-se geralmente associada a descargas de efluentes humanos ou de explorações de produção animal (Mundt, 1986; Aarestrup, Butaye & Witte, 2012; Lemsaddek & Tenreiro, 2012).

2.3 Infecção por *Enterococcus* spp.

A maioria das infeções por *Enterococcus* spp. são autoinfeções com origem na microbiota do hospedeiro, tornando-se, no entanto, cada vez mais preocupantes as infeções nosocomiais (Gilmore et al., 2014). Dentro deste género, a espécie mais frequentemente associada a infeções é *E. faecalis* (Fisher & Phillips, 2009).

As principais entidades clínicas provocadas por bactérias do género *Enterococcus* em animais correspondem a gengivite, mastites, diarreias em jovens, infeções de feridas cirúrgicas, sepsis neonatal e infeções do trato urinário, que podem originar bacteriemia que promove o desenvolvimento de outras afeções como endocardite (Aarestrup, Butaye & Witte, 2012).

A primeira descrição da correlação entre *Enterococcus* e endocardite ocorreu em 1899 por MacCallum e Hastings, que estudaram e caracterizaram o microrganismo agora conhecido como *Enterococcus faecalis*, a partir de um caso fatal de endocardite, confirmando assim o seu potencial patogénico (MacCallum & Hastings, 1899).

A endocardite bacteriana é uma infeção do endocárdio, secundária a uma bacteriemia persistente ou transitória, que ocorre secundariamente a danos prévios nas valvas cardíacas que possibilitam a colonização por bactérias (Miller, Fox & Sauders, 2004; Cavaguchi et al., 2010; Semedo-Lemsaddek et al., 2016). Apresenta baixa prevalência no cão, com valores entre 0,04 e os 0,58 %, e ainda menor no gato, com valores que variam entre 0,006 e 0,018 % (Sisson, 1994; Buchanan, 1999). No entanto, apesar das baixas prevalências, a afeção encontra-se sempre associada a elevadas taxas de mortalidade (Miller et al., 2004).

A válvula mitral e a válvula aórtica são as mais comumente afetadas. A presença de lesões no endotélio das válvulas cardíacas possibilitam a colonização bacteriana e posterior formação de biofilme, que para além de despoletar o processo inflamatório, promove também a ulceração e a exposição do colagénio subendotelial que proporciona a agregação plaquetária e a ativação da cascata de coagulação (Miller et al., 2004; Cavaguchi et al., 2010; Gilmore et al., 2014). Estas lesões do endocárdio levam também ao desenvolvimento de deformações valvulares que impedem a correta coaptação das válvulas, podendo ainda originar perfurações ou rotura das mesmas. São estas alterações que desencadeiam a manifestação sintomática de insuficiência cardíaca (Miller et al., 2004; Cavaguchi et al., 2010).

Em 2016, Semedo-Lemsaddek e colaboradores estabeleceram uma associação clara entre DP e endocardite bacteriana em cães, dando especial relevância ao género *Enterococcus*.

No caso dos humanos, a afeção mais comum associada a *Enterococcus* spp. é a infeção do aparelho urinário, principalmente as vias urinárias inferiores, incluindo cistite, prostatite e epididimite. Estas situações são mais comuns em homens idosos, podendo originar bacteriemia quando atinge as vias urinárias inferiores (Gilmore et al., 2014). Para além da relação entre *Enterococcus* spp. e infeções urinárias encontra-se igualmente descrita a sua associação com infeções de feridas cirúrgicas, infeções hepatobiliares, peritonite associada a cirrose hepática crónica ou diálise peritoneal, infeção de feridas de decúbito e de úlceras de pé diabético (Poha, Oha & Tan, 2006; Fisher & Phillips, 2009; Gilmore et al., 2014).

2.4 Resistência a compostos antimicrobianos

A resistência bacteriana a compostos antimicrobianos encontra-se bem estabelecida e pode ser intrínseca ou adquirida. Os determinantes de resistência intrínseca encontram-se codificados no genoma de todos os membros da espécie, enquanto que os fatores relacionados com a resistência adquirida apenas são encontrados em alguns membros da espécie, sendo adquiridos por mutações individuais ou transferência horizontal de material genético (Willey et al., 2008).

O género *Enterococcus* demonstra uma elevada capacidade em efetuar transferências horizontais de material genético (Clewell & Dunny, 2002; Coque, Freitas, Novais, Peixe & Baquero, 2012). Esta transferência de material determina não só a capacidade de resistência a antibióticos, mas também o potencial de produção de hemolisinas, bacteriocinas, resistência a luz ultravioleta ou outros fatores de virulência (Clewell & Dunny, 2002; Gilmore et al., 2014). No caso do género *Enterococcus* a transferência horizontal de genes ocorre sobretudo por fenómenos de conjugação, entre duas células em proximidade física, através de transferência

direta de genes presentes em plasmídeos ou transposões (Nordmann et al., 2007; Coque et al., 2012; Gilmore et al., 2014)

Todos os enterococci são naturalmente resistentes a determinados grupos de antibióticos, incluindo algumas penicilinas semissintéticas como a oxacilina, cefalosporinas de todas as gerações, monobactams, polimixinas e lincosamidas (Werner, 2012; Gilmore et al., 2014). Este género apresenta resistência a concentrações clínicas de aminoglicosídeos, eliminando assim a possibilidade de estes compostos serem utilizados como fármacos únicos, e suscetibilidade reduzida à ação da penicilina, devido à expressão de PBP com baixa afinidade para a penicilina (Gilmore et al., 2014). No entanto, a ampicilina, é o antibiótico de eleição no tratamento de infeções por *Enterococcus* spp. que não demonstrem níveis de resistência elevados (Gilmore et al., 2014).

A espécie *E. faecalis* é também naturalmente resistente à ação de quinupristina/dalfopristina, uma combinação de estreptograminas utilizada em medicina humana (Nordmann, Naas, Fortineau & Poirel, 2007; Werner, 2012; Chung, Kwon, Shin, Kim, Park & Yoon, 2013; Leite-Martins, Meireles, Bessa, Mendes, Matos & Costa, 2014).

O género *Enterococcus* é normalmente suscetível a fármacos que atuam ao nível da parede celular, incluindo antibióticos β -lactâmicos ou glucopeptídeos como a vancomicina (Gilmore et al., 2014). Uma estratégia terapêutica eficaz é a conjugação de um antibiótico que atue na parede celular, enfraquecendo-a, com um aminoglicosídeo que atue ao nível do citoplasma celular ligando-se à sub-unidade 30s dos ribossomas e promovendo alterações na síntese proteica (Willey et al., 2008; Mohr, Friedrich, Yankelev, & Lamp, 2009; Plumb, 2011; Gilmore et al., 2014).

No entanto, uma vez que o género *Enterococcus* tem o potencial de desenvolver resistência a todos os fármacos antimicrobianos disponíveis (Rice, 2006; Nordmann, 2007; Werner, 2012), é importante referir que, para garantir uma aplicação clínica eficaz, é fundamental prevenir o desenvolvimento de resistências a antibióticos como a penicilina/ampicilina, aminoglicosídeos e glucopeptídeos (Werner, 2012).

Os enterococci foram os primeiros agentes potencialmente patogénicos a demonstrar resistência adquirida a glucopeptídeos, sendo que os primeiros isolados clínicos de VRE (*Enterococcus* resistentes à vancomicina) foram descritos em 1988 (Courvalin, 2006; Rice, 2006; Werner, Strommenger & Witte, 2008; Werner, 2012). A expressão fenotípica da resistência aos glucopeptídeos tanto pode traduzir-se pela capacidade de resistência a todos os glucopeptídeos ou apenas à vancomicina (Werner, 2012; Gilmore et al., 2014).

A vancomicina pertence a classe dos glucopeptídeos, um grupo de antibióticos que atua interferindo com a síntese do PG da parede celular. Este composto forma complexos com os

péptidos D-Ala-D-Ala, percussores do PG, e impede a adição dos restantes precursores, inibindo assim formação da parede celular (Courvalin, 2006; Gilmore et al., 2014). A ação da vancomicina ocorre no exterior da célula após a transposição dos percussores da parede celular para a superfície bacteriana externa, pois estes compostos não têm a capacidade de penetrar na célula (Courvalin, 2006).

A 27 de fevereiro de 2017 a WHO publicou, pela primeira vez, uma lista dos agentes patogénicos resistentes aos antibióticos, que maior risco para a saúde humana apresentam. Esta lista é composta por 12 famílias de bactérias divididas em três categorias de prioridade. *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina incorpora a lista da WHO, pertencendo à segunda categoria, prioridade alta (WHO, 2017).

A resistência aos antibióticos detém uma importância crescente no panorama atual da medicina, sendo importante desenvolver novas formas de combater microrganismos e otimizar as já desenvolvidas. Hoje em dia estão disponíveis péptidos antimicrobianos que demonstram eficácia no combate a determinados microrganismos, sem demonstrarem indícios de desenvolvimento de resistências.

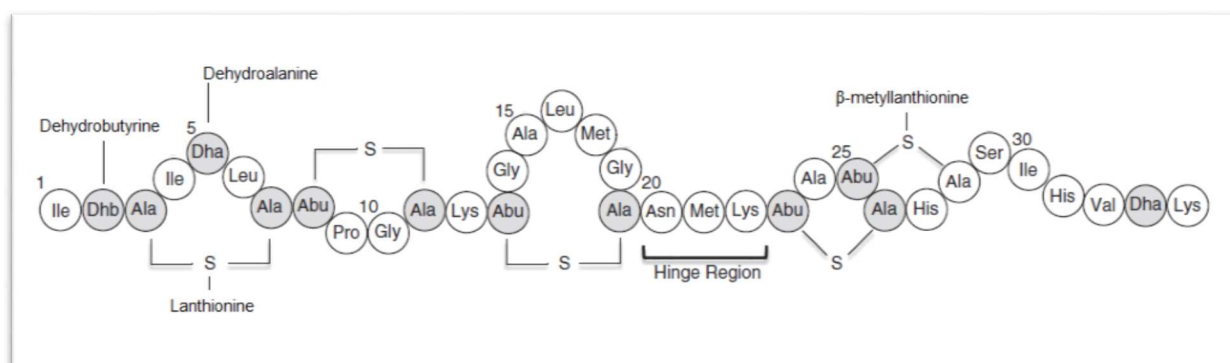
3. Nisina

3.1 Características gerais

A nisina é uma bacteriocina, ou seja, é um péptido antimicrobiano catiónico e anfipático produzido por certas estirpes de *Lactococcus lactis* que apresenta a capacidade de inibir a multiplicação de espécies competidoras (Zendo, Yoneyama & Sonomoto, 2010; Field, Cotter, Ross & Hill, 2015; Shin, Gwak, Kamarajan, Fenno, Rickard & Kapila; 2015).

A nisina é sintetizada nos ribossomas, sendo composta por 34 aminoácidos (Zendo et al., 2010; Dosler & Gerceker, 2012; Shin et al., 2015). Este péptido sofre várias alterações pós-traducionais que conferem à nisina aminoácidos distintos como a dehidroalanina e dehidrobutirina e os característicos anéis de lantionina e β -metilantionina (figura 5) (Cheigh & Pyun, 2005; Zendo et al., 2010; Field, Cotter, Ross & Hill, 2015). Uma vez que contém anéis derivados da lantionina, esta molécula pertence à classe I das bacteriocinas, os lantibióticos (Zendo et al., 2010).

Figura 5: Molécula de nisina (adaptado de Shin et al., 2015).



Legenda: Os aminoácidos modificados encontram-se assinalados a cinzento. Observam-se os cinco anéis derivados de lantionina, três de um lado da região flexível (Hinge Region) e dois do outro.

A descoberta da nisina ocorreu, em 1928, através do estudo de isolados obtidos de leite fermentado (Rogers & Whittier, 1928). A partir de 1953, começou a ser comercializada como composto antimicrobiano, tendo sido a sua utilização como aditivo alimentar aprovada pela Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) em 1969 e pela Food and Drug Administration (FDA) em 1988 (Field et al., 2015; Gharsallaoui, Oulahal, Joly & Degraeve, 2015; Shin et al., 2015).

A sua aplicação como preservante alimentar é possível devido à sua grande tolerância ao calor e a ambientes ácidos e ao largo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas, incluindo bactérias associadas à decomposição dos alimentos e bactérias patogénicas como *Listeria* spp. ou *Staphylococcus* spp., exercendo também a sua ação contra formas esporuladas de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp (Zendo et al., 2010).

Atualmente, a nisina encontra-se autorizada em mais de 50 países, sendo utilizada como conservante alimentar (E234) principalmente em queijos e alimentos enlatados (Zendo et al., 2010; Dosler & Gerceker, 2013; Shin et al., 2015).

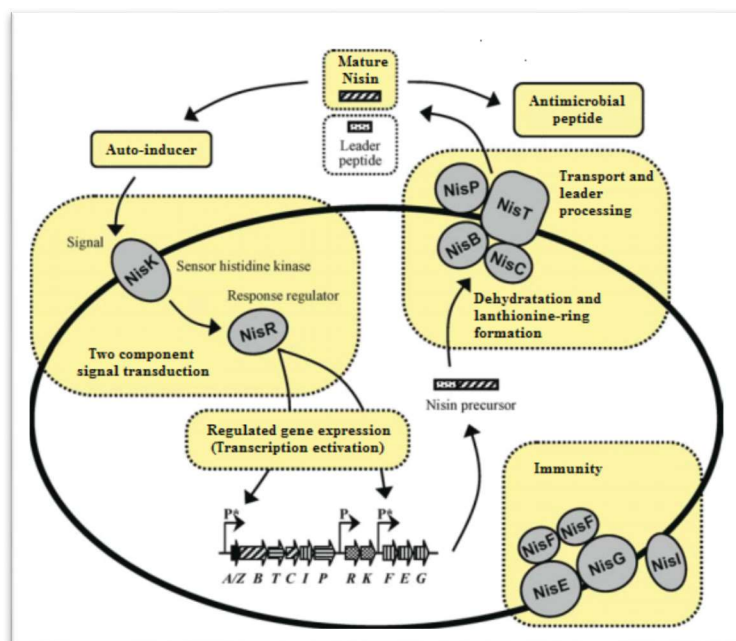
3.2 Biossíntese

A síntese da nisina tem por base a tradução de um “cluster” genómico que compreende 11 genes que codificam para moléculas envolvidas na produção, maturação, imunidade, regulação e transporte da nisina (Cheigh & Pyun, 2005; Zendo et al., 2010).

A tradução do gene *nisA* origina um precursor da nisina, a nisina A, sintetizada nos ribossomas. Este precursor é modificado por ação de uma desidratase, codificada pelo gene *nisB*, que atua na serina e treonina formando dihidroalanina e dihidrobutirina, e por uma ciclase, codificada pelo gene *nisC*, enzima responsável pela formação dos anéis de lantionina e metilantionina (Cheigh & Pyun, 2005). A nisina A é transportada para o exterior da célula pelo transportador ABC codificado pelo gene *nisT* e clivada no exterior da célula por uma protease codificada pelo gene *nisP*, dando origem à molécula de nisina e a um péptido N-terminal. Os restantes genes presentes no “cluster” acima referido codificam para moléculas envolvidas no transporte desta bacteriocina para o exterior da célula (codificadas por *nisE*, *nisF*, *nisG*) e lipoproteínas (codificadas por *nisI*) capazes de impedir a ação da nisina ao ligarem-se à molécula, inativando-a (figura 6) (Cheigh & Pyun, 2005; Zendo, 2010; Shin et al., 2015).

A regulação da síntese da nisina é feita através de um mecanismo de “quorum sensing”. Os genes *nisK* e *nisR* são responsáveis pelo estabelecimento de um sistema de regulação de dois componentes, uma histidina quinase e um regulador de resposta, codificados pelo gene *nisK* e *nisR*, respetivamente. A presença de nisina induz a transcrição do “cluster” de genes que codificam para a molécula de nisina (Cheigh & Pyun, 2005; Zendo, 2010).

Figura 6: Biossíntese da nisina (adaptado de Cheigh, 2005).



3.3 Modo de ação

A nisina atua ao nível da parede celular bacteriana através de vários mecanismos. Em primeiro lugar, sendo a nisina um peptídeo antimicrobiano catiónico, liga-se aos lípidos aniônicos da membrana celular de forma inespecífica e insere-se entre os fosfolípidos, criando alterações temporárias na membrana que levam a perda da homeostasia celular (Tong, Dong, Zhou, Tao & Ni, 2010).

O mecanismo mais específico pelo qual a nisina exerce a sua ação antimicrobiana resulta da ligação da extremidade terminal-N da molécula ao pirofosfato do lípido II, um precursor do PG; deste modo, para além de impedir a síntese do PG, a extremidade terminal-C, graças à sua região flexível, penetra na membrana celular e forma poros com diâmetro aproximado de 2 nm, através dos quais a célula perde iões e adenosina trifosfato (ATP) para o exterior da célula. Para a formação de um poro é necessário que oito moléculas de nisina se liguem a quatro lípidos II (Breukink et al., 2003; Tong et al., 2010; Zendo et al., 2010).

Estudos recentes demonstram também a afinidade da nisina para intermediários da biossíntese do ácido teicóico da parede celular, o lípido III e IV, promovendo também a formação de poros na membrana celular (Draper, Cotter, Hill & Ross, 2015).

Através destes mecanismos a nisina impede a biossíntese do PG da parede celular e leva à lise celular pela formação de poros na membrana celular.

3.4 Resistência à nisina

Existem poucos estudos disponíveis que referem o desenvolvimento de resistências a lantibióticos por estirpes bacterianas (Kramer et al., 2004; Draper et al., 2015; Shin et al., 2015).

Apesar do seu papel essencial na atividade antimicrobiana, as alterações do local preferencial de ligação da nisina, o lípido II, não estão diretamente relacionadas com o aumento de resistência a este composto. De facto, Kramer e colaboradores demonstraram em 2004 que a resistência de gram-positivos à nisina não é determinada pelo nível de lípido II na parede celular (Kramer et al., 2004).

De entre os mecanismos de resistência à nisina estudados, os mais relevantes são: as alterações na parede celular; as alterações na membrana celular; a produção de nisinases, redutases de dehidropéptidos que atuam na região N-terminal da nisina, alterando a dehidroalanina na posição 33 para alanina; a produção de NSR (péptido de resistência à nisina), uma protease codificada num plasmídeo e específica para a nisina, que cliva a molécula entre o último anel de metilantionina na posição 28 e o aminoácido serina na posição 29, o que reduz cerca de cem vezes a capacidade da nisina de formar poros na membrana celular; e a expressão de *ireK-ireP-ireB*, um mecanismo de sinalização e regulação de resistência a cefalosporinas que aparenta também estar relacionado com resistência a lantibióticos (Draper et al., 2015).

3.5 Aplicações da nisina

A nisina tem adquirido uma importância crescente na indústria alimentar, sendo a única bacteriocina permitida pelas entidades reguladoras, encontrando-se na lista Europeia de aditivos alimentares aprovados com a designação E234. As doses máximas recomendadas estabelecidas diferem entre países. Por exemplo, no Reino-Unido, Austrália ou França não há limite estabelecido para a quantidade de nisina que pode ser incorporada no fabrico de queijos, ao contrário do que se observa na Bélgica, em que o limite é de 100 UI/g (Cleveland, Montville, Nes & Chikindas, 2001; Gharsallaoui et al., 2015).

A aplicação da nisina na indústria alimentar pode ser dividida em três categorias: a prevenção de contaminação por bactérias ácido-lácticas; a inibição de bactérias gram-positivas potencialmente patogénicas; e a prevenção da contaminação por esporos de bactérias gram-positivas (Gharsallaoui et al., 2015).

A nisina pode ser aplicada em leite pasteurizado, queijos maturados, produtos enlatados à base de carne, vegetais frescos embalados, sumos naturais e em produtos fermentados derivados de vegetais, como cerveja ou vinho (Cleveland, 2001; Sun, Zhu, Guo & Xiao, 2012; Gharsallaoui et al., 2015). Para aumentar a eficácia de ação da nisina é possível e recomendável, utilizá-la em conjunto com outros métodos de conservação, como, por exemplo, atmosfera modificada, temperaturas reduzidas ou veículos que permitam reduzir a sua degradação e aumentem o seu tempo de ação (Cleveland, 2001).

Para além da sua utilização como conservante alimentar, a nisina pode também ser aplicada no tratamento de doenças infecciosas, incluindo infeções por estirpes resistentes a antibióticos tais como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e VRE, uma vez que a sua combinação com antibióticos apresenta efeitos sinérgicos (Dosler & Gerceker, 2012). Além das suas propriedades antimicrobianas, a molécula tem potencial anti-neoplásico graças às suas características citotóxicas e potencial imunomodulador, devido ao fato de possuir propriedades físico-químicas semelhantes aos HDP (Host Defence Peptides), pequenos péptidos catiónicos anfipáticos essenciais à resposta imune inata (Sah & Bierbaum, 2008; Boohaker, Lee, Vishnubhotla, Perez & Khaled, 2012; Shin et al., 2015).

3.6 Nisina no tratamento da doença periodontal

A nisina pode ser utilizada para prevenção e tratamento de doenças da cavidade oral como cáries e DP. A nisina exerce a sua atividade antimicrobiana em alguns dos géneros bacterianos relacionados com a patogenia da DP, como, por exemplo *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* (Howell et al. 1993, Tong et al., 2010; Shin et al., 2015).

O potencial da nisina como antimicrobiano oral foi descrito pela primeira vez em 1978 por Johnson, Hayday e Colman, que realizaram um estudo no qual incorporaram esta bacteriocina, na dose de 1000 IU/g, na dieta de oito macacos (*Macaca fascicularis*) adultos durante cinco meses. Após este período, compararam amostras da placa dentária destes oito animais com as de outros oito animais controlo, verificando que o grupo teste apresentou menor incidência de *Streptococcus* spp. (Johnson, Hayday & Colman, 1978).

Em 1993, um estudo realizado em beagles demonstrou as vantagens da nisina na prevenção do desenvolvimento de placa bacteriana e de gengivite, relativamente à clorexidina (Howell, Fiorellini, Blackburn, Projan, de la Harpe & Williams, 1993). Em 2010, Tong e colaboradores estudaram a capacidade da nisina em inibir nove géneros bacterianos associados ao desenvolvimento de cáries, demonstrando o potencial inibitório desta bacteriocina na presença de saliva, comprovando que esta mantém a sua atividade inibitória no ambiente da cavidade

oral. Para a utilização da nisina na cavidade oral é necessário que esta seja apresentada num veículo de administração estável e numa forma fácil de aplicar.

3.7 Veículos de administração

A nisina encontra-se comercialmente disponível como um sólido cristalizado, sendo que as formulações comerciais não excedem 2,5% de pureza, com 10^6 UI/g, contendo ainda proteínas lácteas e NaCl (Gharsallaoui et al., 2015).

Na indústria alimentar, onde é usada como conservante, é preferencialmente aplicada sob a forma aquosa, sendo misturada com o produto alimentar numa fase final da sua produção, de forma a que a nisina retenha o máximo de atividade possível. Quando utilizada na forma sólida, em pó ou na forma líquida por pulverização, é necessário proceder à homogeneização do produto aquando da sua aplicação (Gharsallaoui et al., 2015).

Para além de poder ser adicionada aos alimentos na sua forma pura, podem ainda ser inoculados microrganismos produtores de nisina diretamente no alimento, ou pode ser adicionada a uma matriz sólida de géis, filmes ou partículas, que permitem controlar a libertação de nisina e evitar a sua degradação por enzimas proteolíticas (Gharsallaoui et al., 2015).

De facto, a incorporação de nisina em micropartículas de hidrogel de alginato, um polímero aniónico natural obtido a partir de algas marinhas, permite proteger a nisina da ação de proteases e constitui uma forma de inclusão em produtos alimentares que permite ultrapassar dificuldades associadas à sua utilização na forma livre, evitando a sua inativação por substâncias próprias dos produtos a conservar (Lee & Mooney, 2012; Maresca, De Prisco, La Storia, Cirillo, Esposito & Mauriello, 2016).

A combinação de nisina com um filme plástico à base de celulose pode ser utilizada em embalagens de produtos alimentares, constituindo uma forma de apresentação prática que permite a proteção contra substâncias inativadoras de péptidos (Neetoo, Ye & Chen, 2007; Maresca et al., 2016).

Em medicina veterinária, são frequentemente utilizados antibióticos como medida profilática para controlo de microrganismos causadores de mastites em bovinos. A possibilidade de utilizar um PAM para prevenção de mastites permite evitar o uso de antibióticos convencionais. Encontra-se disponível uma formulação de toalhetas impregnadas com nisina para limpeza pré-ordenha, para prevenção de mastites em bovinos, comercializada nos Estados Unidos da América, denominada Wipe Out. A limpeza pré-ordenha com este produto permite uma redução superior a 99% na quantidade de microrganismos presentes no úbere,

atuando contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* e a nisina demonstra actividade contra os géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Outro estudo comparou a eficácia de uma formulação suplementada com nisina para prevenção de mastites em bovinos (Ambicine N) com os antisepticos convencionalmente utilizados demonstrando o potencial deste PAM (Sears et al. 1992, Pietersen & Todoroc, 2010).

Em 1933, Howell e associados realizaram um estudo, em beagles, no qual demonstraram os benefícios de uma solução para enxaguamento oral suplementada com nisina. Contudo não se encontram ainda disponíveis veículos que permitam a administração tópica de nisina para tratamento de DP em animais de companhia.

A possibilidade de associar uma substância com ação antimicrobiana sobre a microbiota oral e que não potencie o desenvolvimento de resistências a antimicrobianos, a um veículo que facilite a aplicação, pode revolucionar a terapêutica da DP.

3.7.1 Gel de goma de guar

O gel de goma de guar é obtido a partir do endosperma de sementes de *Cyamopsis tetragonoloba*, de nome comum Guar, uma planta pertencente à família *Leguminosae*, através de um processo que envolve a descasca e moagem das sementes (Thombare, Jha, Mishra & Siddiqui, 2016). A sua composição molecular denomina-se galactomanano, um polissacárido constituído por um eixo estrutural de D-manose com grupos laterais de D-galactose (Mendoza, 1998; Thombare et al., 2016). Por ser um polissacárido natural é dotado de propriedades muito atrativas para a sua utilização nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética, tais como, não ser tóxico, ser biodegradável, biocompatível, hidrofílico, hidratante, espessante, emulsionante e económico (Reddy, Mohan, Satla & Gaikwad, 2011; Thombare et al., 2016).

Quando adicionado a água o gel de goma de guar forma pontes de hidrogénio com as moléculas de água, conferindo à solução elevada viscosidade. Assim, as suas propriedades de viscosidade, rápida solubilidade em água fria, estabilidade numa larga gama de valores de pH e capacidade de formar filmes, para além da sua segurança, proporcionam uma grande versatilidade de aplicações (Reddy et al., 2011; Thombare et al., 2016). Já foram também realizados estudos que permitiram aumentar a bioadessividade deste composto facilitando assim a sua permanência na cavidade oral (Singh, Tiwary & Kaur, 2010).

Assim o gel de goma de guar demonstra potencial para utilizado para administração tópica de compostos bioativos.

III. Desenvolvimento experimental

1. Objetivos

Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial *in vitro* de dois veículos de administração para aplicação tópica de um péptido antimicrobiano (PAM), a nisina, num conjunto de isolados de *Enterococcus* spp. obtidos a partir de cães com DP.

Os dois veículos de administração selecionados foram a pasta dentífrica C.E.T.® (Virbac, C.E.T.® Enzymatic toothpaste for dogs and cats) e o gel de goma de guar (Sigma-Aldrich). A sua seleção teve como base o seu potencial para ser aplicado de formas distintas: a pasta dentífrica para aplicação na escovagem dentária e o gel de goma de guar para aplicação tópica na superfície dentária, sulco gengival e gengiva livre.

O potencial antimicrobiano destas duas formulações foi avaliado utilizando uma coleção de 46 isolados de *Enterococcus* spp. previamente obtidos a partir de cães com DP e já caracterizados relativamente ao seu perfil de virulência e de antibioresistência (Tavares, 2014; Oliveira et al., 2016; Semedo-Lemsaddek et al., 2016).

Para a avaliação da pasta dentífrica foi utilizada a técnica de difusão em poço (well diffusion assay) (Yadav, Chaudhary, Saxena, Talwar, Yadav, 2017), onde se procedeu à determinação dos diâmetros dos halos de inibição da multiplicação microbiana obtidos por ação de soluções combinadas de pasta com nisina em diferentes concentrações.

A avaliação do potencial inibitório do gel de goma de guar suplementado com nisina foi realizada pela determinação dos valores de CMI (Concentração Mínima Inibitória) e de CMB (Concentração Mínima Bactericida) deste péptido, segundo a técnica de microdiluição em placas de 96 poços (Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008).

2. Materiais e métodos

2.1 Isolados bacterianos

Para a realização deste estudo foram utilizados 46 isolados de *Enterococcus* spp., caracterizados em estudos anteriores (Tavares, 2014; Oliveira et al., 2016; Semedo-Lemsaddek et al., 2016), obtidos a partir de amostras, quer da cavidade oral, quer das válvulas cardíacas, durante necropsias a cães diagnosticados com DP e endocardite infecciosa. Como controlo foram incluídas neste estudo duas estirpes de referência de origem humana, *Enterococcus faecalis* OG1-10, isolada a partir de um caso de doença periodontal (ATCC® 19434) e *Enterococcus faecalis* V583, obtida a partir de um paciente com bacteriemia (ATCC® 700802).

Da coleção de 46 isolados veterinários em estudo, trinta e sete foram previamente identificados como *E. faecalis* (n=37), sete como *E. faecium* (n=7) e dois como *Enterococcus* spp. (n=2) (Tavares, 2014). Estes isolados foram parcialmente caracterizados fenotípica e genotipicamente, em relação à presença de fatores de virulência como a capacidade de formação de biofilme e perfil de resistência a antibióticos (anexo 8 e anexo 9) (Tavares, 2014).

Durante o período de realização deste estudo os isolados foram mantidos a -20 °C numa solução de água peptonada tamponada (BPW – Buffered Peptone Water) com 20 % de glicerol. Sempre que necessário foi realizada uma sementeira em meio de enriquecimento inespecífico, nomeadamente BHI com adição de agar (Brain heart infusion broth, VWR® Chemicals, ref. 84626.0500; Agar, VWR® Chemicals, ref. 84609.0500), posteriormente incubada a 37 °C durante 24 horas.

2.2 Nisina

Uma solução stock de nisina A em HCl 0,02M (Merck®, Hydrochloric acid fuming 37%), foi preparada a partir de nisina A em pó (Sigma®, 2,5%), tal como descrito por Tong e colaboradores em 2010, obtendo-se uma solução com concentração de 40mg/mL, esterilizada por filtração (Frilabo, 0.22µm, ref. FJ25BSCPS002AL01). De seguida, realizaram-se diluições sucessivas da solução inicial de 40 mg/mL, em água estéril, de modo a obter soluções com as concentrações de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 e 0,5 mg/mL, que foram armazenadas a 4°C durante o período de realização deste estudo.

2.3 Veículos de administração

2.3.1 Pasta dentífrica

A pasta dentífrica utilizada neste estudo foi gentilmente fornecida pela Virbac (C.E.T.® Enzymatic toothpaste for dogs and cats). A pasta é constituída por água, glicerina, sorbitol, hidrolisados de amido hidrogenado, sílica, trifosfato de sódio (agente antitártaro), carboxipolietileno, ovo em pó e fígado de porco (aromatizantes), subtilisina, glucose oxidase, cloreto de sódio, sorbato de potássio, benzoato de sódio, citrato de sódio, trióxido de dititanio, fosfato de sódio e cloreto de cálcio.

As preparações de pasta com nisina foram obtidas através da incorporação de diferentes concentrações de nisina, na proporção 1:1, com o auxílio de um vórtex, para homogeneização do produto, durante dois minutos. As concentrações finais de nisina, presentes na solução com a pasta, foram de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 10 e 13 mg/mL. Estas soluções foram armazenadas a 4°C e utilizadas, no máximo, nos sete dias seguintes à sua preparação. Como controlo negativo dos ensaios foi utilizada a pasta dentífrica formulada a 1:1 em água estéril.

2.3.2 Gel de goma de guar

A preparação do gel de goma de guar (Sigma-Aldrich, USA) a 1,5 % foi obtida através da sua diluição em água destilada estéril, com posterior esterilização em autoclave e armazenamento a 4°C. As preparações de nisina em gel de goma de guar, a diferentes concentrações, foram realizadas na proporção de 1:1, homogeneizadas num vórtex e armazenadas a 4°C.

2.4 Avaliação do potencial inibitório da solução de pasta dentífrica C.E.T.® e nisina, através do método de difusão em poço

Para a avaliação da capacidade inibitória da solução de pasta dentífrica suplementada com nisina foi utilizada a técnica de difusão em poço (Yadav, Chaudhary, Saxena, Talwar & Yadav, 2017).

Para tal, foram realizadas sementeiras em tapete em placas de TSA (Typtic Soy Agar, VWR® Chemicals, ref. 84602.0500), a partir de suspensões bacterianas em água estéril com o grau de turvação de 0,5 na escala de McFarland (bioMérieux®, ref. 70900), equivalente a 10⁸ UFC/mL. Após sementeira foram realizados, por placa, seis poços no agar. Estes poços foram preenchidos com 40 µL de solução de pasta suplementada com nisina a diferentes

concentrações e a placa foi incubada a 37°C durante 24 horas. Após este período procedeu-se à observação e medição, em milímetros, dos diâmetros dos halos de inibição de multiplicação bacteriana (Imagem 6).

Imagem 6: Halos de inibição de multiplicação bacteriana obtidos no ensaio de pasta dentífrica suplementada com nisina (original do autor).



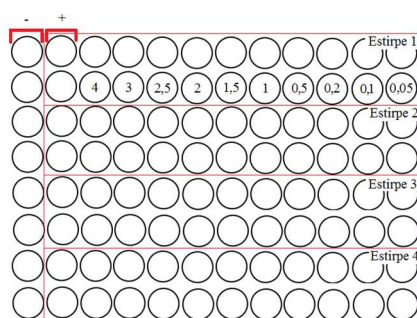
2.5 Determinação da concentração mínima inibitória da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina

Para determinar a suscetibilidade dos isolados à solução de nisina em gel de goma de guar foram realizados ensaios segundo a técnica de microdiluição em placa, utilizando um protocolo baseado nas normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008).

Assim, 40 µl da solução de gel de goma de guar com nisina a diferentes concentrações foram colocados em cada um dos poços de uma microplaca de 96 poços (VWR® Tissue culture plates, ref. 10062-900), com exceção das colunas reservadas para o controlo positivo e negativo, de acordo com o esquema da Figura 7.

A escolha das concentrações a utilizar teve por base o trabalho realizado por Pinheiro em 2016, que realizou ensaios, para a determinação da CMI da nisina relativamente a estas estirpes.

Figura 7: Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CMI da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (original do autor).



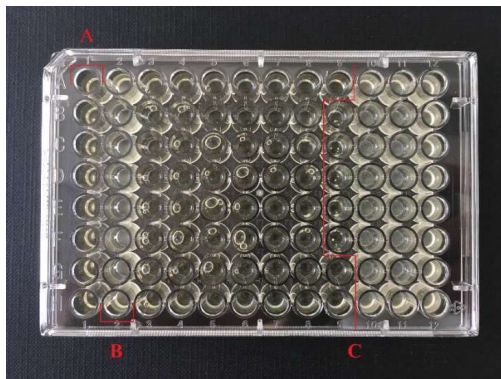
Legenda: os valores apresentados representam as diferentes concentrações de nisina presente em cada coluna (mg/mL); - coluna do controlo negativo; + coluna do controlo positivo;

Seguidamente preparam-se suspensões bacterianas das diferentes estirpes, em 5 ml de NaCl estéril, com um grau de turvação de 0,5 na escala de McFarland, correspondendo à concentração aproximada de 10^8 UFC/mL. Estas suspensões foram diluídas a 1:100 em TSB (Tryptic soy broth, VWR® Chemicals, ref. 84675.0500), de modo a obter suspensões bacterianas com a concentração aproximada de 10^6 UFC/mL.

Posteriormente os poços da microplaca foram inoculados com 160 μ l das suspensões bacterianas, com a exceção da coluna do controlo negativo (figura 7). Deste modo, no volume de 200 μ l presente em cada poço, obteve-se uma concentração final de nisina por poço de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 e 4 mg/mL.

Finalmente, os poços correspondentes ao controlo negativo foram preenchidos com 160 μ l de TSB e a placa foi incubada a 37°C durante 24 horas, ao fim das quais se procedeu à leitura visual da CMI (imagem 7).

Imagem 7: Leitura de uma microplaca (original do autor).



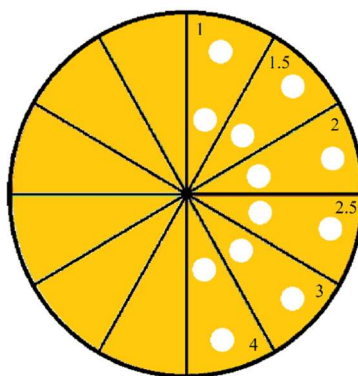
Legenda: A – coluna dos poços do controlo negativo; B – coluna dos poços do controlo positivo; C – Separação dos poços nos quais é possível ver crescimento bacteriano (direita) para aqueles em que não é visível crescimento (esquerda).

A concentração mínima inibitória é definida como a concentração mais baixa de nisina capaz de prevenir a multiplicação bacteriana *in vitro*, ou seja, a concentração do poço em que não ocorre crescimento microbiano visível.

2.6 Determinação da concentração mínima bactericida da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina

Após o período de incubação de 24h a 37°C e da leitura da CMI, tal como descrito anteriormente, procedeu-se à sementeira, em meio TSA, de 3 µL das suspensões bacterianas presentes em todos os poços onde não foi possível observar visualmente multiplicação bacteriana, com exceção dos poços destinados ao controlo negativo, tal como se pode observar na figura 8.

Figura 8: Esquema representativo de uma placa de TSA para determinação da CMB, realizada para uma estirpe com CMI = 1 mg/mL (original do autor).



Legenda: Para uma CMI de 1 mg/mL, as concentrações a semear em placa são de 1 até a 4 mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, ao fim das quais se procedeu à observação do desenvolvimento de colónias bacterianas e determinação da CMB (imagem 8).

Imagem 8: Exemplo dos resultados obtidos na determinação da CMB para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (original do autor).



A concentração mínima bactericida é definida como a concentração mais baixa capaz de provocar a morte bacteriana, determinada na sequência da CMI, por subcultura das suspensões presentes nos poços em placas de meio sólido não seletivo, livre de qualquer agente antimicrobiano (Santos et al., 2016).

Tanto os ensaios para determinação da CMI com da CMB foram realizados em triplicado, em dias diferentes, e testando ainda 10% de réplicas, de forma a garantir a reprodutibilidade dos resultados.

3. Análise estatística

Os dados, gráficos e tabelas foram elaborados utilizando o software Microsoft Office Excel 2016 e apresentados de acordo com o formato APA (American Psychological Association).

Os resultados obtidos foram analisados recorrendo ao programa R – versão 3.3.2 (2016-10-31), utilizando a funcionalidade R commander – versão 2.3-2. Para a análise dos dados foi realizado um teste de normalidade para cada variável, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, assumindo que as variáveis que apresentassem valores de p -value $> 0,05$ tinham distribuição normal.

Para avaliar se existia diferença significativa entre as variáveis, no caso de apresentarem distribuição normal, foi realizado um teste t -student para dados emparelhados; no caso de não terem distribuição normal, recorreu-se a um teste não paramétrico, o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas. Em ambas as situações, foi considerado que existiam diferenças significativas para valores de p -value $\leq 0,05$. Em todos os testes estatísticos foi usado um intervalo de confiança de 95% (IC95%).

4. Resultados e discussão

A 27 de fevereiro de 2017 a WHO publicou uma lista que distribui os agentes patogénicos resistentes a antibióticos em três categorias de prioridade para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesta lista constam as 12 famílias bacterianas que constituem maior risco para a saúde humana, sendo que as estirpes de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina se encontram classificadas como pertencendo à segunda categoria, de prioridade alta (WHO, 2013). Assim, é urgente desenvolver antimicrobianos competentes para fazer face a este problema crescente (Mr. Hermann Gröhe, Ministro da saúde, Alemanha).

Os PAM surgem como uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais. Estes compostos constituem um grupo diverso de moléculas com propriedades catiónicas e anfipáticas que atuam especificamente em membranas com fosfolípidos com carga negativa e sem colesterol, tal como a membrana das bactérias do género *Enterococcus* spp. (Liu et al., 2007; Baltzer & Brown, 2011). Para além da sua eficácia inibitória, relativamente a um grande leque de microrganismos, os péptidos antimicrobianos atuam também como modeladores do sistema imunitário e demonstram níveis muito baixos de resistência natural, graças ao seu duplo modo de ação, atuando através da inibição da biossíntese da parede celular e da promoção da formação de poros na membrana celular (Rosenfeld, Papo & Shai, 2006; Draper et al., 2015; Santos et al., 2016). Alguns autores sugerem também que os PAM possuem a capacidade de prevenir e eliminar biofilmes já formados (Stempel, Strehmel & Overhage, 2015).

De entre os PAM destaca-se a nisina, uma molécula pertencente ao grupo dos lantibióticos, e que é um dos mais estudados e bem caracterizados (Abts et al., 2011), estando inclusivamente aprovado para utilização como aditivo alimentar pela FAO/WHO e pela FDA, há mais de 28 anos (Field et al., 2015; Gharsallaoui et al., 2015; Shin et al., 2015).

Apesar das referidas vantagens, a administração de PAM é um obstáculo a ultrapassar, pois dada a sua natureza proteica podem ser facilmente degradados no organismo antes de atingirem concentrações terapêuticas no local de ação (Zendo et al., 2010; O'Driscoll et al., 2013), sendo deste modo importante identificar veículos de administração seguros e eficazes.

A pasta dentífrica C.E.T.®, aprovada pelas entidades reguladoras e disponíveis comercialmente, constitui um possível veículo de administração de PAM, não tendo na sua constituição substâncias que inativem a ação da nisina, pelo que da conjugação de ambas será espectável obter um efeito simultâneo dos benefícios da pasta dentífrica e da nisina.

Os polissacáridos naturais, como o gel de goma de guar, constituem também um grupo promissor de veículos de administração, principalmente pela via tópica, graças ao facto de não

serem tóxicos, serem biodegradáveis, biocompatíveis, economicamente viáveis, serem rapidamente solúveis em água, estáveis a uma grande gama de valores de pH e serem capazes de formar filmes bioadesivos (Reddy et al., 2011; Thombare et al., 2016).

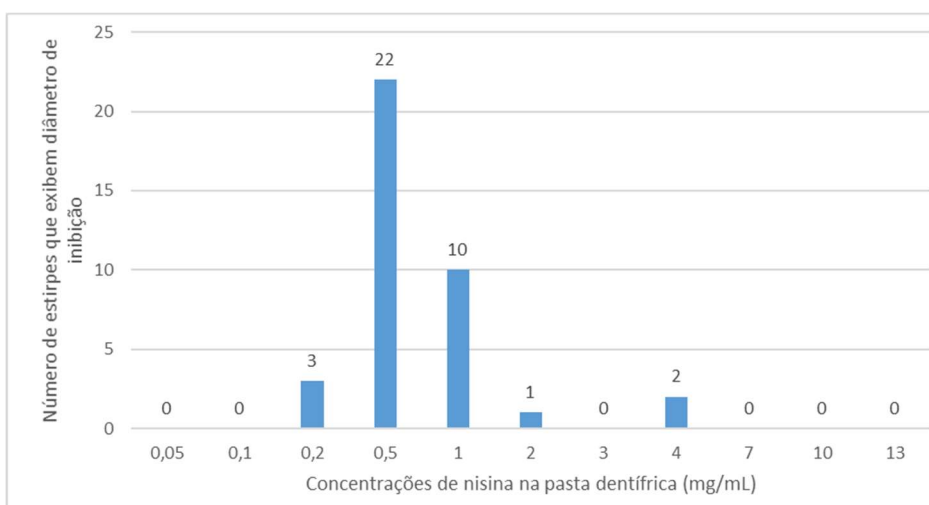
4.1 Avaliação do potencial inibitório da solução de pasta dentífrica C.E.T.® e nisina, através do método de difusão em poço

De modo a determinar o potencial inibitório da pasta dentífrica suplementada com nisina e confirmar a capacidade deste composto como veículo de administração de um PAM com ação em estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas a partir da cavidade oral de cães com DP, foi primeiro realizado um ensaio controlo para avaliação da capacidade inibitória da pasta dentífrica não suplementada. Neste ensaio foram utilizadas as 46 estirpes de *Enterococcus* spp. referidas anteriormente das quais apenas 8,7% (n=4) demonstraram sensibilidade à pasta dentífrica.

A totalidade dos resultados obtidos para o diâmetro dos halos de inibição de multiplicação bacteriana pode ser consultada no anexo 1.

Quando suplementada com nisina, a ação inibitória de multiplicação bacteriana foi superior, uma vez que 91,3% (n=42) das estirpes demonstraram sensibilidade às soluções de pasta dentífrica suplementadas com nisina. A concentração de nisina a partir da qual a maioria das estirpes exhibe halos de inibição de multiplicação é de 0,5 mg/mL (gráfico 3).

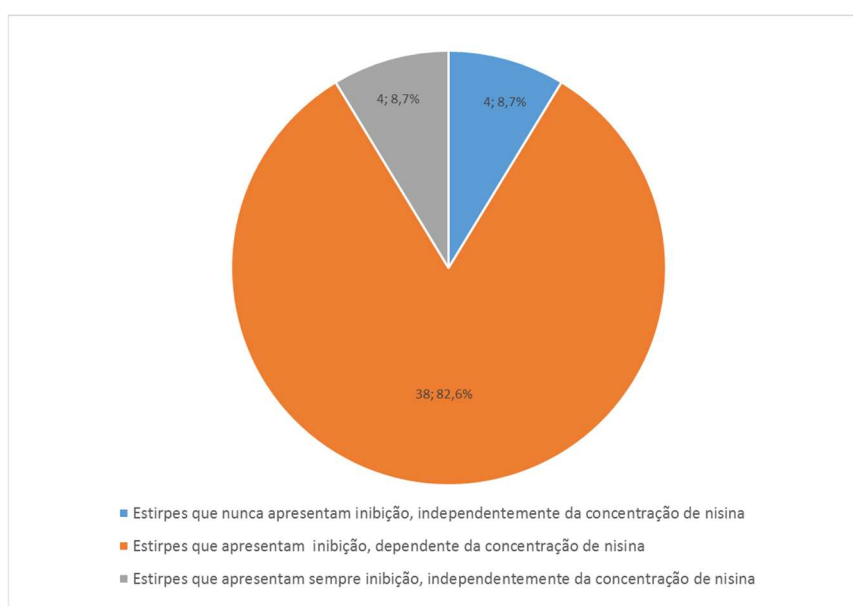
Gráfico 3: Relação entre as concentrações de nisina presentes na pasta dentífrica suplementada e a observação dos primeiros halos de inibição de multiplicação bacteriana de cada estirpe.



De facto, das concentrações de nisina testadas, 0,5 mg/mL parece ser a concentração mais eficaz, uma vez que é a concentração mais baixa que proporciona um maior aumento no número de estirpes que demonstram inibição.

No entanto, é importante referir que a pasta dentífrica suplementada não apresenta atividade inibitória relativamente a 8,7% (n=4) das 46 estirpes testadas, independentemente da concentração de nisina presente na pasta, enquanto que outros 4 isolados apresentam sempre halos de inibição de multiplicação quer para pasta suplementada, quer para a pasta não suplementada (gráfico 4).

Gráfico 4: Gráfico representativo das três categorias de estirpes, classificadas de acordo com a sua resposta à pasta dentífrica suplementada.



Considerando a caracterização das estirpes previamente realizada por Tavares em 2014, é possível observar que as 4 estirpes que apresentam sempre halos de inibição de multiplicação bacteriana, as estirpes EZ 25, EZ 26, EZ 27, EZ 28, provêm todas do mesmo animal. Os isolados EZ 25 e EZ 26 foram obtidos a partir da cavidade oral e EZ 27 e EZ 28 a partir do coração, tendo sido posteriormente verificado por tipificação genotípica que EZ 25 e EZ 27, correspondem ao mesmo isolado (Tavares, 2014; Semedo-Lemsaddek et al., 2016). Estas 4 estirpes identificadas como *E. faecalis* apresentam um perfil de virulência único, comparativamente às outras estirpes em estudo (anexo 8).

Relativamente às 4 estirpes que nunca apresentam halos de inibição de multiplicação (EZ 19, EZ 20, EZ 40, EZ 46), as estirpes EZ 19 e EZ 20 correspondem também a isolados de *E. faecalis*, obtidos a partir do mesmo animal, um proveniente da cavidade oral e outro do coração, que exibem um perfil de virulência comum e distinto das restantes (anexo 8). As

estirpes EZ 40 e EZ 46 são provenientes de dois animais distintos, sendo que a primeira foi isolada a partir da cavidade oral e a segunda a partir do coração. A estirpe EZ 40, tal como as anteriores, apresenta um perfil de virulência distinto, ao contrário do isolado EZ 46 (anexo 8). As estirpes EZ 19 e EZ 20, possuem, respetivamente, fraca e moderada capacidade de formação de biofilme, estes isolados apresentam vários genes de virulência como: *efa(Afs)*, uma adesina característica da espécie *E. faecalis*; *agg*, que codifica para uma substância de agregação de *Enterococcus* spp.; *ace*, que codifica para uma adesina de ligação ao colagénio tipo I, da espécie *E. faecalis*; *gls 24*, um regulador de resposta ao stress da espécie *E. faecalis*; e os genes *ebpABC*, codificantes para fímbrias associadas à formação de biofilme pela espécie *E. faecalis*. Esta combinação de genes torna estes dois isolados particularmente resistentes à ação de compostos antimicrobianos, sendo especialmente relevante a presença do gene *ace*, que tal como referido, codifica para uma adesina responsável pela ligação ao colagénio, a principal proteína estrutural da matriz extracelular e a mais abundante em vertebrados, sendo por isso um fator de virulência muito relevante (Semedo et al., 2003a; Semedo-Lemsaddek et al., 2012; Tavares 2014).

A estirpe EZ 40 não apresenta o gene *ace* nem capacidade de formar biofilme, mas é uma das 3 estirpes da coleção em estudo que apresenta simultaneamente os genes de virulência *cylA* e *gelE*, codificantes para citolisina e gelatinase, respetivamente. Estes podem conferir a esta estirpe vantagens relativamente às restantes e assim explicar a sua resistência à ação combinada da pasta dentífrica e nisina (Semedo et al., 2003a). A presença do operão *cyl* encontra-se relacionada com a capacidade de produção de β -hemolisinas, no entanto nem todas as estirpes produtoras de β -hemolisinas possuem o gene *cylA* (Semedo et al., 2003b). Desta forma, este isolado pode possuir outros genes que justifiquem a resistência à nisina e que não tenham sido pesquisados ou pode existir uma relação entre os fatores de virulência pesquisados e a resistência a este PAM que ainda não esteja totalmente esclarecida.

Por outro lado, relativamente às estirpes EZ 25, EZ 26, EZ 27, EZ 28, que apresentam sempre halos de inibição de multiplicação, o seu perfil de virulência é caracterizado pela presença de vários fatores, entre os quais a capacidade moderada e elevada de produção de biofilme e a presença dos genes *efa(Afs)*, *agg*, *cylA*, *ace*, *gls24* e *ebpABC*. Assim os resultados obtidos podem dever-se à sensibilidade individual a um componente da pasta dentífrica, originado pela presença ou ausência de um gene não incluído no estudo realizado por Tavares em 2014, ou devido à exposição deste animal e conseqüentemente da sua microbiota, a algum componente que tenha promovido o aumento de sensibilidade das estirpes.

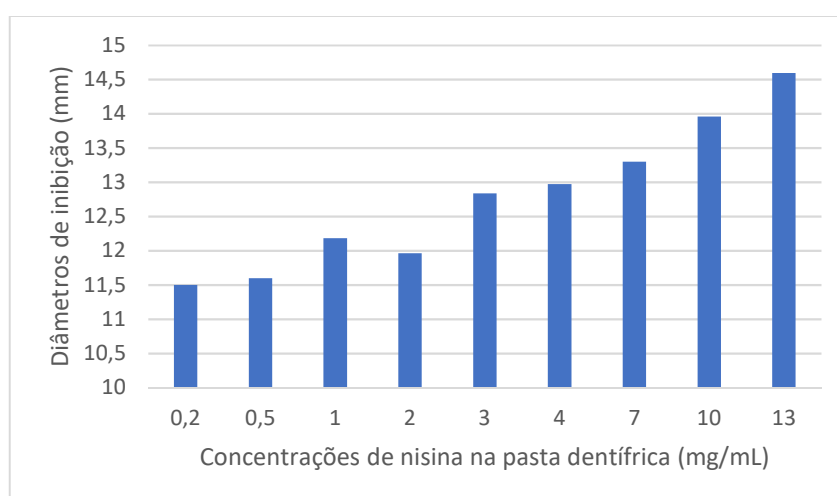
Tanto as estirpes que nunca demonstram halos de inibição de multiplicação bacteriana (EZ 19, EZ 20, EZ 40, EZ 46) como as estirpes que os demonstram constantemente (EZ 25, EZ

26, EZ 27, EZ 28) apresentam valores de CMI para a nisina muito próximos de média, o que indica que as diferenças relativas aos halos de inibição de multiplicação bacteriana não se devem à nisina, mas sim à pasta dentífrica; estas estirpes poderão apresentar mecanismos individuais específicos que lhes conferem um perfil de suscetibilidade (EZ 25, EZ 26, EZ 27, EZ 28) ou de resistência (EZ 19, EZ 20, EZ 40, EZ 46) a algum componente da pasta dentífrica.

Relativamente ao perfil de resistência a antibióticos, não parece existir associação entre perfis de resistência e a sensibilidade à pasta dentífrica suplementada e não suplementada (anexo 9) (Tavares, 2014).

Os diâmetros dos halos de inibição de multiplicação obtidos variam entre 10,00 e 16,33 mm, tendo os poços um diâmetro constante de 5 mm. Tal como esperado, o valor médio dos diâmetros dos halos aumentou com o aumento da concentração de nisina presente na pasta dentífrica, tal como é possível observar no gráfico 5. Nesta análise foram excluídos os isolados com perfil de resistência e de suscetibilidade constante.

Gráfico 5: Média dos diâmetros dos halos de inibição de multiplicação consoante a concentração de nisina presente na pasta dentífrica suplementada.



Para avaliar se nenhum dos componentes da pasta dentífrica é responsável pela inativação e se a incorporação deste PAM neste veículo de administração tópica é vantajosa, é necessário comparar os valores da CMI obtidos para a nisina e para a nisina incorporada na pasta dentífrica.

O valor médio da CMI da nisina é de 0,549 mg/mL (Pinheiro, 2016) (anexo 3); quando incorporada numa pasta dentífrica, na concentração de 0,5 mg/mL, a nisina foi eficaz, originando halos de inibição em 63% (n=29) dos isolados em estudo. Esta percentagem

aumenta com o aumento da concentração de nisina na pasta de dentes, verificando-se que numa concentração de 1 mg/mL, a pasta dentífrica suplementada provoca halos de inibição em 84,8% (n=39) das estirpes, o que corresponde a um aumento de 21 pontos percentuais. Deste modo, estes resultados permitem também concluir que a suplementação da pasta dentífrica com nisina poderá ser muito benéfica para controlo de espécies do género *Enterococcus* isoladas a partir da cavidade oral de cães com DP. A pasta dentífrica demonstra ser um veículo de administração promissor, na medida em que a nisina mantém a sua atividade inibitória contra a maioria das estirpes de *Enterococcus* spp. testadas, 91,3 % (n=42), em concentrações que variam entre 0,05 mg/mL e 4 mg/mL.

Esta nova formulação permite adicionar o efeito antimicrobiano da nisina aos múltiplos benefícios da pasta, tais como a palatabilidade, o efeito antitártaro, o modo de aplicação e o seu preço. A suplementação da pasta dentífrica com a concentração de 1mg/mL de nisina representaria aproximadamente um aumento do custo de produção de apenas 0,024 € por mililitro de pasta, que poderá ser diluído com a produção em grande escala (cálculos efetuados com base no custo de 25 g de nisina corresponder a 500 €).

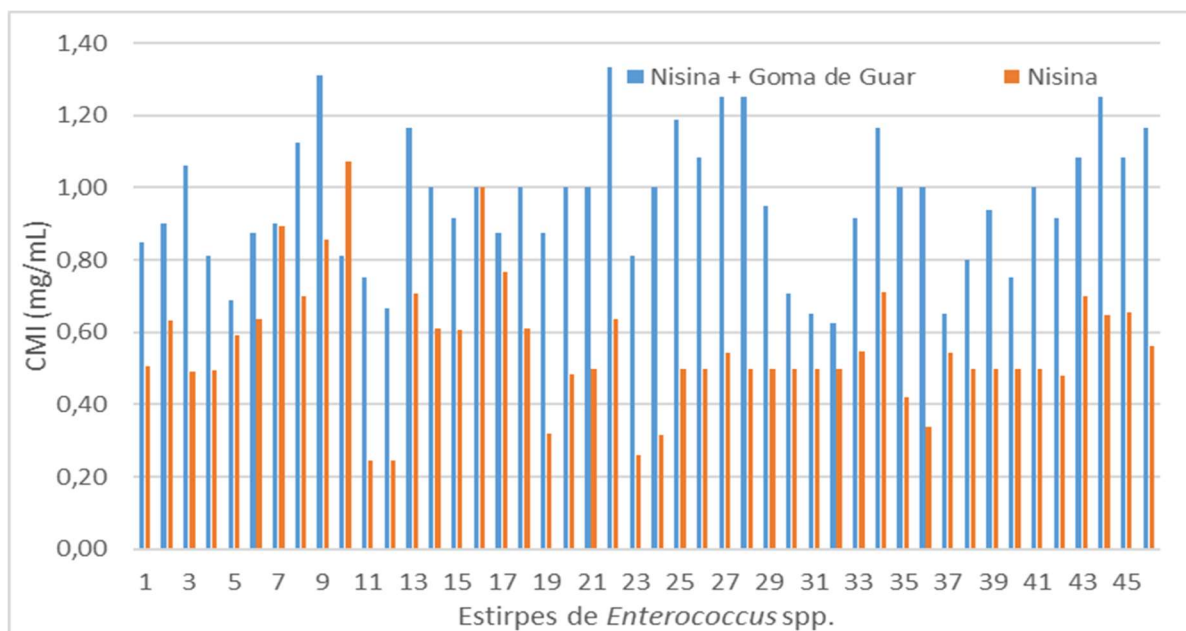
4.2 Determinação da concentração mínima inibitória da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina

A avaliação do potencial do gel de goma de guar como veículo de administração tópica de nisina na cavidade oral do cão foi realizada através da determinação da CMI de uma solução de goma de guar suplementada com nisina em concentrações variáveis entre 0,05 e 4 mg/mL, relativamente às 46 estirpes de *Enterococcus* spp. em estudo.

Todas as estirpes demonstraram suscetibilidade à ação inibitória do gel de goma de guar suplementado com nisina (anexo 2). Da coleção de 46 isolados, os valores mínimos e máximos de CMI obtidos foram respetivamente de 0,62 e 1,33 mg/mL, enquanto que o valor médio da CMI obtido foi de $0,96 \pm 0.18$ mg/mL.

Para uma perceção real da eficácia da combinação de gel de goma de guar com o PAM nisina e para avaliar possíveis interações entre os dois, os resultados deste estudo foram comparados com os resultados previamente obtidos por Pinheiro em 2016 (gráfico 6), onde foram avaliadas as CMI e CMB da nisina para as mesmas 46 estirpes de *Enterococcus* spp. em estudo (anexo 3).

Gráfico 6: Comparação entre os valores médios de CMI obtidos para cada estirpe no ensaio com a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina e os valores médios de CMI obtidos para cada estirpe no estudo de Pinheiro, 2016.



Tal como é possível observar no gráfico 6, os valores obtidos para as CMI no ensaio realizado com a solução composta por nisina e goma de guar foram maioritariamente mais elevados que as CMI obtidas no ensaio realizado por Pinheiro em 2016. O valor médio da CMI para a solução suplementada com nisina foi de $0,96 \pm 0,18$ mg/mL, enquanto que o valor de CMI médio obtido apenas para a nisina foi de $0,55 \pm 0,17$ mg/mL.

Analisando a diferença entre os valores obtidos, em ambos os estudos, é possível verificar que a CMI variou entre 0,007 e 0,75 mg/mL e que a média da diferença é de 0,4 mg/mL, ou seja, em média a CMI de cada uma das estirpes de *Enterococcus* spp. testadas aumenta 0,4 mg/mL quando a nisina é incorporada no gel de goma de guar.

Através desta análise comparativa, é também possível verificar que 1 dos 46 isolados estudados (EZ 10) apresenta valores de CMI mais elevados para a nisina do que para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina, o que contraria a tendência global. Por sua vez, o isolado EZ 16 apresenta o mesmo valor de CMI para a nisina e para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de estas duas estirpes apresentarem os maiores valores de CMI registados para a nisina, superiores à média global de valores da CMI da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina.

Apesar dos valores relativos à CMI da nisina incorporada no gel de goma de guar apresentarem uma distribuição normal, revelada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk

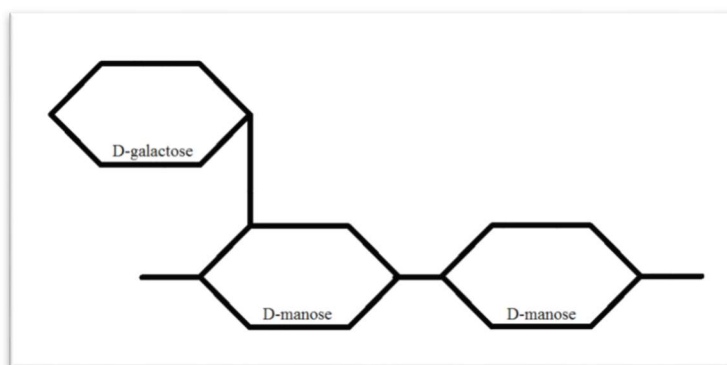
($p > 0,05$), o mesmo não acontece para os dados relativos à CMI da nisina ($p < 0,05$). Assim a significância estatística da diferença entre resultados foi analisada utilizando um teste não paramétrico, o teste Wilcoxon para amostras não emparelhadas. As diferenças entre os valores de CMI de nisina incorporada e sem ser incorporada no gel de goma de guar, são estatisticamente significativas ($p < 0,05$), para um intervalo de confiança de 95%.

As estirpes EZ 10 e EZ 16, cujos resultados obtidos não apresentam distribuição normal foram avaliados através do teste Wilcoxon para amostras emparelhadas. Neste caso o valor de p obtido foi $> 0,05$, ou seja, as diferenças entre as CMI não são estatisticamente significativas para estas duas estirpes.

Ao analisar as diferenças entre as CMI obtidas no ensaio de Pinheiro, em 2016, e as obtidas no presente estudo, relativamente às estirpes que demonstram uma diferença significativa ($p > 0,05$), é possível concluir que em média a CMI de uma estirpe aumenta 99,78 % quando a nisina é adicionada ao gel de goma de guar (anexo 4).

O aumento da concentração de nisina necessário para inibir a multiplicação, visível a olho nu, das diferentes estirpes de *Enterococcus* spp. pode dever-se a vários fatores relacionados com a incorporação deste PAM no gel de goma de guar. Este gel, apesar de ter sido utilizado na proporção de 1,5 % v/v, demonstrou a capacidade de conferir um aumento muito expressivo de viscosidade à solução a que é adicionado. Quimicamente, a goma de guar corresponde a um polissacárido, formado por uma cadeia linear de monómeros de D-manose que constituem o eixo estrutural com ramificações alternadas de D-galactose (figura 9) (Mendoza, 1998, Thombare, 2016).

Figura 9: Subunidade de uma molécula de goma de guar (original do autor).



Os polissacáridos constituem uma excelente fonte de carbono para utilização pelo metabolismo bacteriano, especialmente se forem compostos constituídos por moléculas pouco ramificadas, tal como acontece com a goma de guar. A degradação deste tipo de moléculas é

mais rápida, o que facilita a potencial utilização deste polissacárido como nutriente bacteriano (Mendoza, 1998). A utilização da goma de guar como fonte de carbono por bactérias do género *Enterococcus* poderá ser uma das razões que justifica a aproximação da CMI à CMB para a solução de gel suplementado com nisina, pois a presença de uma fonte nutritiva iria provocar um aumento da taxa metabólica dos microrganismos. Além disso, Mendoza também demonstrou que as características físico-químicas deste composto, nomeadamente a aW (atividade da água) de 0,998 e o pH de 7,4 não têm influência negativa sobre a multiplicação bacteriana (Mendoza, 1998).

A utilização do gel de goma de guar como veículo de administração de nisina promove um aumento na viscosidade do meio que tem impacto direto na mobilidade celular, na difusão de nutrientes e conseqüentemente na taxa de multiplicação bacteriana. No caso específico dos *Enterococcus* spp., que são microrganismos maioritariamente imóveis, a influência da viscosidade do meio na mobilidade celular não é relevante; por outro lado, o aumento da viscosidade poderá afetar negativamente a difusão de nutrientes e conseqüentemente diminuir o aporte nutritivo (Mundt, 1986, Mendoza, 1998). Por fim o aumento da viscosidade, também poderá dificultar a difusão de nisina a partir desta solução, o que contribui para o aumento do valor da CMI.

Tendo em conta que a concentração a ser utilizada comercialmente numa preparação de gel de goma de guar suplementada com nisina seria 1 mg/mL, os custos acrescidos ao gel de goma de guar por mililitro seriam semelhantes aos previamente determinados para a pasta dentífrica; assim, para cada mililitro de gel suplementado com nisina acresce o valor de 0,024 €, custo que, mais uma vez, poderá ser diminuído com a produção em larga escala.

4.3 Determinação da concentração mínima bactericida da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina

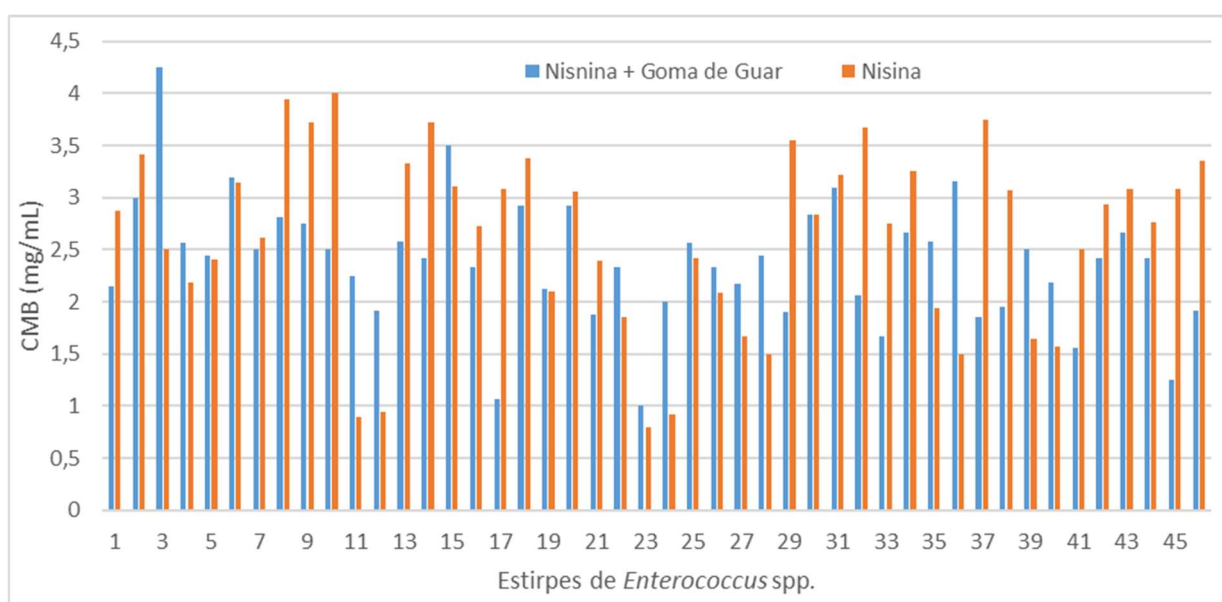
Como referido anteriormente, o ensaio para determinação da CMB é realizado na sequência do ensaio da CMI. Os valores de CMB obtidos para os isolados em estudo variaram entre 1 e 3,5 mg/mL, tendo em atenção que um dos isolados apresentou um valor de CMB >4 mg/mL. Para efeitos de tratamento dos dados, os valores >4 mg/mL foram substituídos por aquela que seria a concentração seguinte a ser testada, ou seja, 5 mg/mL. Os dados relativos ao trabalho de Pinheiro em 2016 foram avaliados da mesma forma para que fosse possível realizar a comparação de resultados.

O valor médio da CMB para a nisina incorporada no gel goma de guar é de $2,38 \pm 0,59$ mg/mL. O desvio padrão elevado demonstra a dispersão dos resultados obtidos, que resulta,

provavelmente, de dificuldades técnicas resultantes da elevada viscosidade do gel de goma de guar, e da consequente dificuldade de homogeneização da solução suplementada.

Os resultados de CMB obtidos para a solução de gel suplementado com nisina foram comparados com os resultados obtidos por Pinheiro em 2016 para a nisina (anexo 6), com o objetivo de avaliar o efeito da incorporação de um PAM neste veículo de administração, mas ao contrário do que se verificou relativamente à CMI, os valores obtidos para a CMB da solução de nisina incorporada no gel de goma de guar são maioritariamente inferiores aos valores da CMB para a nisina (gráfico 7).

Gráfico 7: Comparação entre os valores médios de CMB obtidos para cada estirpe no ensaio com a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina e os resultados de Pinheiro, 2016.



A CMB média obtida no presente ensaio foi de $2,38 \pm 0,59$ mg/mL, o que corresponde a um decréscimo de 0,27 mg/mL relativamente à CMB média obtida para a nisina, realizado por Pinheiro em 2016, que foi de $2,65 \pm 0,85$ mg/mL.

A CMB da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina foi inferior para 56,5 % (n=26) dos 46 isolados em estudo, superior para 41,3 % (n=19) e idêntica para 2,2 % (n=1), comparativamente aos resultados obtidos por Pinheiro em 2016.

Realizando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, para averiguar qual o teste estatístico mais correto para analisar os dados, foi possível observar que a variável, correspondente à CMB da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina, não apresenta distribuição normal ($p < 0,05$). Consequentemente foi realizado o teste Wilcoxon para amostras emparelhadas, que indicou não existir uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados relativos à

nisina e à solução suplementada com nisina. Assim, apesar do valor da CMB obtido para a solução suplementada com nisina ser inferior à CMB obtida para a nisina, esta diferença não é significativa ($p>0,05$), o que permite concluir que o gel de goma de guar não exerce influência negativa sobre o efeito inibitório da nisina, o que reforça o potencial de utilização deste gel como veículo para administração tópica de nisina. No anexo 7 é possível observar uma tabela onde se encontram registados, para cada estirpe, os valores da CMB para a solução de gel de goma de guar e nisina, a CMB da nisina, a diferença entre ambas e a quantificação percentual dessa diferença.

Caso o gel de goma de guar seja de facto nutritivo para os isolados de *Enterococcus* spp. em estudo, a presença de uma fonte nutritiva aceleraria o metabolismo destes microrganismos, o que potencia a ação de compostos que atuam, como a nisina, na parede celular, através da formação de poros ou do sequestro de percussores do PG. Esta hipótese justificaria o facto de os valores de CMB obtidos neste estudo tenham sido semelhantes aos resultados de Pinheiro em 2016, apesar de a CMI ter aumentado para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina relativamente à nisina.

A totalidade de resultados obtidos para a determinação da concentração mínima bactericida da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina pode ser consultada no anexo 5.

4.4 Atividade bactericida

Um composto bacteriostático é capaz de inibir a multiplicação de determinado microrganismo, mas não o elimina, enquanto que um composto bactericida é capaz de eliminar esse mesmo microrganismo (French, 2006). Os compostos antimicrobianos bactericidas apresentam geralmente CMB muito próximas da CMI, e nunca mais que quatro vezes superiores à CMI (Levinson & Levinson, 2009).

Embora Pinheiro em 2016 tenha verificado que, para a maioria das estirpes, a CMB para a nisina é mais que 4 vezes superior ao valor da CMI, revelando-se assim um composto bacteriostático, neste estudo observou-se um aumento na CMI, sem que tenha ocorrido uma alteração significativa no valor da CMB. Assim, em 97.8 % ($n = 45$) das estirpes em estudo, o rácio CMB/CMI é inferior a 4, o que significa que para 97.8 % das estirpes o efeito do gel de goma de guar suplementado com nisina é classificado como bactericida.

A ação bactericida ou bacteriostática de determinado composto antimicrobiano contra determinado microrganismo está relacionada com o mecanismo de ação desse antimicrobiano. Geralmente os compostos que atuam ao nível da parede celular ou da membrana celular ou interfirm com a ação de enzimas bacterianas tendem a ser bactericidas, enquanto que os

compostos que inibem a síntese proteica ou a função ribossômica tendem a ser bacteriostáticos (Levinson & Levinson, 2009).

A nisina atua, principalmente, através de dois mecanismos: pelo sequestro do lípido II, um precursor do PG (peptidoglicano) da parede celular bacteriana, e pela formação de poros na membrana celular, o que origina a perda de componentes celulares e a perda da homeostasia celular (Breukink et al., 2003; Tong et al., 2010; Zendo et al., 2010). Assim compreende-se a ação bactericida, demonstrada por este estudo, da nisina face às 46 estirpes de *Enterococcus* spp. testadas. Apesar da presença de gel de goma de guar, a nisina aparenta continuar a exercer a sua atividade a nível da parede e membrana celular, tal como descrito na literatura.

A alteração de classificação de bacteriostática para bactericida foi causada, não por uma alteração que tenha ocorrido na nisina, mas sim devido ao aumento da taxa metabólica dos *Enterococcus* spp.

4.5 Dose Diária Aceitável

A dose diária aceitável (DDA) corresponde a uma estimativa da quantidade de determinada substância, que é possível ingerir diariamente durante toda a vida, sem que daí advenha um risco apreciável para a saúde humana (EFSA, 2016). Sendo o objetivo final deste produto o desenvolvimento de um composto com nisina para aplicação tópica na cavidade oral de cães, é necessário avaliar se as quantidades em estudo apresentam risco para estes animais.

A WHO realizou em 2013 a análise de segurança deste composto, tendo em consideração, estudos de toxicidade aguda e crónica, genotoxicidade e toxicidade (Frazer, Sharratt & Hickman, 1962; WHO, 2013). Assim, o septuagésimo sétimo relatório técnico conjunto da FAO e WHO determinou a DDA para o homem, da nisina como sendo de 0 – 2 mg/kg p.v., com base num ensaio de 13 semanas em murganhos e com a aplicação de um fator de segurança de 100 (10 x 10; intraespecífico x interespecífico). No entanto, é ainda importante referir que a nisina é degradada no trato intestinal superior pela ação de enzimas pancreáticas como a α -quimotripsina, o que torna a exposição sistémica improvável (Bernbom et al., 2006; Reunanen & Saris, 2009; WHO, 2013)

De modo geral, a quantidade de pasta dentífrica a aplicar na limpeza da cavidade oral de cães, varia consoante o tamanho do animal. As pastas dentífricas veterinárias indicam, nas instruções de utilização, a quantidade de pasta a aplicar em centímetros, variando desde 2 cm para cães pequenos, até 5 cm para cães grandes.

Considerando que as pastas dentífricas ao saírem da embalagem, aquando da aplicação na escova, adquirem uma forma cilíndrica com diâmetro aproximadamente igual a 1 cm, 2 cm de

pasta correspondem a um volume de 1,5 mL a aplicar em cães pequenos, enquanto 5 cm de pasta correspondem a 4 mL a aplicar em cães grandes. Considerando o valor de 1 mg/mL, obtido de acordo com os resultados dos halos de inibição bacteriana, a escovagem dos dentes de um cão de pequeno porte com um volume de pasta dentífrica de 1,5 mL corresponde à administração de 1,5 mg de nisina. Num animal com mais de 2 Kg p.v., esta dose corresponde a uma dose inferior a 0,75 mg/Kg p.v. inferior à DDA estabelecida para o homem. Caso se trate de um animal de uma raça de grande porte, um volume de pasta dentífrica de 4 mL corresponde à administração de 4 mg de nisina, o que equivale a 0,1 mg/Kg p.v. caso se trate de um animal com 40 Kg p.v. Mais uma vez, esta dose é inferior à recomendada pela WHO como DDA.

No caso do gel de goma de guar, e considerando a aplicação de volumes semelhantes, para um cão de pequeno porte a aplicação de 1,5 mL de gel de goma de guar suplementado com 1 mg/mL de nisina (valor obtido para a CMI) corresponde também a 1,5 mg de nisina, 0,75 mg/Kg p.v. para um cão de 2 Kg p.v. Para um cão de 40 Kg p.v., a aplicação de 4 mL de gel suplementado com 1 mg/mL de nisina corresponde a apenas 0,1 mg/Kg p.v., doses sempre inferiores à DDA.

Se esta avaliação fosse realizada tendo por base os valores da CMB, os valores permaneceriam abaixo da DDA quer para animais de pequeno porte (1,8 mg/Kg p.v. para um animal de 2 Kg p.v.), quer para animais de grande porte (0,25mg/Kg p.v. para um animal de 40 Kg p.v.).

É ainda importante referir que o fator de segurança envolvido na utilização da nisina para tratamento da DP em cães ainda é maior se se considerar que a determinação da DDA estabelecida pela WHO tem por base ensaios realizados com nisina a 7,5% m/m, uma proporção diferente da apresentação comercial utilizada neste estudo, que é de 2,5% m/m. Esta diferença contribui para o aumento da margem de segurança.

Com a finalidade de reduzir as variações interespecíficas seria útil que fosse determinada a DDA para a espécie canina, para que a dose estabelecida pudesse ser mais adequada a cães.

4.6 Limitações do estudo

Apesar dos resultados promissores obtidos neste estudo, é importante referir que este apresenta algumas limitações.

No ensaio realizado com a pasta dentífrica, a sua densidade ótica e cor branca opaca tornam impeditiva a realização de um ensaio em microplacas, pois não seria possível observar a

presença de crescimento bacteriano num meio tão opaco, sendo esta observação visual essencial para a determinação da CMI.

No caso da determinação da CMI e CMB para o gel de goma de guar suplementado com nisina, a viscosidade deste gel dificultou a sua pipetagem e a homogeneização das soluções quer antes da leitura da CMI, quer aquando da realização da CMB.

Em ambas as formulações mostrou-se impossível obter uma concentração de nisina superior a 40 mg/mL, uma vez que concentrações superiores revelaram-se instáveis, sobressaturadas, não ocorrendo dissolução da nisina em pó no solvente HCl.

4.7 Perspetivas futuras

A placa bacteriana que adere à superfície dos dentes e que provoca uma resposta inflamatória no organismo que desencadeia o início da DP é constituída por um variado leque de microorganismos, desde gram positivos aeróbios a gram negativos anaeróbios. Assim é necessário avaliar a eficácia das formulações de nisina em pasta dentífrica e em gel de goma de guar face aos microorganismos mais prevalentes na DP.

Considerando o potencial de inibição bacteriana dos PAM e a sua contribuição para a diminuição da disseminação de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais, seria benéfico criar uma base de dados representativa dos valores de CMI e de diâmetros de halos de inibição de multiplicação bacteriana para estes compostos, tal como se encontra disponível para os antibióticos.

A definição de limites de suscetibilidade, também denominados de critérios interpretativos, é o que permite avaliar se determinado isolado é suscetível ou não a um determinado composto antimicrobiano. A definição destes limites depende da obtenção dos valores da CMI ou do diâmetro de halos de inibição para as estirpes tipo de cada género bacteriano e comparação com estirpes que tenham adquirido mecanismos de resistência. Para o estabelecimento de valores representativos são necessários inúmeros ensaios *in vitro* (CLSI, 2016; EUCAST, 2017). O EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) e o CLSI são organizações que procuram estabelecer regras para uniformizar e padronizar o trabalho laboratorial. São também estas organizações que estabelecem os limites de suscetibilidade e avaliam os perfis de resistência bacteriana, com base num grande volume de dados. Estes organismos deveriam também estudar os PAM de modo a estabelecer limites de suscetibilidade, à semelhança dos disponíveis para os antibióticos, na tentativa de estabelecer doses terapêuticas e prevenir que situações como a disseminação da resistência aos antibióticos possa também ocorrer relativamente aos PAM.

De acordo com Tavares, 2014, das 46 estirpes de *Enterococcus* spp. que constituíram a base deste estudo, a maioria apresenta capacidade elevada de produção de biofilme (anexo 8), um fator de virulência muito relevante (Tavares, 2014). Os biofilmes são estruturas complexas resultantes da aderência de microrganismos planctônicos a superfícies. São constituídos por comunidades polimicrobianas interativas inseridas numa matriz extracelular produzida pela própria comunidade, composta por substâncias como proteínas, polissacáridos e ácidos nucleicos extracelulares (Dickschat, 2010). Dada a estrutura organizacional do biofilme, os microrganismos que o constituem são menos suscetíveis à ação de compostos antimicrobianos e do sistema imunitário do hospedeiro (Stewart & Costerton, 2001; Santos, 2016). Os biofilmes encontram-se ainda associados ao estabelecimento de infecções crônicas, incluindo a periodontite (Stewart & Costerton, 2001).

Assim, seria útil realizar ensaios destinados a avaliar o potencial inibitório da nisina incorporada quer no gel de goma de guar, quer na pasta dentífrica, face a biofilmes bacterianos estabelecidos por *Enterococcus* spp. A determinação de parâmetros como a CMIB e CMEB, concentração mínima inibitória de biofilme e concentração mínima de erradicação de biofilme, respetivamente, é certamente um passo muito importante para a avaliação da eficácia destas combinações e da sua potencial aplicação na prevenção do estabelecimento de placa bacteriana oral.

Para garantir que a eficácia demonstrada neste estudo se mantém nas condições ambientais da cavidade oral do cão serão necessários ensaios de eficácia, quer da combinação de pasta dentífrica suplementada com nisina, quer da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina. Neste ambiente as formulações estarão sujeitas a uma composição eletrolítica específica, constituída principalmente por iões de sódio e cloro, mas também bicarbonato e fosfato, variadas enzimas como lisozimas, amílase e lípase lingual em animais jovens. Além disso, os valores de pH, de neutros a ligeiramente básicos, e a temperatura da cavidade oral poderão ser responsáveis por diferenças na capacidade inibitória destas formulações (Junqueira & Carneiro, 1995; Herdt, 2008).

Outros ensaios serão também necessários para esclarecer a possibilidade de utilização de nisina na prevenção e tratamento da DP, nomeadamente ensaios de toxicidade em culturas de células, ensaios de viabilidade das combinações de pasta dentífrica e gel de goma de guar com nisina em diferentes condições e períodos de armazenamento e numa fase posterior ensaios *in vivo*, em cães.

5. Conclusões

O PAM nisina apresenta eficácia comprovada na inibição de microrganismos, incluindo de bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* spp. A sua administração requer, no entanto, um veículo de administração que não altere as suas propriedades, que seja fácil de aplicar, que não seja rejeitado pelo animal e que seja economicamente viável. Apesar de ainda serem necessários mais ensaios, tanto a pasta dentífrica C.E.T.® como o gel de goma de guar apresentam o potencial para serem considerados como veículos adaptados para administração tópica de nisina, uma vez que não alteram a capacidade inibitória deste péptido. Tanto os valores da CMI e da CMB obtidos para o gel de goma de guar suplementado com nisina, como os valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos no ensaio para a pasta dentífrica suplementada com nisina, mostraram que a dose eficaz a administrar é inferior ao valor da DDA para humanos estabelecido pela WHO em 2013, quer para cães de pequeno porte quer para cães de grande porte. Assim, a nisina revela-se um PAM eficaz, com grande potencial para ser utilizado, na prevenção e tratamento da DP em cães.

Bibliografia

- Aarestrup, F. M. Butaye, P. & Witte, W. (2002). Nonhuman reservoirs of enterococci. M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvailn, P. M. Dunny, B. E. Murray, L. B. Rice (Eds.) *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* (pp. 55-101). Washington, DC: ASM Press.
- Abts, A. Mavaro, A. Stindt, J. Bakkes, P. Metzger, S. Driessen, A. Smits, S. & Schmitt, L. (2011). Easy and rapid purification of highly active nisin. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2011, ID 175145.
- Albuquerque, C. Morinha, F. Requicha, J. Martins, T. Dias, I. Guedes-Pinto, H. Bastos, E. & Viegas, C. (2012). Canine periodontitis: The dog as na importante model foi periodontal studies. *The Veterinary Journal*, 191, 299-305.
- American veterinary dental college (1988). Periodontal disease. Acedido em Mar. 3, 2017, em <http://www.avdc.org/periodontaldisease.html>.
- Baltzer, S. A. & Brown, M. H. (2011). Antimicrobial Peptides: Promising Alternatives to Conventional Antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 228–235.
- Bellows, J. (2004). *Small Animal Dental Equipment, Materials and Techniques: A Primer*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Bernbom, N. Licht, T. Brogren, C. Jelle, B. Johansen, A. Badiola, I. Vogensen, F. & Norrung, B. (2006). *Applied and Envoromental Microbiology*, 239-244.
- Boohaker, R. Lee, M. Vishnubhotla, P. Perez, J. & Khaled, A. (2012). The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. *Current Medicinal Chemistry*, 19 (22), 3794-3804.
- Braga, C. Resende, C. Pestana, A. Carmo, L. Costa, J. Silva, L. Assis, L. Lima, L. Farias, L. Carvalho, M. (2005). Isolate and identify of periodontal microbiota of German Shepherd dogs. *Ciência Rual*, 35 (2), 385-390.
- Breukink, E. Heusden, H. Vollmerhaus, P. Swiezewska, E. Brunner, L. Walker, S. Heck, A. & Kruijff, B. (2003). Lipid II is na intrinsic componente of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19898-19903.
- Buchanan, J. W. (1999). Prevalence of cardiovascular disorders. In P. R. Fox, D. D. Sisson & M. S. Moïse (Eds.). *Textbook of canine and feline cardiology* (2nd Ed.) (pp. 457-470). Philadelphia, WB Saunders.
- Buzalaf, M. A. Pessan, J.P. Honório, H. M. & Cate, J. M. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monographs in Oral Science*, 22, 97-114
- Carreira, L. M. Dias, D. & Azevedo, P. (2015). Relationship between gender, age and weight and the serum ionized calcium variations in dogs periodontal disease evolution. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30, 51–56.

- Carreira, L. M. Dias, D. & Azevedo, P. (2015). Serum ionized calcium quantification for staging canine periodontal disease: a preliminary study. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30, 48–50.
- Cavaguchi, D. Pincelli, V. Bochio, M. Ribeiro, R. Bracarense, A. & Pereira, P. (2010). Aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos da endocardite bacteriana em cães: 28 casos (2003-2008). *Ciências Agrárias*, Londrina, 31(1), 183-190.
- Cheigh, C. & Pyun, Y. (2005). Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnology Letters*, 27, 1641–1648.
- Chung, Y. S. Kwon, K. H. Shin, S. Kim, J. H. Park, Y. H. & Yoon, J. W. (2013). Characterization of veterinary hospital-associated isolates of enterococcus species in Korea. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 24(3), 386-393.
- Cleveland, J. Montville, T. Nes, I. & Chikindas, M (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.
- Clewell, D. B. Dunny, G. M. (2002). Conjugation and Genetic Exchange in Enterococci. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray & L. B. Rice (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* (pp. 265-300). Washington, DC: ASM Press.
- CLSI (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard. (9th Ed.). Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2016). Standards Development. Acedido em maio 29, 2017, em <http://clsi.org/standards/micro/>
- Coque, T. M. Freitas, A. R. Novais, C. Peixe, L. & Baquero, F. (2012) Mobile genetic elements and lateral genetic transfer in enterococci. In T. Semedo-Lemsaddek, M. T. Barreto-Crespo & R. Tenreiro (Eds.) *Enterococcus and safety* (pp. 59-100). New York: Nova Science Publishers, inc.
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42(1), 25-34.
- Coyette, J. & Hancock, L. E. (2002). Enterococcal cell wall. In M. S. Gilmore (Ed.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance* (pp. 177-218). Washington, D. C.: ASM Press.
- Cunha, E. Trovão, T. Santos, R. Santos, J. D. Moreira da silva, J. São Braz, B. Veiga, A. S. Tavares, L. & Oliveira, M. (2017). Canine periodontal disease and its systemic implications. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 113, 601-60.
- Davis, I. Wallis, C. Deusch, O. Colyer, A. Milella, L. Loman, N. Harris, S. (2013). A cross-sectional survey of bacterial species in plaque from cliente owned dogs with healthy gingiva, gingivitis or mild periodontitis. *Plos One*. 8(12).

- Dewhirst, F. Klein, E. Thompson, E. Blaton, J. Chen, T. Milella, L. Buckley, C. Davis, I. Bennett, M. Marshall-Jones, Z. (2012). The canine oral microbiome. *Plos One*, 7(4).
- Dickschat, J. S. (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. *Natural Products Reports* 27(3), 343–369.
- Dosler, S. & Gerceker, A. (2012). In vitro activities of antimicrobial cationic peptides; melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram-positive bacteria. *Journal of chemotherapy*, 24(3), 137-143.
- Draper, L. Cotter, P. Hill, C. & Ross, R. (2015). Lantibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(2), 171-184.
- EFSA (2016). Acceptable Daily Intakes (ADIs) Q&A. Acedido em maio, 26, 2017, em <http://www.efic.org/en/understanding-science/article/qas-on-acceptable-daily-intakes-adis>
- EUCAST (2017). Clinical Breakpoints. Acedido em maio 29, 2017, em http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Farrow, J. A. E. D. Jones, B. A. Phillips, & M. D. Collins. 1983. Taxonomic studies on some group D streptococci. *Journal of General Microbiology*. 129, 1423-1432.
- Ferreira, F. Rabang, H. Pinheiro, E. Gadê-Neto, C. Zaia, A. Ferraz, C. Souza-Filho, F. & Gomes, B. (2006). Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two diferente methods. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 102(4), 564-570.
- Field, D. Cotter, P. D. Ross, R. P. & Hill, C. (2015). Bioengineering of the model lantibiotic nisin. *Bioengineered*. 6(4), 187-192.
- Fisher, K. & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155, 1749-1757.
- Frazer, A. C. Sharratt, M. & Hickman, J. R. (1962). The biological effects of food additives. I.—Nisin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 13, 32–42
- French, G. L. (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections - the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58, 1107–1117.
- Gharsallaoui, A. Oulahal, N. Joly, C & Degraeve, P (2015). Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses, *Critical review in food science and nutrition*, 56(8), 1262-1274.
- Gilmore, M. S. Clewell, D. B. Ike, Y. & Shanka N. (Eds.) (2014). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Glickman, L. T. Glickman, N. W. Moore, G. E. Lund, E. M. Lantz, G. C. & Pressler, B. M. (2011). Association between chronic azotemic kidney disease and severity of periodontal disease in dogs. *Preventive Veterinary Medicine*, 99, 193-200.

- Gu, X. Li, Y. Guo, J. Zhang, L. Li, D. & Gai, X. (2014). Effect of low intensity pulsed ultrasound on repairing the periodontal bone of beagle canines. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 325-328.
- Harvey, C. Serfilippi, L. & Barnvos, D. (2015). Effect of Frequency of Brushing Teeth on Plaque and Calculus Accumulation, and Gingivitis in Dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, 32(1), 16-21
- Herd, T. H. (2008). Secreções do trato gastrointestinal. In J. G. Cunningham & B. G. Klein (Eds), *Tratado de fisiologia veterinária* (4º Ed). (pp. 332-334). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Hoffmann, T. & Gaengler, P. (1996). Epidemiology of periodontal disease in poodles. *Journal of Small Animal Practice*, 37, 309-316.
- Hoskins, J. (2004). The oral cavity and dental disease. In J. Hoskins, *Geriatrics and gerontology of the dog and cat*. (pp. 149-162). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Howell, T. Fiorellini, J. Blackburn, P. Projan, S. de la Harpe, J. & Williams, R. (1993). The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *Journal of clinical Periodontology*, 20, 335-339.
- Huycke, M. M. & Hancock, L. E. (2012). Enterococcal physiology and cell wall structure and dynamics. In T. Semedo-Lemsaddek, M. T. Barreto-Crespo & R. Tenreiro (Eds.). *Enterococcus and safety* (pp. 21-57). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Ito, H. (2006). Infective endocarditis and dental procedures: evidence, pathogenesis, and prevention. *Journal of Medical Investigation*, 53, 189-198.
- Johnson, I. Hayday, H. & Colman, G. (1978). The effects os nisin on the microbial flora of the dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Applied Bacteriology*, 45, 99-109.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (1995). *Histologia Básica* (11ª Ed). Rio de Guanabara: Koogan S.A.
- Kilpper-Balz, R., G. Fischer, and K. H. Schleifer. 1982. Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Current Microbiology* 7, 245-250.
- Kim, S. Kim, S. Jeong, M. Lee, Y. Ahn, T. Park, W. Ahn, S. Lee, E. Ryu, Y. Seo, K. (2013). Experimental determination of a subantimicrobial dosage of doxycycline hyclate for treatment of periodontitis in Beagles. *American Journal of Veterinary Research*, 74 (1), 130-135.
- Kortegaard, H. Eriksen, T. & Baelum, V. (2008). Periodontal disease in research beagle dogs – an epidemiological study. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 610–616.
- Kortegaard, H. Eriksen, T. & Baelum, V. (2014). Screening for periodontal disease in research dogs – a methodology stugy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57 (77).

- Kramer, N. E. Smid, E. J. Kok, J. Kruijff, B. Kuipers, O. P. & Breukink, E (2004). Resistance of gram-positive bacteria to nisin is not determined by lipid II levels. *FEMS Microbiology Letters*, 239, 157-161.
- Lee, K. & Mooney, D. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37 (1), 106-126.
- Leite-Martins, L. Meireles, D. Bessa, L. J. Mendes, A. Matos, A. J. & Costa, P. M. (2014). Spread of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* within the household setting. *Microbial Drug Resistance*, 20, (5), 501-507.
- Lemsaddek, A. & Tenreiro, R. (2012). Diversity and ecological niches. In T. Semedo-Lemsaddek, M. T. Barreto-Crespo & R. Tenreiro (Eds.). *Enterococcus and safety* (pp. 5-19). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Leuchtefeld, L. (2011). Update: Pfizer Discontinues Periodontitis Vaccine. Acedido em abr. 2, 2017, disponível em: <http://www.veterinarypracticenews.com/April-2011/Update-Pfizer-Discontinues-Periodontitis-Vaccine/>.
- Levinson, M. & Levinson, J. (2009). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23, 791-815.
- Liu, Z. Brady, A. Young, A. Rasimick, B. Chen, K. Zhou, C. & Kallenbach, N. R. (2007). Length effects in antimicrobial peptides of the (RW)_n series. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 597-603.
- Lobprise, H. (2006). Canine periodontal disease overview. *Veterinary Technician*, 27, 168-173.
- Lockhart, P. B. Brennan, M. T. Thornhill, M. Michalowicz, B. S. Noll, J. Bahrani-Mougeot, F. & Sasser, H. C. (2009). Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *Journal of American Dental Association*, 140(10), 1238-1244.
- Lund, E, M. Armstrong, P, J. Kirk, C, A. Kolar, L, M. Klausner, J, S. (1999). Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(9), 1336-41.
- MacCallum, W.G. & Hastings, T. W. (1899). A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. *Journal of Experimental Medicine.*, 4, 521-534.
- Maresca, D. De Prisco, A. La Storia, A. Cirillo, T. Esposito, F. Mauriello, G. (2016). Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT – Food Science and Technology*, 66, 436-443.
- Marshall, M. Wallis, C. Milella, L. Colyer, A. Tweedie, A. & Harris, S. (2014). A longitudinal assessment of periodontal disease in 52 miniature schnauzers. *BMC Veterinary Research*, 10:166.
- Mendoza, J. A. (1998). A study of the rheological properties of some of the gels commonly used in the pharmaceutical, food and cosmetic industries and their influence on

microbial growth. Master theses in Master of Science in Pharmaceutics – University of Rhode Island.

- Miller, M. W. Fox, P. R. Sauders, A. B. (2004). Pathologic and clinical features of infectious endocarditis. *Journal of Veterinary Cardiology*, Amsterdam, 6 (2), 35-45.
- Mohr, J. F. Friedrich, L. V. Yankelev, S. & Lamp, K. C. (2009). Daptomycin for the treatment of enterococcal bacteraemia: results from the Cubicin® Outcomes Registry and Experience. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 543–548.
- Mundt, J. O. (1986). Enterococci. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. (2^a edição). (pp.1063-1065). Baltimore: Waverly Press, Inc.
- Murdoch, D. R. Corey, G. R. Hoen, B. Miró, J. M. Fowler, V. G. & Bayer, A. S. (2009). Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *JAMA Internal Medicine*. 169(5), 463–473.
- Navarre W. W. Daefler S. & Schneewind O. (1996). Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 178(2), 441–446.
- Neetoo, H. Ye, M. & Chen, H. (2007). Effectiveness and stability of plastic films with nisin for inhibition of *Listeria Monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 70 (5), 1267-1271.
- Niemiec, B. (2008a). Periodontal disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(2), 72-80.
- Niemiec, B. (2008b). Periodontal treatment. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(2), 81-90.
- Nordmann, P. Naas, T. Fortineau, N. & Poirel, L (2007) Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Current Opinion on Microbiology*, 10(5), 436-40.
- O'Driscoll, N. H. Labovitiadi, O. Cushnie, T. T. Matthews, K. H. Mercer, D. K. & Lamb, A. J. (2013). Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application. *Current Microbiology* 66(3), 271–278.
- Oliveira, M. Tavares, M. Gomes, D. Touret, T. Braz, B. S. Tavares, L. Semedo-Lemsaddek, T. (2016). Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 46, 27–31.
- Pavlica, Z. Petelin, M. Juntos, P. Erzen, D. Crossley, D. & Skaleric, U. (2008). Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, 25 (2), 97-105.
- Pedde, G. Drobatz, K. Harvey, C. Adams, A. & Sleeper, M. (2009). Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial

- endocarditis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234 (1), 100-107.
- Penman, S. & Harvey, C. (1992). Periodontal Disease. In Harvey, C. E. & Orr, H. S. (Eds.) *Manual of Small Animal Dentistry* (pp. 37-48). Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association.
- Penman, S. (1992). Oral-dental anatomy, function and eruption. In Harvey, C. E. & Orr, H. S. (Eds.) *Manual of Small Animal Dentistry* (pp. 11-18). Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association.
- Pietersen, R. & Todoroc, S. (2010). Bacteriocins – exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 542-562
- Pinheiro, A. S. C. V. V. (2016). Infective endocarditis due to periodontal disease in dogs: the potencial of nisin as a new preventive approach. Tese de Mestrado em Microbiologia. Lisboa. Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa.
- Plumb, D. C. (Ed.) (2011). *Plumbs's Veterinary Drug Handbook* (7th ed.). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Poha, C. H. Oha, H. M. L. Tan, A. L. (2006). Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *Journal of Infection* 52, 383–386.
- Raghavender, R. (2015). Bone loss and patterns of bone destruction. Acedido em maio 15, 2017, em <https://pt.slideshare.net/rahulraghavender31/bone-loss-and-patterns-of-bone-destruction-55680561>
- Reddy, K. Mohan, G. K. Satla, S. & Gaikwad, S. (2011). Natural polysaccharides: versatile, excipients for controlled drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (6), 275-286.
- Requicha, J. Viegas, C. Muñoz, F. Azevedo, J. Leonor, I. Reis, R. Causa, H. & Gomes, M. (2014). Tissue engineering approach for periodontal regeneration based on a biodegradable double layer scaffold and adipose-driven stem cells. *Tissue engineering*, 20(17), 2483-2492.
- Reunanen, J. & Saris, P. E. J. (2009). Survival of nisin activity in intestinal enviroment. *Biotechnology Letters*, 31, 1229-132.
- Rice, L. B. (2006). Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119 (6A), 11–19.
- Rogers, L. A. & Whittier, E. O. (1928). Limiting factors in the lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 16, 211–229.
- Rosenfeld, Y. Papo, N. & Shai, Y. (2006). Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides: Peptide properties and plausible modes of action. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 1636–1643.

- Sahl, H. G. & Bierbaum, G. (2008). Multiple activities in natural antimicrobials: Multiple activities of natural agents such as defensins and bacteriocins suggest a change in strategy when developing new antimicrobials. *Microbe*, 3 (10), 467-473.
- Santin, R. Mattei, A. Waller, S. Madrid, I. Cleff, M. Xavier, M. Nobre, M. Nascente, P. Mello, J. & Meireles, J. (2013). Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (1), 139-143.
- Santos, R. Gomes, D. Macedo, H. Barros, D. Tibério, C. Veiga, A. S. Tavares, L. Castanho, M. & Oliveira, M. (2016). Guar gum as a new antimicrobial peptide delivery system against diabetic foot ulcers *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 65(10), 1092-1099.
- Schleifer K. H., Kilpper-Balz R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 3 4(1), 31–34.
- Schleifer K. H., Kilpper-Bälz R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology*.10(1), 1–19.
- Schleifer, K. H. Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*. 36(4), 407–477.
- Sears, P. Smith, B. Stewart, W. Gonzalez, R. Rubino, S. Gusik, S. Kulisek, E. Projan, S. & Blackburn, P. (1992). Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 3185-3190.
- Semedo, T., Santos, M., Martins, P., Lopes, M., Marques, J., Tenreiro, R., & Crespo, M. (2003b). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569-2576.
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F., Marques, J.F., Crespo, M.T. & Tenreiro R. (2003a). Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 13-22.
- Semedo-Lemsaddek, T. Tavares, M. Braz, B. S. Tavares, L. & Oliveira, M. (2016). Enterococcal infective endocarditis following periodontal disease in dogs. *Plos One*, 11 (1).
- Shin, J. M. Gwak, J. W. Kamarajan, P. Fenno, J. C. Rickard, A. H. & Kapila, Y. L. (2015). Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 1449-1465.
- Sisson, D. D. (1994). Bacterial endocarditis. In Proceedings of the 18th Annual Kal Kan/OSU Symposium, 2, 79-87.
- Soukup, J (2010). Periodontitis. In Ettlinger, S. & Feldman, E. (Eds.) *Textbook of veterinary internal medicine*. (7^a Ed). (179-184). Missouri: Saunders Elsevier.

- Stepanaiuk, K. & Gingerich, W. (2015). Evaluation of na osseous allografts membrane for guided tissue regeneration in dog. *Journal of Veterinary Dentistry*, 32 (4), 226-232.
- Stempel, N. Strehmel, J. & Overhage, J. (2015). Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 67–84.
- Sun, J. Zhu, H. Guo, J. & Xiao, D (2012). The bacteriostasis study of nisin for the raspberry health draft beer. *Physics Procedia*, 25, 973–977.
- Tavares, M. M. P. (2014). Caracterização de *Enterococcus* spp. isolados da boca e do coração de cães com doença periodontal. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Thiercelin M. E., Jouhaud L. (1899) Sur un diplococque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *Royal Society of Biology*, 5, 269–271.
- Thombare, N. Jha, U. Mishra, S. & Siddiqui, M. Z. (2016). Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 361-372.
- Tong, Z. Dong, L. Zhou, L. Tao, R. & Ni, L. (2010). Nisin inhibits dental caries-associated microorganism *in vitro*. *Peptides*, 31, 2003-2008.
- Verstraete, F. J. M. (Ed.). (1999). *Self-assessment colour review of veterinary destinsty*. London: Manson Publishing.
- Veterinary Transplant Services, INC (2014). Case studies – dental. Acedido em abr. 24, 2017, disponível em <https://vtsonline.com/category/case-studies-dental/>
- Wallis, C. Marshall, M. Colyer, A. O’Flynn, C. Deusch, O. & Harris, S. (2015). A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs. *Veterinary Microbiology*, 181, 271-282.
- Werner, G. (2012). Surveillance of antimicrobial resistance among *enterococcus faecium* and *enterococcus faecalis* isolated from human (clinical/comensal), food animal, meat and enviromental samples. In T. Semedo-Lemsaddek, M. T. Barreto-Crespo & R. Tenreiro (Eds.). *Enterococcus and safety* (pp. 155-197). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Werner, G. Strommenger, B. & Witte, W. (2008). Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiology*, 3(5), 547-562.
- WHO (2013). Evaluation of certain food additives and contaminants: Seventy-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*. 983, 25-29.
- Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3(2), 163–175.

- Wiggs, R. B. & Lobprise, H. B. (1997). *Veterinary Dentistry: Principles and Practice*. New Jersey: Lippincott-Raven
- Willey, J. M. Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2008). *Precott, Harley, and Klein's Microbiology*. (7th ed.). New York: McGraw-Hill companies, Inc.
- Yadav, P. Chaudhary, S. Saxena, R. K. Talwar, S. Yadav, S (2017). Evaluation of Antimicrobial and antifungal efficacy of chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(3), 361-367.
- Zendo, T. Yoneyama. F & Sonomoto, K. (2010). Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Applied Microbiology Biotechnology*, 88, 1–9.

Anexos

Anexo 1: Diâmetros dos halos de inibição de multiplicação bacteriana obtidos no ensaio para a solução pasta dentífrica suplementada com nisina (mm).

Código dos isolados	Concentrações de nisina incorporadas na pasta dentífrica											
	13 mg	10mg	7 mg	4 mg	3 mg	2 mg	1 mg	0,5 mg	0,2 mg	0,1 mg	0,05 mg	Pasta
EZ 1	14,67	14,00	13,33	12,80	12,33	11,33	11,75	11,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 2	14,00	12,67	13,00	13,33	13,00	12,00	12,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 3	15,00	14,67	13,67	13,33	13,33	12,00	12,67	11,67	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 4	14,00	13,67	13,67	13,00	13,33	12,00	12,00	11,33	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 5	14,67	15,00	14,00	13,33	14,00	12,67	12,33	11,67	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 6	14,67	14,33	13,67	13,00	13,00	12,00	11,75	11,75	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 7	14,50	13,50	13,00	12,67	12,00	11,50	12,00	11,50	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 8	15,33	14,67	14,33	13,33	13,67	12,00	12,33	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 9	14,67	14,33	13,00	12,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 10	16,33	15,33	14,67	16,00	14,00	13,33	14,67	14,33	13,00	0,00	0,00	0,00
EZ 11	16,33	14,67	13,00	12,33	12,00	11,33	10,67	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 12	16,33	14,67	13,00	13,00	12,33	11,67	12,33	11,00	10,00	0,00	0,00	0,00
EZ 13	14,20	13,80	12,50	12,40	12,33	11,50	11,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 14	14,33	14,00	13,00	12,50	12,67	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 15	15,00	14,33	14,00	13,00	13,50	12,00	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 16	15,00	14,50	14,00	13,00	13,00	12,00	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 17	16,33	15,33	14,67	13,33	14,00	13,67	12,67	13,50	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 18	15,00	14,33	14,00	12,75	13,00	12,00	12,33	12,50	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 21	14,33	13,67	13,33	13,00	12,67	12,00	12,00	11,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 22	14,67	14,00	13,00	13,00	12,67	11,33	12,00	11,33	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 23	15,33	14,67	14,33	14,00	14,00	13,00	12,33	11,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 24	14,50	13,75	13,67	13,00	13,33	12,00	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 25	14,25	13,75	14,00	13,67	13,00	13,50	12,67	12,33	13,00	13,00	12,67	14,00
EZ 26	14,50	14,00	13,50	12,67	13,50	14,00	12,33	11,33	11,50	12,50	12,00	15,00
EZ 27	14,67	14,67	14,00	13,00	14,00	13,33	12,75	12,50	12,25	11,33	12,00	13,50
EZ 28	15,33	14,33	14,33	13,50	15,00	15,67	13,00	12,25	12,75	12,25	13,00	15,00
EZ 29	14,33	13,33	13,33	13,67	12,67	12,33	13,00	11,67	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 30	14,33	14,00	13,00	12,67	12,67	11,67	12,00	11,67	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 31	14,00	14,00	13,67	12,67	12,67	12,00	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 32	15,00	14,33	13,33	13,33	13,33	12,33	12,67	11,67	11,50	0,00	0,00	0,00
EZ 33	14,00	13,67	13,00	12,67	12,33	11,67	11,67	11,67	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 34	14,00	13,33	13,00	13,50	12,67	12,00	13,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 35	14,00	13,33	12,50	12,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 36	14,00	13,50	13,00	12,00	12,00	12,00	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 37	13,67	13,00	12,67	12,67	12,00	11,67	12,00	11,50	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 38	14,33	13,67	13,00	13,33	12,33	11,67	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 39	14,00	13,33	12,67	12,67	12,67	12,00	12,00	11,50	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 41	14,33	13,67	13,33	12,67	13,00	12,00	12,33	11,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 42	14,33	13,67	13,00	13,25	12,67	11,67	12,00	11,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 43	13,67	13,33	12,33	12,33	12,33	12,00	12,00	11,67	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 44	14,00	13,33	12,33	12,67	12,33	11,33	12,00	11,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 45	13,33	13,00	12,33	12,00	12,33	11,00	11,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EZ 46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Anexo 2: CMI para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (mg/mL).

Código dos isolados	Ensaio realizado para determinação da CMI												Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
EZ 1	1	1	1	1	0,5	0,5			1	1	0,5	1	0,85
EZ 2	1	1	1,5	1	0,5	1			1	1	0,5	0,5	0,90
EZ 3	1	1	1,5	1,5	1	1			0,5	1			1,06
EZ 4	1	0,5	1	1	1	1					0,5	0,5	0,81
EZ 5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5					0,69
EZ 6	1	1	1	1,5	0,5	1	0,5	0,5					0,88
EZ 7	1	1,5	1	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1			0,90
EZ 8	1	1,5	1,5	1,5	0,5	1	1	1					1,13
EZ 9	1,5	1,5	1	1	1,5	1,5			1	1,5			1,31
EZ 10	1	1	0,5	0,5	1	1					0,5	1	0,81
EZ 11	0,5	1	1	1	0,5	1,5			0,5	0,5	0,5	0,5	0,75
EZ 12	0,5	0,5			1	1			0,5	0,5			0,67
EZ 13	1,5	1	1	1	1,5	1							1,17
EZ 14	1	1	1	1	1	1							1,00
EZ 15	1	1,5	1	1	0,5	0,5							0,92
EZ 16	1	1	1	1	1	1							1,00
EZ 17	1	1	0,5	1	1	1			0,5	1			0,88
EZ 18	1	1	1	1	1	1							1,00
EZ 19	1	1	0,5	0,5	1	1			1	1			0,88
EZ 20	1	1	1	1	1	1							1,00
EZ 21	1	1,5	1	0,5	1	1			1	1			1,00
EZ 22	1,5	1,5	1	1,5	1	1,5							1,33
EZ 23	1	1	0,5	0,5	1	1			0,5	1			0,81
EZ 24	1	1,5	0,5	1	1	1			1	1			1,00
EZ 25	1,5	1,5	1,5	1	1	1					1	1	1,19
EZ 26	1	1	1	1	1	1,5							1,08
EZ 27	1,5	1,5	1	1,5	1	1							1,25
EZ 28	1,5	1,5	1,5	1,5	1	1					1	1	1,25
EZ 29	0,5	0,5	1	1	1	1,5	1	1	1	1			0,95
EZ 30	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	1	0,71
EZ 31	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5			0,65
EZ 32	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5					0,63
EZ 33	1	0,5	1,5	1	0,5	1							0,92
EZ 34	1	1	1,5	1,5	1	1							1,17
EZ 35	1	1	1	1	1	1							1,00
EZ 36	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1,00
EZ 37	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5			1	1	0,5	0,5	0,65
EZ 38	0,5	0,5	1	1	0,5	1			1	1	1	0,5	0,80
EZ 39	1	1	1	1	0,5	1			1	1			0,94
EZ 40	1	1	0,5	1	0,5	0,5					1	0,5	0,75
EZ 41	1	1	1	1	1	1			1	1			1,00
EZ 42	1	1	1	1	0,5	1							0,92
EZ 43	1	1	1	1,5	1	1							1,08
EZ 44	1,5	1,5	1	1,5	1	1							1,25
EZ 45	1	1	1	1	1	1,5							1,08
EZ 46	1	1	1	1	1,5	1,5							1,17

Anexo 3: CMI obtida para a nisina (mg/mL) (Pinheiro, 2016).

Código dos isolados	Ensaio realizado para determinação da CMI																							Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
EZ 1	0,5	0,5	0,5	0,2	1,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5										0,51
EZ 2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1									0,63
EZ 3	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5													0,49
EZ 4	1	1	1	0,2	0,5	0,2	1	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1									0,49
EZ 5	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2				0,59
EZ 6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,63
EZ 7	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	1	1	1	1	1										0,89
EZ 8	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1									0,70
EZ 9	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	1	1										0,86
EZ 10	1	1	1	1	1	1,5	0,5	0,5	1	1,5	1	1	1,5	1,5										1,07
EZ 11	0,1	0,05	0,1	0,2	0,5	0,2	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1												0,25
EZ 12	0,2	0,2	0,05	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	0,05	0,05											0,25
EZ 13	1	1	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1							0,71
EZ 14	0,5	1	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5					0,61
EZ 15	0,5	0,2	0,2	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1,5	1	0,2	0,2	0,2					0,61
EZ 16	1	1	1	1,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5										1,00
EZ 17	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1									0,77
EZ 18	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5						0,61
EZ 19	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5														0,32
EZ 20	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5					0,48
EZ 21	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5														0,50
EZ 22	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1													0,64
EZ 23	0,2	0,05	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5											0,26
EZ 24	0,1	0,05	0,05	0,5	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5												0,32
EZ 25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5										0,50
EZ 26	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5										0,50
EZ 27	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5												0,54
EZ 28	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5												0,50
EZ 29	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5									0,50
EZ 30	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5											0,50
EZ 31	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5									0,50
EZ 32	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5								0,50
EZ 33	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5												0,55
EZ 34	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	0,5					0,71
EZ 35	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5									0,42
EZ 36	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5											0,34
EZ 37	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1											0,54
EZ 38	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5										0,50
EZ 39	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5											0,50
EZ 40	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5										0,50
EZ 41	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5												0,50
EZ 42	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,48
EZ 43	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	1	1	0,5	0,5	0,5									0,70
EZ 44	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2		0,65
EZ 45	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5										0,65
EZ 46	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1								0,56

Anexo 4: Comparação com os valores da CMI (mg/mL) obtidos para a nisina e para o gel de goma de guar suplementado com nisina.

Código dos isolados	Nisina e gel de goma de guar	Nisina	Diferença	Diferença %
EZ 1	0,85	0,51	0,34	67,61%
EZ 2	0,90	0,63	0,27	42,11%
EZ 3	1,06	0,49	0,57	116,44%
EZ 4	0,81	0,49	0,32	64,70%
EZ 5	0,69	0,59	0,10	16,53%
EZ 6	0,88	0,63	0,24	37,84%
EZ 7	0,90	0,89	0,01	0,80%
EZ 8	1,13	0,70	0,43	60,71%
EZ 9	1,31	0,86	0,46	53,13%
EZ 10	0,81	1,07	-0,26	-24,17%
EZ 11	0,75	0,25	0,50	205,08%
EZ 12	0,67	0,25	0,42	170,83%
EZ 13	1,17	0,71	0,46	65,28%
EZ 14	1,00	0,61	0,39	63,64%
EZ 15	0,92	0,61	0,31	51,45%
EZ 16	1,00	1,00	0,00	0,00%
EZ 17	0,88	0,77	0,11	14,13%
EZ 18	1,00	0,61	0,39	63,64%
EZ 19	0,88	0,32	0,56	173,44%
EZ 20	1,00	0,48	0,52	106,90%
EZ 21	1,00	0,50	0,50	100,00%
EZ 22	1,33	0,64	0,70	109,52%
EZ 23	0,81	0,26	0,55	215,30%
EZ 24	1,00	0,32	0,68	215,79%
EZ 25	1,19	0,50	0,69	137,50%
EZ 26	1,08	0,50	0,58	116,67%
EZ 27	1,25	0,54	0,71	130,77%
EZ 28	1,25	0,50	0,75	150,00%
EZ 29	0,95	0,50	0,45	90,00%
EZ 30	0,71	0,50	0,21	41,67%
EZ 31	0,65	0,50	0,15	30,00%
EZ 32	0,63	0,50	0,13	25,00%
EZ 33	0,92	0,55	0,37	68,06%
EZ 34	1,17	0,71	0,46	64,20%
EZ 35	1,00	0,42	0,58	138,10%
EZ 36	1,00	0,34	0,66	195,45%
EZ 37	0,65	0,54	0,11	20,00%
EZ 38	0,80	0,50	0,30	60,00%
EZ 39	0,94	0,50	0,44	87,50%
EZ 40	0,75	0,50	0,25	50,00%
EZ 41	1,00	0,50	0,50	100,00%
EZ 42	0,92	0,48	0,44	91,67%
EZ 43	1,08	0,70	0,38	54,76%
EZ 44	1,25	0,65	0,60	93,01%
EZ 45	1,08	0,65	0,43	65,69%
EZ 46	1,17	0,56	0,60	107,41%

Anexo 5: CMB para a solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (mg/mL).

Código dos isolados	Ensaio realizado para determinação da CMB												Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
EZ 1	1	4	4	>4	0,5	0,5			4	1	0,5	1	2,15
EZ 2	3	4	>4	>4	2	0,5			1,5	2	4	3	3,00
EZ 3	3	4	>4	>4	>4	>4			4	3			>4
EZ 4	2,5	0,5	2,5	>4	4	>4					0,5	0,5	2,56
EZ 5	1	2,5	3	4	2	1,5	3	2,5					2,44
EZ 6	>4	1	>4	>4	1	0,5	>4	3					3,19
EZ 7	2	2,5	3	2,5	>4	0,5	4	1,5	2	2			2,50
EZ 8	3	4	4	>4	3	1	1,5	1					2,81
EZ 9	2,5	>4	1,5	1	1,5	>4			4	1,5			2,75
EZ 10	1	3	3	>4	4	2,5					1	0,5	2,50
EZ 11	0,5	1	1	4	>4	>4			0,5	1	4	0,5	2,25
EZ 12	3	1			2,5	2,5			2	0,5			1,92
EZ 13	4	3	3	1	2,5	2							2,58
EZ 14	2	3	4	2,5	2	1							2,42
EZ 15	3	2,5	>4	4	2,5	4							3,50
EZ 16	4	2,5	2,5	1	2	2							2,33
EZ 17	1	1	1	0,5	1,5	1			0,5	2			1,06
EZ 18	2	2,5	2	2	>4	4							2,92
EZ 19	1	4	2	2	>4	1			1	1			2,13
EZ 20	1	1	>4	3	>4	2,5							2,92
EZ 21	1	1,5	2	1,5	1	1			3	4			1,88
EZ 22	2,5	2,5	4	1,5	1,5	2							2,33
EZ 23	1	1	0,5	2	1	1			0,5	1			1,00
EZ 24	3	1,5	2	1,5	1	1			>4	1			2,00
EZ 25	>4	1,5	>4	1,5	1	1					1,5	4	2,56
EZ 26	4	4	2,5	1	1	1,5							2,33
EZ 27	4	3	2	1,5	1,5	1							2,17
EZ 28	4	>4	2,5	4	1	1					1	1	2,44
EZ 29	0,5	0,5	2	>4	2,5	3	1	2	1,5	1			1,90
EZ 30	0,5	0,5	4	3	>4	4	>4	2,5	4	3	2	0,5	2,83
EZ 31	0,5	0,5	>4	>4	>4	3	4	2,5	>4	0,5			3,10
EZ 32	2	1	>4	1	3	1	2	1,5					2,06
EZ 33	1	0,5	1,5	1	1	>4							1,67
EZ 34	2	2	1,5	2,5	>4	3							2,67
EZ 35	1,5	2,5	2	1,5	>4	3							2,58
EZ 36	2,5	2,5	4	4	3	>4			1	1,5	3	>4	3,15
EZ 37	1	2,5	0,5	1	0,5	>4			0,5	1,5	1	>4	1,85
EZ 38	>4	>4	1	1	1	1			1	0,5	2	2	1,95
EZ 39	>4	>4	1	1	>4	1			1	1			2,50
EZ 40	4	2	1	1	4	4					1	0,5	2,19
EZ 41	1,5	1,5	1	1	1	1			3	2,5			1,56
EZ 42	1,5	2	1	1	>4	4							2,42
EZ 43	2	1,5	1	1,5	>4	>4							2,67
EZ 44	1,5	1,5	1	1,5	>4	4							2,42
EZ 45	1	1	1	1	2,5	1							1,25
EZ 46	2	1,5	1	1	4	2							1,92

Anexo 6: CMB obtida para a nisina (mg/mL) (Pinheiro, 2016).

Código dos isolados	Ensaio realizado para determinação da CMB																	Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
EZ 1	2	1,5	2	1,5	2	1,5	3,5	4	>4	4	4	4						2,88
EZ 2	2	3	3,5	4	4	4												3,42
EZ 3	2	2	2	2	1,5	2	4	2,5	>4									2,50
EZ 4	1,5	1	2	2	2	>4	>4	4	0,5	1,5	0,5							2,18
EZ 5	1,5	2	2	2	3,5	3,5	2,5	3,5	4	4	1,5	3,5	1	1,5	1,5	1		2,41
EZ 6	2	2	1,5	3,5	3,5	4	>4	>4	>4	>4	>4	2	2	2	3,5	1,5	3,5	3,15
EZ 7	1,5	2	1,5	2	2	1,5	4	>4	>4									2,61
EZ 8	3,5	2,5	3,5	>4	>4	>4	4	>4										3,94
EZ 9	2	2	>4	>4	>4	4	4	>4	3,5									3,72
EZ 10	2	>4	>4	>4	>4	4												4,00
EZ 11	1,5	1	0,5	1	1	0,5	1,5	0,5	0,5									0,89
EZ 12	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	2										0,94
EZ 13	2	2	4	3,5	>4	3,5	3	3,5	4									3,33
EZ 14	2	2	>4	>4	3,5	3,5	>4	4	4	>4	4							3,73
EZ 15	2	2	>4	>4	4	>4	1	2	3,5									3,11
EZ 16	2	2	2	2	2	2	>4	4	4									2,72
EZ 17	3,5	4	1,5	3,5	3,5	2,5												3,08
EZ 18	2	1,5	2	4	4	4	>4	>4	3,5	3,5	3,5	3,5						3,38
EZ 19	1,5	2	2	2	2	1,5	2	2,5	3	2,5								2,10
EZ 20	1,5	2,5	3,5	3	3,5	3,5	3,5	4	2,5									3,06
EZ 21	2	2	1,5	2	2	2	3	3,5	3,5									2,39
EZ 22	1	1,5	1	2	2	1,5	2	2,5	2	3								1,85
EZ 23	2	2	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5									0,80
EZ 24	2	0,5	1,5	2	2	1	0,5	0,5	0,5	0,5								0,92
EZ 25	1,5	1	1	2	>4	>4												2,42
EZ 26	1	1	1,5	1,5	>4	3												2,08
EZ 27	1,5	1,5	1,5	2	1,5	2												1,67
EZ 28	1	1,5	1	2	2	1,5												1,50
EZ 29	2	4	4	>4	4	>4	2,5	3,5	4	2,5								3,55
EZ 30	2	2	1,5	2	>4	3	3,5	3,5	3,5									2,83
EZ 31	2	>4	4	3	>4	3	1,5											3,21
EZ 32	2	1,5	>4	>4	>4	3,5	3,5	>4	>4									3,67
EZ 33	2	1,5	2	2	2	>4	>4	3,5										2,75
EZ 34	2	>4	3,5	3	4	2,5												3,25
EZ 35	2	2	2	1,5	1,5	1	2	3	2,5									1,94
EZ 36	2	2	1,5	1,5	1	1												1,50
EZ 37	2	3,5	4	4	>4	>4												3,75
EZ 38	2	2	2,5	4	2,5	>4	4											3,07
EZ 39	2	1	2	2	1,5	1,5	1,5											1,64
EZ 40	1,5	2	1,5	1,5	1	2,5	1											1,57
EZ 41	2	2	2	2	3,5	3,5												2,50
EZ 42	2	2	2	2	2	>4	4	3,5	3	3	3	2,5	3,5	3,5	3,5			2,93
EZ 43	2	2	2	>4	4	4												3,08
EZ 44	2	1,5	2	2	1,5	1,5	>4	3,5	3,5	4	3,5	3,5	3	3	2,5			2,77
EZ 45	2	1,5	2	>4	>4	4												3,08
EZ 46	1,5	2	3,5	3,5	3,5	4	4	>4	3,5	3,5								3,35

Anexo 7: Comparação com os valores da CMB (mg/mL) obtidos para a nisina e para o gel de goma de guar suplementado com nisina.

Código dos isolados	Nisina e gel de goma de guar	Nisina	Diferença	Diferença %
EZ 1	2,15	2,88	-0,73	-25,22%
EZ 2	3,00	3,42	-0,42	-12,20%
EZ 3	4,25	2,50	1,75	70,00%
EZ 4	2,56	2,18	0,38	17,45%
EZ 5	2,44	2,41	0,03	1,30%
EZ 6	3,19	3,15	0,04	1,29%
EZ 7	2,50	2,61	-0,11	-4,26%
EZ 8	2,81	3,94	-1,13	-28,57%
EZ 9	2,75	3,72	-0,97	-26,12%
EZ 10	2,50	4,00	-1,50	-37,50%
EZ 11	2,25	0,89	1,36	153,13%
EZ 12	1,92	0,94	0,98	104,44%
EZ 13	2,58	3,33	-0,75	-22,50%
EZ 14	2,42	3,73	-1,31	-35,16%
EZ 15	3,50	3,11	0,39	12,50%
EZ 16	2,33	2,72	-0,39	-14,29%
EZ 17	1,06	3,08	-2,02	-65,54%
EZ 18	2,92	3,38	-0,46	-13,58%
EZ 19	2,13	2,10	0,02	1,19%
EZ 20	2,92	3,06	-0,14	-4,55%
EZ 21	1,88	2,39	-0,51	-21,51%
EZ 22	2,33	1,85	0,48	26,13%
EZ 23	1,00	0,80	0,20	25,00%
EZ 24	2,00	0,92	1,08	117,39%
EZ 25	2,56	2,42	0,15	6,03%
EZ 26	2,33	2,08	0,25	12,00%
EZ 27	2,17	1,67	0,50	30,00%
EZ 28	2,44	1,50	0,94	62,50%
EZ 29	1,90	3,55	-1,65	-46,48%
EZ 30	2,83	2,83	0,00	0,00%
EZ 31	3,10	3,21	-0,11	-3,56%
EZ 32	2,06	3,67	-1,60	-43,75%
EZ 33	1,67	2,75	-1,08	-39,39%
EZ 34	2,67	3,25	-0,58	-17,95%
EZ 35	2,58	1,94	0,64	32,86%
EZ 36	3,15	1,50	1,65	110,00%
EZ 37	1,85	3,75	-1,90	-50,67%
EZ 38	1,95	3,07	-1,12	-36,51%
EZ 39	2,50	1,64	0,86	52,17%
EZ 40	2,19	1,57	0,62	39,20%
EZ 41	1,56	2,50	-0,94	-37,50%
EZ 42	2,42	2,93	-0,52	-17,61%
EZ 43	2,67	3,08	-0,42	-13,51%
EZ 44	2,42	2,77	-0,35	-12,65%
EZ 45	1,25	3,08	-1,83	-59,46%
EZ 46	1,92	3,35	-1,43	-42,79%

Código dos Isolados	Genes pesquisados												
	<i>efa(Afm)</i>	<i>efa(Afs)</i>	<i>acm</i>	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>cyIA</i>	<i>gelE</i>	<i>ace</i>	<i>gls24</i>	<i>ebpA</i>	<i>ebpB</i>	<i>ebpC</i>	Biofilme
EZ 1a	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	++
EZ 2	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+++
EZ 3	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	++
EZ 4a	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	++
EZ 5b	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+++
EZ 6	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+++
EZ 7	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+++
EZ 8b	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+++
EZ 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
EZ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EZ 11	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
EZ 12	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++
EZ 13	-	+	-	-	-	-	+	+		+	+	+	++
EZ 14	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	++
EZ 15	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EZ 16	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EZ 17	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EZ 18	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EZ 19	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
EZ 20	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	++
EZ 21c	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+++
EZ 22	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+++
EZ 23	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	++
EZ 24c	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
EZ 25d	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+++
EZ 26	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	++
EZ 27d	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+++
EZ 28	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+++
EZ 29	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+++
EZ 30e	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+++
EZ 31	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
EZ 32e	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++
EZ 33	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+++
EZ 34	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
EZ 35	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
EZ 36	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
EZ 37	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EZ 38	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
EZ 39f	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+++
EZ 40	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
EZ 41f	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+++
EZ 42	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EZ 43g	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
EZ 44	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	++
EZ 45g	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	++
EZ 46	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	++

Anexo 8: Caracterização das diferentes estirpes de *Enterococcus* spp. (Tavares, 2014).

Legenda: + positivo; - negativo; ++ moderado; +++ elevado.

efaAfm – Adesina da parede celular da espécie *E. faecium*; *efaAfs* – Adesina da parede celular da espécie *E. faecalis*; *acm* – Adesina de ligação ao colagénio da espécie *E. faecium*; *esp* – Proteína de superfície; *agg* – Substância de agregação de enterococos; *cylA* – Citolisina; *gelE* – Gelatinase; *gls24* – Regulador de resposta ao stress da espécie *E. faecalis*; *ebp A*, *ebp B*, *ebp C* – Fímbrias associadas a endocardite/formação de biofilme pela espécie *E. faecalis*.

As células preenchidas a vermelho correspondem a estirpes isoladas a partir do coração, enquanto as não preenchidas correspondem as estirpes provenientes da boca. As estirpes com a mesma letra final correspondem ao mesmo isolado.

Anexo 9: Caracterização do perfil de resistência das estirpes de *Enterococcus* spp. (Tavares, 2014).

Código dos isolados	Amoxicilina + Á. Clavulâmico (AMC)		Ampicilina AMP		Cloranfenicol C(30)		Ciprofloxacina CIP(5)		Gentamicina CN(10)		Gentamicina CN(120)		Clindamicina DA(2)		Eritromicina E(15)		Imipnem IMP		Tetraciclina TE		Vancomicina VA		
	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	H	Vet	
EZ 1a																							
EZ 2		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	I		S	R	R	S	S	
EZ 3		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 4a		S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	I	I		S	R	R	S	S	
EZ 5b		S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I		S	R	R	S	S	
EZ 6		S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 7		S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 8b		S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 9		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	
EZ 10		S	S	S	S	I	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 11		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	S	S	R	R	
EZ 12		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	
EZ 13		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	
EZ 14		S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	
EZ 15		R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		R	R	R	S	S	
EZ 16		R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		R	I	I	S	S	
EZ 17		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		S	R	R	S	S	
EZ 18		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		S	R	R	S	S	
EZ 19		S	R	R	S	S	S	S	R	R	I		R	R	I	I		R	R	R	S	S	
EZ 20		S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	I	I		R	R	R	S	S	
EZ 21c		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 22		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 23		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	
EZ 24c		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	
EZ 25d		S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		S	R	R	S	S	
EZ 26		S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		S	R	R	S	S	
EZ 27d		S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		S	R	R	S	S	
EZ 28		S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		S	R	R	S	S	
EZ 29		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	I	I		S	R	R	S	S	
EZ 30c		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 31		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 32e		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	R	R	
EZ 33		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 34		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	R	R	
EZ 35		S	S	S	S	S	I	I	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 36		S	S	S	S	S	I	I	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 37		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 38		S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R		S	R	R	S	S	
EZ 39f		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 40		S	S	S	S	S	I	I	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 41f		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 42		S	S	S	I	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 43g		S	S	S	S	S	I	I	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 44		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 45g		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	
EZ 46		S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S		S	R	R	S	S	

Legenda: S sensível; I intermédio; R resistente

Legenda: As células preenchidas a vermelho correspondem a estirpes isoladas a partir do coração, enquanto as não preenchidas correspondem as estirpes provenientes da boca. As estirpes com a mesma letra final correspondem ao mesmo isolado

Anexo 10: Atividade bactericida; rácio CMB/CMI.

Código dos isolados	CMI	CMB	CMB/CMI	Atividade
EZ 1	0,85	2,15	2,53	Bactericida
EZ 2	0,90	3,00	3,33	Bactericida
EZ 3	1,06	4,25	4,00	Bactericida
EZ 4	0,81	2,56	3,15	Bactericida
EZ 5	0,69	2,44	3,55	Bactericida
EZ 6	0,88	3,19	3,64	Bactericida
EZ 7	0,90	2,50	2,78	Bactericida
EZ 8	1,13	2,81	2,50	Bactericida
EZ 9	1,31	2,75	2,10	Bactericida
EZ 10	0,81	2,50	3,08	Bactericida
EZ 11	0,75	2,25	3,00	Bactericida
EZ 12	0,67	1,92	2,88	Bactericida
EZ 13	1,17	2,58	2,21	Bactericida
EZ 14	1,00	2,42	2,42	Bactericida
EZ 15	0,92	3,50	3,82	Bactericida
EZ 16	1,00	2,33	2,33	Bactericida
EZ 17	0,88	1,06	1,21	Bactericida
EZ 18	1,00	2,92	2,92	Bactericida
EZ 19	0,88	2,13	2,43	Bactericida
EZ 20	1,00	2,92	2,92	Bactericida
EZ 21	1,00	1,88	1,88	Bactericida
EZ 22	1,33	2,33	1,75	Bactericida
EZ 23	0,81	1,00	1,23	Bactericida
EZ 24	1,00	2,00	2,00	Bactericida
EZ 25	1,19	2,56	2,16	Bactericida
EZ 26	1,08	2,33	2,15	Bactericida
EZ 27	1,25	2,17	1,73	Bactericida
EZ 28	1,25	2,44	1,95	Bactericida
EZ 29	0,95	1,90	2,00	Bactericida
EZ 30	0,71	2,83	4,00	Bactericida
EZ 31	0,65	3,10	4,77	Bacteriostático
EZ 32	0,63	2,06	3,30	Bactericida
EZ 33	0,92	1,67	1,82	Bactericida
EZ 34	1,17	2,67	2,29	Bactericida
EZ 35	1,00	2,58	2,58	Bactericida
EZ 36	1,00	3,15	3,15	Bactericida
EZ 37	0,65	1,85	2,85	Bactericida
EZ 38	0,80	1,95	2,44	Bactericida
EZ 39	0,94	2,50	2,67	Bactericida
EZ 40	0,75	2,19	2,92	Bactericida
EZ 41	1,00	1,56	1,56	Bactericida
EZ 42	0,92	2,42	2,64	Bactericida
EZ 43	1,08	2,67	2,46	Bactericida
EZ 44	1,25	2,42	1,93	Bactericida
EZ 45	1,08	1,25	1,15	Bactericida
EZ 46	1,17	1,92	1,64	Bactericida

Anexo 11: Resumo do artigo: “Canine periodontal disease and its systemic implications”.

Canine periodontal disease and its systemic implications - a review

Cunha E¹, Trovão T¹, Santos R^{1,2}, Santos JD¹, Moreira da Silva J³, São Braz B¹, Veiga AS²,
Tavares L¹, Oliveira M¹

¹Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA) / Faculty of Veterinary
Medicine, University of Lisbon, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477, Lisboa,
Portugal

²Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa,
Portugal

³Virbac Portugal

Abstract: Periodontal disease (PD) is one of the most widespread diseases in dogs with a prevalence of 80%. PD is an inflammatory disorder caused by the formation of a dental plaque that affects the periodontium, promoting gingivitis and periodontitis. PD has a multifactorial aetiology, with the bacterial activity combined with the animal immune-inflammatory response being responsible for the onset of PD pathogenesis.

Control and removal of dental plaque are the standard procedures for therapeutics and prophylaxis. PD prevention is based on dental hygiene care, appropriate diet and regular evaluation by a veterinarian. For treatment, we can use surgical and non-surgical methods.

Besides PD local effects, systemic consequences can occur secondary to the dissemination of dental plaque bacteria via bloodstream, resulting in bacteraemia and in an exacerbated inflammatory response that can affect distant tissues and organs. Renal, hepatic, thromboembolic and cardiac diseases, cerebral and myocardial infarctions and atherosclerosis are some of the systemic diseases that have been related with PD in dogs. Additionally, several authors consider dogs as good models for human periodontal disease, also showing the importance of these studies for Human Medicine.

Key-words: Dental plaque, periodontal disease, systemic consequences.

Anexo 12: Resumo da comunicação oral: “Prevention of enterococcal periodontal disease in dogs: An experimental approach using an antimicrobial peptide”.

Prevention of enterococcal periodontal disease in dogs: An experimental approach using an antimicrobial peptide

Cunha E¹, Pinheiro A¹, Santos R^{1,2}, Trovão T¹, Moreira da Silva J³, São Braz B¹, Veiga AS²,
Tavares L¹, Oliveira M¹

¹Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA) / Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477, Lisboa, Portugal

²Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

³Virbac Portugal

Background: Periodontal disease (PD) affects approximately 80% of dogs, being promoted by the development of microbial biofilms (dental plaque) in the periodontium, which progression leads to gingivitis and periodontitis[1]. Additionally, bacteria present in dental plaque can spread via bloodstream causing systemic diseases[1].

Enterococcus faecalis is frequently present in the oral cavity of dogs, being related with PD development in these animals[2]. Considering their frequent multi-drug resistant (MDR) profile, new therapeutic strategies to prevent and control enterococcal PD in dogs are urgent.

Nisin is an antimicrobial peptide (AMP) with antibacterial activity against a wide range of Gram-positive bacteria[3], being a suitable and effective drug for dental disease prevention in humans[4]. Nisin Minimum Inhibitory (MIC) and Bactericidal (MBC) Concentrations against canine enterococci isolates were already been assessed by our research team, as well as its Minimum Biofilm Inhibitory and Eradication Concentrations, confirming its potential as an effective antimicrobial compound.

Main Goal: Evaluation of the potential of a veterinary toothpaste to be used as a nisin oral delivery system, aiming at enterococcal PD prevention and treatment in dogs.

Material/methods: A collection of 46 enterococci isolates (including planktonic and biofilm-producer strains) obtained from dogs diagnosed with PD were used as bacterial models, as well as two human reference strains. The potential of a veterinary toothpaste to be used as an oral administration vehicle for nisin was evaluated through an agar-well diffusion assay, using

toothpaste supplemented with nisin concentrations based on previously determined MIC and MBC values, ranging from 0.05 to 13 mg/mL. The non-supplemented toothpaste was used as negative control. Evaluation of inhibition zone diameters was performed after incubation, for 24h at 37°C.

Results/discussion: The non-supplemented toothpaste showed an inhibitory effect against 8.7% (4/46) of the isolates; when supplemented with nisin, its inhibitory potential increased with rising nisin concentrations, being effective against 85% (40/46) of the tested isolates. Therefore, this AMP seems to be an appropriate candidate for controlling the dental plaque responsible for the onset of PD pathogenesis in dogs. Furthermore, nisin kept its inhibitory activity when incorporated in a veterinary toothpaste, increasing its antimicrobial potential and demonstrating its potential as a nisin oral delivery vehicle.

Since dogs are considered models of human PD, results can be extrapolated to human medicine and, in a near future, this innovative therapeutic strategy may allow to decrease antibiotics' administration for PD treatment, ultimately contributing to reduce the dissemination of MDR strains.

Bibliography

- [1] Niemiec, B (2008). Periodontal disease. *Topics in Companion An Med*, 23(2), 72-80.
- [2] Semedo-Lemsaddek T, Tavares M, Sao-Braz B, Tavares L, Oliveira M (2016). Enterococcal infective endocarditis following periodontal disease in dogs. *PLoS ONE*. 11, e0146860. doi:10.1371/journal.pone.0146860.
- [3] Field D, Gaudin N, Lyons F, O'Connor PM, Cotter PD, Hill C, Ross RP (2015). A Bioengineered nisin derivative to control biofilms of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS ONE*, 10(3): e0119684.
- [4] Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L (2010). Nisin inhibits dental caries-associated microorganism *in vitro*. *Peptides*, 31, 2003-2008.