

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação *In Vitro* da Atividade Antimicrobiana de
Extratos de Plantas Sobre
a Microbiota da Cavidade Oral de Cães.**

Marcio de Castro Menezes

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS DE PLANTAS SOBRE
A MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL DE CÃES.**

Marcio de Castro Menezes

Marcio de Castro Menezes

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***AValiação IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS DE PLANTAS SOBRE
A MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL DE CÃES.**

MARCIO DE CASTRO MENEZES

Sob a Orientação da Professora
Rosana Pinheiro Botelho

e Co-orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária, Área
de Clínica Médica Veterinária.

Seropédica, RJ
Outubro de 2003

636.70896
M543a
T

Menezes, Marcio de Castro, 1977-
Avaliação in vitro da atividade
antimicrobiana de extratos de plantas
sobre a microbiota da cavidade oral de
cães / Marcio de Castro Menezes. - 2003.
42 f. : il.
Orientador: Rosana Pinheiro Botelho.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.
Bibliografia: f. 35-42.
1. Cão - Doenças - Teses. 2. Boca -
Microbiologia - Teses. 3. Plantas
medicinais - Teses. 4. Ervas - Uso
terapêutico - Teses. 5. Microbiologia
veterinária - Teses. I. Botelho, Rosana
Pinheiro. II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Instituto de
Veterinária. III. Título.

Bibliotecário:

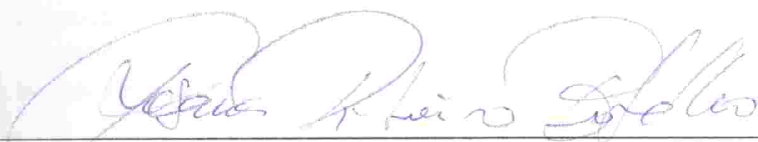
Data: / /

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MARCIO DE CASTRO MENEZES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Clínica Médica Veterinária.

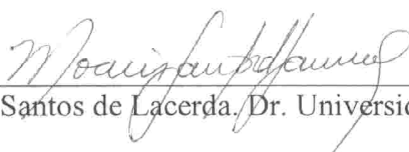
DISSERTAÇÃO APROVADA EM __/__/__



Rosana Pinheiro Botelho. Dra. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



Sonia Soares Costa. Ph.D. Universidade Federal do Rio de Janeiro.



Moacir Santos de Lacerda. Dr. Universidade de Uberaba.

ABSTRACT

MENEZES, Marcio de Castro. **Evaluation of the "in vitro" antimicrobial activity of plant extracts front of dogs oral cavity microbiota.** Seropédica: UFRRJ, 2005. 44p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária, Clínica Médica).

For a long time, in human medicine, plants are being used as an alternative or complementary therapy in infectious diseases in order to achieve its antibiotic and/or antinflammatory effects, especially in oral hygiene and periodontal disorders through the use of solutions or even the habit of chewing parts of these plants. The present work was performed in order to evaluate the antimicrobial activity of 12 extracts of plants front of the following dogs oral bacteria: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* *Streptococcus oralis*. Also it was determined Minimal Inhibitory Concentration of each extract that presented some activity. For these analyses, Disk Diffusion Test as prescribed by NCCLS and Plate Microdilution were performed. The obtained data showed that 10 of the 12 extracts presented some antimicrobial activity, so a significative number of extracts were effective against tested bacteria. Future studies of these plants constitution will allow a better comprehension of bacterial inhibition mechanism. Brazil wide biodiversity makes this kind of research of great importance, since it could, in the future, contribute to the treatment of several diseases of dogs, including oral ones.

Keywords: Plant, antimicrobial activity, bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Microbiologia Oral	2
2.2 Patogenia da Doença Periodontal	3
2.2.1 A Formação do biofilme	3
2.2.2 Placa dental supragengival	4
2.2.3 Placa dental subgengival	4
2.2.4 Placa dental mineralizada – Cálculo dental	5
2.2.5 Placa x Doença	6
2.3 A Doença Periodontal	6
2.4 O Uso das Plantas	8
2.4.1 Estudos na medicina humana	10
2.5 Outros Produtos Naturais	17
3 OBJETIVOS	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 Levantamento Microbiológico	19
4.1.1 Coleta, processamento e isolamento das amostras	19
4.1.2 Identificação presumtiva	20
4.1.3 Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp	20
4.1.4 Identificação de <i>Streptococcus</i> spp	21
4.2 Seleção e Preparo de Amostras para Execução dos Ensaios	21
4.3 Extratos de Plantas e Amostras de produtos Naturais	22
4.4 Avaliação “in vitro”	22
4.4.1 Teste de Difusão em Disco	22
4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos, na medicina humana, algumas plantas são usadas como uma terapia alternativa ou adjuvante em processos patológicos infecciosos com o intuito de desfrutar de seus efeitos antimicrobianos. Tal prática estende-se a higiene oral e ao tratamento de desordens periodontais, através do uso de enxágües orais ou mesmo com a mastigação rotineira de gravetos ou outras partes dessas plantas, como é hábito em alguns países.

A maioria das doenças da cavidade oral possui estreito relacionamento com a microbiota local, pois ela interage direta e/ou indiretamente no estabelecimento desses processos patológicos, levando a sérios problemas e atuando como um grande e variado foco de infecção.

A doença periodontal caracteriza-se como uma das principais afecções da cavidade oral dos cães, levando a repetidas sessões de tratamento cirúrgico, expondo os animais a risco anestesiológico e a gastos elevados por parte de seus proprietários. Além disso, predispõe a alterações em vários sistemas ou órgãos, tais como: cárdio-circulatório, hepático, ósseo, nervoso e renal.

A busca por extratos de plantas da flora brasileira que apresentem atividade antimicrobiana se torna muito importante, uma vez que podem ser usados na profilaxia ou no prolongamento dos resultados obtidos com o tratamento cirúrgico da doença periodontal, diminuindo o risco e o custo terapêuticos, o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos, e a ocorrência de efeitos colaterais.

As plantas a serem testadas foram preparadas pelos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Atualmente, existem disponíveis um grande número de agentes químicos que possuem ação antimicrobiana comprovada e diferentes formas de atuação sobre as espécies bacterianas, representando o papel de importantes aliados na terapêutica veterinária. Entretanto, esses medicamentos podem causar diversos efeitos colaterais, principalmente quando associados para obtenção de maior margem de segurança.

A disponibilidade de literatura médico-veterinária sobre a avaliação e o emprego de plantas com atividade antimicrobiana sobre a formação da placa dental é muito restrita quando comparada a medicina humana. O estudo detalhado dos princípios ativos de plantas, através de pesquisas e experimentos, deve ser feito visando a sua aplicação na profilaxia da formação da placa dental e da doença periodontal que freqüentemente acometem os cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbiologia Oral

O reconhecimento da diversidade bacteriana na cavidade oral em diferentes fases da vida do animal contribui para a compreensão da etiopatogenia dos processos patológicos orais.

Os fetos são considerados estéreis, e a diversidade microbiana inicia-se na amamentação com o contato com as bactérias provenientes da teta da mãe, que utilizam o leite como fonte nutricional e multiplicam-se, colonizando a cavidade oral do filhote. A erupção dentária amplia essa diversificação devido a mudança na alimentação, do pH, no hábito de morder objetos, etc (JONES & LISKA, 1986).

A cavidade oral de cães suporta uma concentração e uma variedade populacional microbiana que é distinta da encontrada na orofaringe, nasofaringe e narinas (JONES & LISKA, 1986). Na cavidade oral, há bactérias aeróbias, facultativas e anaeróbicas, sendo considerada, portanto, contaminada. No entanto, a ação antimicrobiana da saliva e o excelente suprimento sanguíneo oral constituem barreiras naturais de defesa local (HEDLUND, 2002). Nos primeiros dias de vida do animal há predominantemente microbiota estreptocócica (90%), e após a erupção dentária, algumas espécies, tais como espiroquetas e bacteróides começam a habitar o sulco gengival. Assim, a microbiota oral tem ótimo potencial virulento quando introduzida em outros tecidos (JONES & LISKA, 1986).

Na cavidade oral, as bactérias presentes começam a colonizar várias superfícies orais, tais como dentes, língua, gengiva, palato, etc. Essa colonização se dá através da formação de verdadeiros nichos ecológicos (constituídos por várias bactérias e diferentes compostos), chamados de biofilme bacteriano oral ou placa dental (LOESCHE, 1993).

Há uma variedade grande de microorganismos que estão presentes na cavidade oral, que se dividem de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Bactérias isoladas com maior frequência na cavidade oral de cães.

BACTÉRIAS AERÓBIAS E ANAERÓBIAS FACULTATIVAS	BACTÉRIAS ESTRITAMENTE ANAERÓBIAS
Gram-positivas	Gram-positivas
<i>Streptococcus</i> spp	<i>Peptostreptococcus</i> spp
<i>Actinomyces</i> spp	<i>Actinomyces</i> spp
<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Eubacterium</i> spp
	<i>Clostridium</i> spp
Gram-negativas	Gram-negativas
<i>Neisseria</i> spp	<i>Veillonella</i> spp
Coliformes	<i>Fusobacterium</i> spp
<i>Compylobacter</i> spp	<i>Wolinella</i> spp
<i>Capnocytophaga</i> spp	<i>Bacteroides</i> spp
<i>Eikenella</i> spp	<i>Prevotella</i> spp
<i>Actinobacillus</i> spp	<i>Porphyromonas</i> spp
	Espiroquetas

Wiggs & Lobprise, 1997 (adaptado)

2.2. Patogenia da Doença Periodontal

A inflamação do periodonto com presença de exsudatos e bridas é indicativo de uma resposta imune local, sendo um fator importante na progressão da doença periodontal, que depende da interação entre a microbiota presente e a resposta imunológica. Essa virulência bacteriana pode ser explicada pela própria presença da bactéria no local, assim como de seus produtos (WIGGS & LOBPRISE, 1997), que terão uma propriedade antigênica. Esse processo localizado pode tornar-se uma infecção sistêmica, pois bactérias presentes em lesões na cavidade oral podem penetrar na corrente sanguínea e se acumular em outros órgãos, principalmente nos rins, fígado e coração, e neles causarem lesões. A boca pode, portanto, atuar como um foco de infecção (PENMAN, 1990; GOLDSTEIN, 1990 apud HARVEY & EMILY, 1993) para o próprio indivíduo.

Um trabalho americano feito por Nieves *et al.* (1997) pôde comprovar essa teoria, comparando o isolamento de bactérias da placa dental e do sangue durante e após um procedimento dental de rotina em cães. Os autores encontraram uma bacteremia em todos os 20 cães estudados após, aproximadamente, 40 minutos do procedimento, onde de 60 a 90% dos gêneros bacterianos encontrados na placa, se encontravam também no sangue desses animais. Essa bacteremia, portanto, pode persistir após o tratamento dentário, não estando associada com a severidade da doença dental.

2.2.1. A formação do biofilme

Devido a grande restrição de informações sobre a formação do biofilme oral canino, estão referenciadas informações com base em estudos orais no homem.

Uma das comunidades de biofilme mais estudadas é o biofilme oral, mais conhecido como placa dental. Este sistema é particularmente complexo, consistindo em várias espécies bacterianas, incluindo bactérias patogênicas conhecidas não sendo tipicamente associadas com a cavidade oral (KOLENBRANDER, 2000).

A superfície do dente adsorve seletivamente várias glicoproteínas ácidas da saliva (mucinas), formando a Película Adquirida do Esmalte (PAE), uma camada membranosa amorfa que recobre toda a coroa dentária. Após a formação dessa película, há a adsorção contínua de bactérias específicas da saliva que crescem e se multiplicam, formando acúmulos chamados de placa dental ou biofilme bacteriano dental. Com isso, há a interação de outras espécies bacterianas presentes na cavidade oral, onde provavelmente serão as bactérias predominantes da placa envelhecida, havendo uma sucessão bacteriana que difere entre placas de superfícies lisas e fissuras (LOESCHE, 1993).

No que diz respeito ao cão, no começo da formação da placa dental, ocorre a predominância de bactérias Gram-positivas, aeróbias e anaeróbias facultativas sem motilidade, principalmente *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus*. Essa placa se forma com mais intensidade durante o período de repouso, onde não há a presença de comida e menor atividade oral. Posteriormente, há a formação da placa subgengival, havendo inicialmente, pouca diferença entre a microbiota da placa supragengival e subgengival. Entretanto, com um contínuo acúmulo de bactérias, haverá uma mudança na população microbiana, passando então, a predominar bactérias Gram negativas e anaeróbias com motilidade, sem decréscimo, no entanto, das aeróbias. Em cães, as bactérias anaeróbias constituem apenas 25% da microbiota subgengival em uma gengiva sadia. Entretanto, esse percentual poderá aumentar para 95% em cães com periodontite (WIGGS & LOBPRISE, 1997; GIOSO, 1999).

A placa dental pode ser classificada como supragengival ou subgengival.

2.2.2. Placa dental supragengival

Localizada sobre as coroas dentárias, a placa supragengival é composta inicialmente por estreptococos alfa-hemolíticos (grupo viridans). Bacilos Gram-positivos constituem pequena porção dessa microbiota, e após o primeiro dia de desenvolvimento, a proporção de estreptococos cai para 45% enquanto que a de cocos Gram-negativos anaeróbios aumenta para aproximadamente 20%. Após o terceiro dia, espécies anaeróbias e facultativas passam a predominar enquanto os bacilos Gram-negativos anaeróbios correspondem a 25%. Com o desenvolvimento da placa, bacilos Gram-negativos anaeróbios se multiplicam devido às condições ambientais que as favorecem (WOOD *et al.*, 2000).

2.2.3. Placa dental subgengival

Está localizada no sulco gengival ou bolsa periodontal, e sua composição dependerá do grau da doença periodontal instalada: a medida que ela progride, a proporção de cocos e bacilos Gram-positivos diminui, enquanto aumenta a de bacilos Gram-negativos (principalmente anaeróbios) e de microorganismos espiralados. A diferença na composição dessa microbiota dá-se pelas características ambientais do sulco gengival, destacando-se a maior disponibilidade de nutrientes do exsudato gengival. Na colonização das superfícies lisas, os cocos gram-positivos aparecem como os primeiros colonizadores, sucedidos por uma microbiota composta por bastonetes gram-positivos. A medida em que a placa envelhece, a proporção de bastonetes e cocos gram-negativos aumenta, seguidos por bactérias gram-negativas dotadas de motilidade (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Em humanos, as fissuras oclusais são invadidas por bactérias e partículas de alimentos, que são comprimidos na mastigação. A composição da microbiota da fissura é muito difícil de ser analisada, pois essas fissuras são microscópicas. Porém, Loesche (1993) desenvolveu um método de análise dessa microbiota através de fissuras artificiais. Com isso, o autor pode concluir que a microbiota era composta essencialmente por estreptococcus (*S. sanguis*, *S. mitis* e *S. salivarius*), diferindo, portanto da microbiota da placa. Esses achados sugerem que as áreas retentivas dos dentes podem não estar sujeitas ao fenômeno de aderência seletiva, mas sim a uma captura passiva e retenção de microorganismos salivares.

Essa teoria pode ser aplicada aos cães, apesar da arcada dental canina ser bem diferente da dos humanos. Nos cães, os dentes são mais espaçados e quase não há fissuras oclusais. Essa característica anatômica dos cães somada a outros fatores como dieta pobre em carboidratos de baixo peso molecular (principalmente sacarose), pH da boca mais básico do que a do homem e maior atrito entre os dentes ponteagudos, conferem ao cão um baixo percentual de aparecimento de cáries (menos de 5% dos casos), podendo aparecer principalmente nos molares inferiores e superiores, que possuem a fossa oclusal. Além disso, os cães quase não mastigam o alimento, o que faz com que a retenção desses microorganismos salivares seja de forma passiva, pouco dependente da ação mecânica da mastigação.

Na formação da placa dental, há mecanismos de aderência bacteriana à PAE formada, pois tanto a bactéria quanto a PAE possuem carga negativa, havendo uma repulsão elétrica. Um dos mecanismos presente nessa interação são as pontes de cálcio. O cálcio, que pode ser abundantemente encontrado na saliva, serve como um mecanismo de ligação entre duas entidades de carga negativa, por ser um cátion divalente capaz de formar duas ligações iônicas com compostos diferentes. Outros mecanismos se referem às ligações de hidrogênio do polissacarídeo bacteriano com a superfície do dente ou interações celulares específicas de adesão célula-substrato (adesão entre os primeiros colonizadores e a PAE), célula-célula

concentração de bactérias. O cálculo dental geralmente ocorre em áreas com inflamação crônica com camada superficial de placa bacteriana (LOESCHE, 1993).

2.2.5. Placa x Doença

Cada doença da cavidade oral está relacionada com diferentes espécies bacterianas ou complexos microbianos, onde de acordo com Loesche (1993) a placa dental pode ser classificada em três categorias: placa não associada à doença, placa associada à cárie e placa associada à doença periodontal, onde os dois últimos tipos de placas associadas à doenças podem ser observadas simultaneamente na cavidade oral.

A importância de se estudar a formação desses biofilmes está na adoção de medidas profiláticas importantes com o objetivo de melhorar a saúde dos animais e dos humanos. Com a diminuição da formação desses biofilmes orais, o aparecimento de doenças periodontais conseqüentemente diminuirá, pois a placa dental é o início da instalação de uma periodontopatia (LOESCHE, 1993).

2.3. A Doença Periodontal

Dentre as afecções da cavidade oral, a doença periodontal ou periodontopatia merece atenção especial por apresentar alto índice de ocorrência. Segundo Eisner (1986) e Harvey & Emily (1993), 85% dos cães, cujos proprietários procuram assistência veterinária, sofrem dessa doença. Este elevado percentual pode também ser explicado pela domesticação dos cães, que levou a uma mudança significativa na sua dieta, que apesar de balanceada, não apresenta a consistência necessária ao atrito com a superfície dentária, como ocorria na natureza.

Periodontologia é o estudo do periodonto, estando ele sadio ou não, bem como o estudo de seu tratamento. *Periodontium* vem do latim e do grego e significa "ao redor do dente". A verdadeira anatomia do periodonto é restrita ao tecido conectivo entre o dente, o osso alveolar (periósteo alveolar) e o ligamento periodontal. Entretanto, clinicamente e na prática, se considera o periodonto, aqueles tecidos que suportam e protegem o dente, tais como o alvéolo, o cimento, a membrana ou ligamento periodontal e a gengiva (WIGGS & LOBPRISE, 1997).

A doença periodontal é o processo em que consiste de vários estágios de perda progressiva das estruturas periodontais, apresentando um processo cíclico, de intervalos recorrentes de destruição ativa (periodontite) e latência não sendo uma sequência contínua linear. O termo doença periodontal se refere à inflamação da gengiva ou periodonto, suas alterações recessivas ativas ou aqueles estados de alteração com ou sem doença ativa. Periodontite é definida como um estado de doença ativa do periodonto. Isto significa que um animal pode estar num estágio III de doença periodontal, mas se a doença ativa vem sendo controlada, a periodontite ou gengivite pode não estar presente (WIGGS & LOBPRISE, 1997).

Para se adotar medidas preventivas no controle da formação da placa dentária, é necessário conhecer os mecanismos envolvidos na sua formação. O primeiro estudo que mediu a variação de pH da placa dentária foi feito por Stephan (1940) que montou um dispositivo que media a variação de pH da placa de humanos após o consumo de sacarose, obtendo assim, a chamada curva de Stephan, que representa a variação do pH da placa após a ingestão de carboidratos.

Porém, essa variação de pH não se dá apenas pela ingestão de carboidratos. A acidez entorno dos dentes ocorre por vários motivos, tais como: número e espécies de bactérias

presentes, capacidade da saliva de atuar como tampão, pelo tipo de dieta (principalmente a grande ingestão de açúcar), pelo fluxo e viscosidade da saliva, entre outros fatores. Para que haja adesão bacteriana na formação da placa dentária, é necessária a formação de polímeros extracelulares, que podem ser produzidos a partir de qualquer fonte de carbono fermentável, porém, os polissacarídeos formados da sacarose possuem grande importância. Para a formação desses polissacarídeos extracelulares, é necessária a produção de uma enzima bacteriana chamada de glicosiltransferase, que age degradando a sacarose, podendo, a partir daí, polimerizar a glicose formando polímeros degradáveis (dextrano) e não degradáveis (mutano) (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 2001).

Frostell (1964) estudou a relação entre placa dentária e a produção de ácidos pelas bactérias. Suspendendo por dois dias a higienização oral de voluntários humanos, o autor determinou quantitativamente a produção de ácidos em suspensões de placa, comparando com diferentes carboidratos. Com isso, pode-se concluir que a produção de ácido a partir de glicose, sacarose, frutose e maltose é muito mais rápida quando comparada com o amido e lactose.

Assim, para avaliar os efeitos da sacarose da dieta na composição microbiológica do biofilme dentário, Staat (1975) submeteu 8 pessoas a dois períodos sem higiene bucal, oferecendo dietas com alta e baixa quantidade de sacarose. A placa obtida após o consumo da dieta rica em sacarose continha, significativamente, mais microorganismos, porém, a quantidade da placa formada não se alterou. Os microorganismos identificados na placa foram: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus salivarius*. Na placa de 4 dias a porcentagem de *S. mutans* em relação ao total de estreptococos foi, em média, 2,1% nas dietas com alta quantidade de sacarose e de 0,7% nas dietas com baixa quantidade de sacarose, e na placa de 12 dias a porcentagem de *S. mutans* foi de 1,6% e 0,5% respectivamente. Por isso, pode-se sugerir que o efeito da sacarose da dieta na composição bacteriológica da placa ocorre em função da idade da placa, onde o aumento do número de microorganismos associados à cárie se dá principalmente nos períodos iniciais de maturação, bem como a diferenciação dessas bactérias.

Com o objetivo de estudar os fatores que levam à desmineralização do esmalte dentário, Zero *et al.* (1986) avaliaram *in situ* o papel do polissacarídeo intracelular de reserva produzidos pelas bactérias da placa dental. Massas bacterianas provenientes de culturas de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *A. viscosus*, (em caldos a 0,25% e 2,2% de glicose) foram colocadas em um dispositivo intrabucal palatino, que permaneceu por 45 minutos em 3 voluntários humanos. Bochechos foram realizados no primeiro minuto de uso com solução de sacarose ou glicose a 10%. A maior desmineralização do esmalte e queda de pH ocorreu nas placas de *S. mutans* cultivadas com glicose 2,2%, independente da realização do bochecho, o mesmo ocorrendo com *S. sanguis* e *S. mitis*, porém, em menor grau. Os *S. salivarius* e *A. viscosus* não causaram desmineralização. Assim, concluíram que a produção de ácidos pelas bactérias da placa a partir de fontes endógenas de açúcar é um fator importante na desmineralização do esmalte dentário. Além disso, os autores puderam concluir que apesar das placas dentárias obtidas de culturas de *S. mutans* suplementadas com sacarose apresentarem menor quantidade de células e menor capacidade de diminuir o pH "*in vitro*", elas levam a uma maior desmineralização do esmalte *in situ*, devido, provavelmente, à presença de matriz extracelular, constituída em sua maior parte por glucanos, que atuariam como barreiras de difusão, limitando a saída dos ácidos e o acesso dos tampões salivares a camadas profundas da placa.

A periodontite ocorre de muitas formas, podendo ter diferentes causas, e normalmente se desenvolve a partir de uma gengivite, porém, nem toda gengivite não tratada desenvolve uma periodontite. Na ocorrência de periodontite, o corpo se defende ao ataque

para controlar a afecção, podendo resultar em perda das estruturas do periodonto e na progressão dos estágios de doença periodontal (GIOSO, 2002).

Em animais e humanos, uma série de doenças tem sido relacionada com a doença periodontal. Em humanos, recentes pesquisas comprovam o envolvimento de doenças cardiovasculares, tal como o infarto agudo do miocárdio, além do infarto cerebral. Um trabalho feito no Reino Unido (DeSTEFANO *et al.*, 1993) estudou a associação entre uma pobre saúde oral com a mortalidade geral, envolvendo 10.000 pacientes humanos. Pode-se concluir que as pessoas do estudo com doenças periodontais tinham 2,6 vezes mais chances de morrer antes de seu décimo ano quando comparadas aquelas que possuíam uma boa saúde oral.

Estudos similares têm sido feitos em cães, como uma pesquisa realizada no Kansas (DeBOWES, 1998), onde se estudou a relação entre a doença periodontal e as doenças hepáticas, cardíacas e renais. Um estudo comparativo em animais foi feito utilizando 39.556 cães e 13.924 gatos, divididos em 3 categorias de acordo com a idade, para mostrar que a doença dental foi a mais diagnosticada em ambas as espécies e em todas as categorias estudadas. Esses estudos indicam que a doença periodontal é a doença mais comum de cães e gatos adultos, enquanto sugere que uma pobre saúde oral pode afetar diretamente sua saúde geral.

Tem-se também que nos conscientizar do fato de que a doença periodontal é uma enfermidade infecciosa, onde as bactérias envolvidas nesse processo podem ser passadas do animal para o homem e vice-versa. Por isso, deve-se ter cautela, evitando o contato muito próximo com o animal já que eles podem ser considerados como reservatórios de patógenos causadores das doenças periodontais (WIGGS & LOBPRISE, 1997).

Dentre os sintomas e sinais associados com a doença periodontal, podemos encontrar: edema e inflamação gengival, deposição de placas e cálculos dentários, exsudato, ulcerações, retração e sangramento gengival, mobilidade e perda dentária. (NISENGARD & NEWMAN, 1997)

A doença periodontal tem sido descrita como uma infecção multifatorial. Placa, microbiota, cálculos, imunossupressão, fatores genéticos e raciais, espécie, saúde geral, idade, cuidados de higiene oral, saliva, uso de artificios mastigatórios e irritação local são os fatores gerais mais comuns para o aumento da suscetibilidade e da progressão da periodontite. Entretanto, apesar de todos esses fatores interferirem no aparecimento da doença, a etiologia primária do processo está relacionada a placa bacteriana. Estudos epidemiológicos têm indicado que os fatores etiológicos da doença periodontal em cães são similares aqueles em humanos (WIGGS & LOBPRISE, 1997).

2.4. O Uso das Plantas

Nos dias atuais, mesmo com o grande desenvolvimento de fármacos obtidas por síntese orgânica, os produtos naturais continuam desempenhando um papel de destaque na medicina e na saúde. Mais de 25 % dos medicamentos em uso são derivados naturais ou produtos semi-sintéticos de origem natural. Nos países em desenvolvimento da América Latina, e em particular no Brasil, a percentagem de utilização de produtos naturais pela população vem aumentando substancialmente, revelando a importância do conhecimento da química das plantas utilizadas para estes fins. Considerando 119 fármacos derivadas de plantas em uso em vários países, 74 % foram descobertos através de estudos dirigidos para o isolamento de constituintes químicos de plantas usadas na medicina tradicional (VIEIRA & BOLZANI, 2000).

O Brasil é um dos 14 países com grande biodiversidade contendo mais de 10% de todos os organismos descritos na Terra. Das plantas floríferas conhecidas, aproximadamente 55.000 espécies, cerca de 22% destas, ocorrem no Brasil, principalmente nas regiões da floresta amazônica, mata atlântica e cerrado. Uma vasta quantidade de espécies de plantas brasileiras permanece sem qualquer estudo químico ou biológico e representa um potencial econômico valioso. A biodiversidade brasileira está ameaçada pela grande extinção de espécies, o que sem dúvida causará não apenas a perda de substâncias de valor terapêutico, como também o seu código de expressão genética, impossibilitando a manutenção deste grande manancial químico. Uma estratégia para o desenvolvimento do Brasil na área de produtos naturais seria proteger e promover a exploração racional da sua biodiversidade como uma fonte de novas substâncias de utilidade para os humanos e também para os animais, pois além da importância da saúde e bem-estar desses animais, é importante lembrar que, cuidando da saúde deles, consequentemente, a nossa saúde também será cuidada (MEDAGLIA, 2004).

Estima-se que haja cerca de 50.000 plantas medicinais com potencial de cura no Brasil, porém menos de 10% delas já foi cientificamente estudado. Num país como o nosso, onde a população carente não só tem dificuldades para obter os medicamentos convencionais, mas também adoece com grande frequência, o uso criterioso da fitoterapia no sistema público de saúde pode ser uma alternativa para a redução do custo com medicamentos administrados e fornecidos à população. Implantar a fitoterapia no sistema de saúde envolve diversos profissionais, como médicos, farmacêuticos e agrônomos, entre outros. Além disso, é necessário conhecimento técnico sobre as plantas, seus efeitos terapêuticos e tóxicos, qual parte da planta deverá ser utilizada, via de administração e um bom banco de dados de referências bibliográficas. Tudo isso só é possível através da pesquisa contínua, desenvolvida dentro das universidades e de grandes centros de estudo (MEDAGLIA, 2004).

Em comunidades onde não há assistência odontológica disponível ou não possuem condição para tal, como as indígenas, por exemplo, o uso de plantas medicinais consagradas pelo seu efeito curativo se torna um grande aliado. Um trabalho feito por Santos *et al.* (2004) em tribos indígenas do Acre, pode pesquisar as principais plantas usadas por esses índios para tratar as mais diversas afecções orais, totalizando mais de 50 espécies vegetais. Algumas dessas plantas possuem respaldo científico com relação aos seus efeitos, porém, a maioria delas é usada pela crença ou costume indígena. Dentre as plantas usadas para combater as infecções orais, podemos citar o Ananás (*Ananas sativus*), o Camboté (*Jacarandá procera*), a Copaíba (*Copaifera officinalis*), a Ipeúva (*Tecoma impertiginosa*), o Jerimum (*Cucurbita pepo*) e a Andiroba (*Carapa guyanensis*). Ao examinar os índices de cárie dessa população, os autores puderam concluir também que apesar deles não possuírem nenhum tipo de higienização oral, a média geral dos índices de cárie das aldeias analisadas está dentro do limite aceitável pela Organização Mundial de Saúde, fator esse que pode ser explicado não só pelo uso dessas plantas medicinais, mas, principalmente, pelo tipo de dieta que os índios têm, com baixo nível de sacarose.

Em Medicina Veterinária, observa-se que, de modo geral, os proprietários têm grandes dificuldades em realizar a higienização oral dos cães, favorecendo a aquisição de doenças periodontais com grande facilidade. Somam-se a esse fato, vários fatores que acabam por auxiliar no agravamento do quadro clínico desses animais, tais como a raça, a anatomia da arcada dental, fatores imunológicos e doenças concomitantes. Assim, cada vez mais se busca o potencial curativo das plantas, e o estudo sobre aquelas espécies que apresentam efeito antimicrobiano progride em grande velocidade. Vários trabalhos abordam espécies brasileiras (LOPES, 1991; McCHESNEY *et al.*, 1991; PERES *et al.*, 1997; GNAN & DEMELLO, 1999; BIAVATTI *et al.*, 2001), definindo-se, na maior parte deles, as substâncias responsáveis por este efeito.

2.4.1. Estudos na medicina humana

A atuação de extratos e constituintes isolados de plantas, sobre microorganismos causadores da doença periodontal em humanos, vem sendo comprovado em ensaios "in vitro" (TAIWO *et al.*, 1999; CAI *et al.*, 2000; HO *et al.*, 2001a; HO *et al.*, 2001b; SUN *et al.*, 1996).

Vários estudos clínicos também já foram realizados, utilizando-se enxágue oral com extratos das plantas ou soluções obtidas a partir dos extratos ou de seus constituintes isolados (BUSSCHER *et al.*, 1992; VAN DER WEIJDEN *et al.*, 1998; TENENBAUM *et al.*, 1999; JAGTAP & KARKERA, 2000; GONZALEZ *et al.*, 2001), bem como a exposição direta a partes frescas das plantas, como casca, gravetos ou sementes (MIRANDA *et al.*, 1996; ADERINOKUN *et al.*, 1999; DAROUT *et al.*, 2000).

Yatsuda *et al.* (2005) comprovaram as propriedades antiplaca e anticárie do Guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*), uma planta indicada na medicina popular para problemas respiratórios. A ação terapêutica do Guaco foi confirmada mesmo em baixas concentrações, onde os autores verificaram que a planta foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de estreptococos do grupo mutans.

Li *et al.* (1997), e Tichy & Novak (1998) trabalharam com compostos antimicrobianos de plantas contra patógenos orais do homem. No estudo de Tichy & Novak (1998) obtiveram resultados satisfatórios também na extração e identificação destes compostos naturais.

Fernandes Filho *et al.* (1998) em outro estudo brasileiro avaliaram a atividade de um óleo essencial de uma planta nordestina, conhecidas por sua forte ação bactericida. Os autores puderam observar que tal óleo inibiu 12% e reduziu 6% da placa bacteriana da microbiota oral do homem.

Pinheiro (1987) avaliou o efeito dos extratos de guaraná e de *Stevia rebaudiana bertonii*, e do esteviosídeo sobre a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis e sobre a produção de ácidos de fermentação da placa dentária de crianças "in vitro". Tanto o extrato de guaraná quanto o de *Stevia rebaudiana bertonii* estimularam a fermentação da placa dentária "in vitro", porém, o extrato de guaraná não teve nenhuma ação inibitória sobre a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, ao contrário do extrato de *Stevia rebaudiana bertonii*. O esteviosídeo, por sua vez, inibiu significativamente a síntese de polissacarídeos insolúveis da placa dentária, apesar de não ter apresentado uma diminuição da fermentação da placa. Assim, o autor pode concluir que os produtos testados têm uma ação antiplaca, indicando-os na prevenção de patologias orais.

Segundo Wolinsky *et al.* (1996), alguns extratos aquosos de plantas medicinais podem reduzir a habilidade de alguns estreptococos em colonizar a superfície dentária, atuando como antiagregantes, porém sem inibição do desenvolvimento da bactéria, não predispondo a formação da placa bacteriana. No estudo realizado por Sun *et al.* (1996), houve inibição de 73,9% dos patógenos orais do homem (estreptococos, actinomicetes e bacteróides) ao utilizar uma planta do gênero *Flos* em uma concentração abaixo de 6,25 mg/ml. Dê uma olhada nas novas normas, pois ACHO que a forma correta de escrever agora é: 6,25mg. ml⁻¹.

A atividade antibacteriana da espécie *Drosera peltata*, por exemplo, foi estudada por Didry *et al.* (1998), pois as folhas dessa planta são normalmente usadas para higiene oral de nativos franceses. Através dos resultados, os autores puderam concluir que a planta pode ser usada no tratamento de infecções orais, pois o extrato inibiu o crescimento de bactérias cariogênicas tais como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus rattus*. Essas bactérias são moderavelmente resistentes a antibióticos e outros agentes antimicrobianos como o clorexidina, tornando os agentes fitoterápicos de grande auxílio na prevenção da cárie e da doença periodontal.

Outra planta usada na medicina tradicional coreana, indicada para doenças do trato digestivo é a *Curcuma xanthorrhiza*, que foi estudada por Hwang *et al.* (2000). Eles puderam comparar o efeito antimicrobiano contra patógenos orais, tendo o clorexidine como um controle positivo do extrato dessa planta. Os resultados mostraram uma alta inibição do crescimento de *Streptococcus* spp, podendo ser comparada com ação do clorexidine. Porém, outras bactérias orais tais como *Lactobacillus* spp se mostraram resistentes a esse extrato. Entretanto, o extrato estudado possuiu significativa atividade antibacteriana em geral, sendo indicado seu uso em procedimentos dentais e na prevenção de doenças periodontais.

Em um estudo brasileiro realizado por Modesto *et al.* (2001), verificaram que o uso de dentifício acrescido do extrato de *Calendula officinalis* não apresentou efeito antimicrobiano, independente da concentração e da origem do inóculo da saliva de bebês.

Num estudo realizado com extrato de cebola sobre agentes causadores da cárie e os principais agentes causadores da doença periodontal em pacientes humanos, demonstrou-se que houve decréscimo significativo sobre a atividade antimicrobiana (KIM, 1997).

Com o objetivo de isolar a substância responsável pela inibição do crescimento bacteriano de plantas, Park *et al.* (2003) isolaram do extrato metanólico de *Morus alba*, o composto chamado de "Kuwanon G". A atividade antimicrobiana contra patógenos orais dessa substância foi investigada ao realizar-se o teste da concentração inibitória mínima e da contagem de células viáveis. Assim, "Kuwanon G" inibiu o crescimento de várias bactérias orais, tais como: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*. A concentração inibitória mínima e o teste bactericida também foram determinados contra *Streptococcus mutans*, encontrando-se valores de 8 µg/mL e 20 µg/mL/min respectivamente. Além disso, esse agente causou marcado dano morfológico da parede celular bacteriana e condensação de seu citoplasma, observadas através de microscopia eletrônica.

Em um trabalho de revisão, Wu *et al.* (2001) relatam que na cultura de alguns países usam-se freqüentemente métodos simples e naturais de higienização oral, por serem disponíveis e de baixo custo. Na Ásia, África e algumas regiões da América as pessoas mastigam gravetos selecionados e preparados de ramos, hastes ou raízes de uma variedade de espécies de plantas. Quando de uso apropriado pode servir como um eficiente método de "escovação" dentária, remoção da placa e na prevenção de cáries devido a um efeito combinado de limpeza mecânica e salivação aumentada, sendo também sugerido que substâncias antimicrobianas oriundas destas plantas atuam contra uma variedade de microorganismos orais. Assim a Organização Mundial de Saúde (1987) também incentiva seu uso.

Um recente estudo clínico foi realizado por Almas & Al-Zeid (2004) com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de gravetos mastigatórios da planta Salvadora pérsica sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp presentes na saliva de voluntários humanos, que passaram por procedimentos diferentes, sendo divididos em quatro grupos: escovação com escova dental, mastigação dos gravetos, bochechos com o extrato da planta numa concentração de 50%, ou usando solução salina como grupo controle negativo. Assim, o nível de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp foi mensurado usando-se um kit comercial. Os resultados mostraram que houve uma grande redução de *Streptococcus mutans* em todos os grupos testados e quando comparamos os grupos, a redução dessa bactéria foi significativamente maior quando se usou o graveto mastigatório do que quando se usou a escova dental, porém, não houve redução significativa no *Lactobacillus* spp.

Muitos desses gravetos utilizados em alguns países na profilaxia e higiene dental têm mostrado ações antiplaca e antibacteriana em estudos científicos. Assim, Almas (2004) comparou o efeito antimicrobiano do extrato aquoso de dois gravetos mastigatórios (provenientes de plantas diferentes) em diferentes concentrações. Ambos os extratos foram

eficientes na concentração de 50% em inibir o crescimento de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus faecalis*, porém, um dos extratos foi mais efetivo em menor concentração contra *Streptococcus faecalis*.

Outro trabalho "in vivo" foi realizado por Bairy *et al.* (2002) ao testar o efeito da folha de manga na formação da placa subgengival em humanos. Cinquenta voluntários participaram do estudo clínico, divididos em dois grupos de 25 cada. No primeiro grupo, os voluntários usaram escova dental, e no segundo, usaram folhas de manga como cuidados de higiene oral. A avaliação microbiológica através da contagem específica de bactérias anaeróbicas presentes na boca foi feita antes e após todos os procedimentos em todos os voluntários. Assim, pode-se observar um decréscimo significativo na proporção de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* no grupo que usou as folhas de manga do que no grupo que utilizou a escova dental. Com isso, os autores concluíram que a folha de manga possui uma propriedade antibacteriana "in vivo" contra patógenos periodontais específicos, e que o uso dessas folhas em conjunto com a escovação dentária poderá ser um bom aliado na manutenção da higiene oral.

O efeito antibacteriano de cinco óleos essenciais contra cepas periodontopatogênicas foi analisado por Takarada *et al.* (2004) em humanos. Todos os óleos testados demonstraram alguma atividade antibacteriana, apresentando efeitos bactericida e bacteriostático. Além disso, todos os óleos inibiram a adesão de *Streptococcus mutans* e apenas alguns deles mostraram tal inibição nas cepas de *Porphyromonas gingivalis*. E para determinar uma concentração ideal não tóxica às células, os óleos foram testados sobre um cultivo celular (originárias de células endoteliais de veias umbilicais de humanos). Em uma concentração de 0,2%, os extratos tiveram um pequeno efeito no cultivo, por isso, os autores sugerem que nessa concentração, os óleos não causariam nenhum efeito colateral.

Iauk *et al.* (2003) também estudaram a atividade antibacteriana de seis plantas contra oito bactérias anaeróbicas e aeróbicas facultativas causadoras de problemas periodonticos em humanos. Após vários testes, os autores concluíram que houve uma maior atividade dos extratos etanólicos de *Hamamelis virginiana*, *Arnica Montana* e *Althaea officinalis* contra as bactérias testadas, sugerindo, portanto, o uso tópico dessas plantas no controle e profilaxia de periodontopatias.

Estudos clínicos em animais também têm demonstrado os efeitos benéficos de extrato de plantas quando utilizadas em enxágües orais, como um trabalho feito por Girão *et al.* (2001) no qual estudaram o efeito protetor do extrato etanólico de *Lippia sidoides*, conhecida popularmente como alecrim pimenta, nas gengivites marginais de cães. Após o tratamento com a planta, houve melhora significativa da saúde bucal, melhorando clinicamente o periodonto inflamado, prevenindo e auxiliando o tratamento da doença periodontal.

Essa mesma planta foi estudada em humanos por Fernandes Filho *et al.* (1998), onde houve a redução da placa bacteriana em torno de 6% dentre as pessoas estudadas.

Componentes de extratos de plantas foram estudados "in vivo" por Krahwinkel & Willerhausen (2000) com intuito de amenizar a inflamação da gengiva. Esses componentes foram disponibilizados sob a forma de caramelos para um dos grupos, enquanto que o outro recebeu apenas o placebo. As pessoas as mastigavam três vezes ao dia e depois se avaliava o grau de inflamação gengival. O grupo que recebeu o caramelo com o extrato do chá verde obteve um menor grau de inflamação, concluindo-se então, que houve influência positiva na redução da reação inflamatória das estruturas periodontais.

Além da atividade antibacteriana, as plantas também podem inibir a formação da placa dentária através de outros mecanismos. Elvin-Lewis (1980) além de estudar a inibição do crescimento de microorganismos de chás comerciais, analisou também "in vitro", o efeito desses chás na inibição da síntese de polissacarídeos intracelulares, na aderência de

microorganismos ao tubo, e na formação de glucanos. Todos os chás testados apresentaram alguma atividade inibitória da formação do biofilme dental, porém, o chá preto obteve a maior percentagem de inibição (50%) quando comparados aos outros chás. Como os taninos estão em maior quantidade nos chás pretos, os autores sugeriram que esses taninos teriam influenciado na formação de glucanos, por sua ação na glicosiltransferase, afetando assim, o crescimento de microorganismos e o armazenamento de polissacarídeos intracelulares.

Cury (1981) testou doze marcas de chás com o objetivo de determinar a concentração de fluoreto solúvel nesses chás, que variou de 2,6 a 3,1 ppm no chá mate e de 104 a 152 ppm nos chás pretos. Essa concentração de fluoreto determinada no chá mate foi considerada baixa, não tendo qualquer significado portanto, na prevenção da cárie. Entretanto, a concentração de fluoreto no chá preto pode ter significado na prevenção da cárie dentária.

Com o objetivo de comparar o efeito do chá e do mate comparado ao flúor na prevenção da cárie dentária em ratos, Lee (1986) realizou um estudo onde foram utilizados 60 ratos que se alimentavam de ração cariogênica, divididos em 5 grupos, que bebiam: água destilada (grupo 1), água destilada com 5 ppm de flúor (grupo 2), infuso de erva mate (grupo 3), infuso de chá preto (grupo 4) e infuso de chá verde (grupo 5). A concentração de flúor e o pH foram determinados em cada infuso. Houve redução da incidência de cárie na dentina (o que não ocorreu no esmalte) na proporção de 22,16% para o chá preto, 51,74 para o mate e 61,82 para o chá verde, sendo as duas últimas estatisticamente significante. Os autores puderam concluir que a evolução do processo carioso foi atenuada com o mate e os outros chás, independentemente do conteúdo de flúor em suas composições.

Outro estudo com o chá preto foi realizado por Ooshima *et al.* (1993) com o objetivo de avaliar seu efeito inibitório na indução da cárie dentária em ratos infectados com *Streptococcus mutans* comparados com ratos livres de patógenos específicos. O trabalho mostrou que o extrato de chá preto diminuiu significativamente o desenvolvimento da cárie e o acúmulo de placa nos ratos infectados. Os autores concluíram, portanto, que o extrato de chá preto (que contém polifenóis) inibe a síntese de glucanos insolúveis pela glicosiltransferase, aderência celular, e, conseqüentemente, a cárie, que depende desses fatores para sua instalação. Com isso, o extrato de chá preto poderia ser vantajoso para o controle da cárie dentária em humanos.

Usando o extrato do mesmo chá preto, Ooshima *et al.* (1994) examinaram o efeito do seu bochecho na deposição da placa dentária em humanos. O índice de placa foi calculado pelo método de Quigley e Hein, sendo a média de 1,97 por pessoa. Após apenas uma profilaxia dentária, os voluntários bochechavam extrato de chá preto na concentração de 0,5mg/mL durante quatro dias consecutivos, sendo realizados 9 vezes ao dia: antes e após as refeições, entre as refeições e antes de dormir. Além disso, no primeiro e no último dia, era coletado 1,5mL de saliva não estimulada para examinar o número total de estreptococcus por milímetro de saliva. Os resultados mostraram que os bochechos com extratos de chá preto reduziram significativamente a deposição da placa dentária quando comparado com o grupo controle, bem como diminuiu o índice de placa. Porém, não houve mudança significativa no número total de *Streptococcus mutans* na saliva. Assim, os autores concluíram que o extrato de chá preto inibiu significativamente a deposição da placa dentária, apesar de não ter efeito no número de estreptococos na saliva não estimulada.

Outras hipóteses sustentam a idéia de que o consumo de chás pode ser efetivo na redução do potencial cariogênico de comidas que contêm amido, reduzindo a tendência dessas comidas de servir como fonte de liberação lenta de carboidatos fermentáveis (ZHANG & KASHKET, 1998).

Yu *et al.* (1995) avaliaram os componentes do chá verde, e a sua relação com a resistência ácida do esmalte dentário humano, através da utilização de blocos de esmalte preparados de dentes humanos. Dentre as componentes do chá verde, foram determinados:

ácido tânico, catequina, cafeína e tocoferol. Os resultados mostraram que esses componentes foram efetivos, aumentando a resistência ácida, onde seus efeitos aumentaram drasticamente quando eram usados em combinação com fluoretos. Assim, os autores concluíram que em comparação aos fluoretos, os componentes orgânicos contidos no chá também são efetivos na proteção de esmalte dentário de ataques ácidos, sugerindo que a combinação de tanino e fluoreto pode ser proveitosa na adoção de medidas preventivas em odontologia.

Wu (2001) estudou o efeito do chá preto na redução da placa bacteriana, mostrando que componentes desse chá foram capazes de matar ou suprimir o crescimento bacteriano, bem como reduzir a produção de ácidos por bactérias presentes na placa dentária. Além disso, o chá produziu efeitos na enzima bacteriana glicosiltransferase, que converte açúcar em materiais que certas bactérias utilizam para se aderir aos dentes, perdendo portanto, a capacidade de formar agregados bacterianos e diminuindo assim, a massa total da placa dentária.

Yayli *et al.* (2005) estudaram além da composição, a atividade antimicrobiana de *Centaurea sessilis* e *Centaurea armena*. Os óleos das plantas testadas foram obtidos através de hidrodestilação das mesmas, onde sua composição foi analisada. Os autores encontraram 40 componentes no óleo de *Centaurea sessilis*, assim como foram identificados 20 componentes no óleo de *Centaurea armena*. O principal componente encontrado em ambas as plantas foi o beta-eudesmol, na proporção de 12,4% para *C. sessilis* e 19,3% para *C. armena*, substância que, de acordo com os autores, provavelmente foi a responsável pela inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Entretanto, não foi observada nenhuma atividade antifúngica.

O efeito antibacteriano de plantas tem sido estudado contra várias espécies bacterianas na medicina humana para tratar os mais diferentes tipos de infecções. Muito desses trabalhos podem ser extensivos à medicina veterinária, já que microorganismos em comum podem causar nos animais as mesmas doenças e os mesmos sintomas que causam em humanos. Com o objetivo de estudar as propriedades antibacterianas de algumas plantas usadas na medicina tradicional no México Alanis *et al.* (2005) selecionaram 26 plantas medicinais utilizadas para tratar distúrbios gastrointestinais. Oito diferentes espécies bacterianas encontradas no intestino foram utilizadas no teste, tais como: *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* e *Salmonella* spp. Os resultados mostraram que todos os extratos exibiram alguma atividade antibacteriana frente à, no mínimo, uma das cepas testadas, em uma concentração de 8mg/mL ou menos. Os extratos de *Caesalpinia pulcherrima*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum*, *Hippocratea excelsa* e *Punica granatum* tiveram a maior atividade antibacteriana contra a maioria dos patógenos testados, sendo que os extratos metanólicos foram mais ativos que os extratos aquosos. Essas plantas apresentaram uma atividade antibacteriana maior do que o cloranfenicol do grupo controle positivo, mas não excedeu a ação do trimetoprim. *Shigella sonnei* se mostrou sensível a quase todos os extratos. Com isso, os autores concluíram que esses chás podem ter uma eficácia muito boa contra diarreias e enterites causadas por esses agentes infecciosos.

Uma das distúrbios gástricas mais comuns é a gastrite. Dentre as várias causas possíveis que determinam o seu aparecimento está o crescimento exagerado da bactéria *Helicobacter pylori*, normalmente encontrada no estômago de animais e humanos. Muitas plantas usadas para tratar problemas gástricos têm sido analisadas quanto a sua atividade antibacteriana contra essa bactéria. Nostro *et al.* (2005) estudou o efeito do extrato etanólico ou aquoso de 17 plantas contra uma cepa padrão de *H. pylori* e onze cepas isoladas, usando o teste de difusão em disco, além de determinar a concentração inibitória mínima de cada planta que apresentou algum efeito antibacteriano. Os resultados demonstraram uma grande atividade na maioria das plantas estudadas, onde a concentração inibitória mínima dos

extratos etanólicos foram de duas a quatro vezes maior do que os extratos aquosos. O extrato de *Cuminum cyminum* em particular, apresentou a maior inibição do crescimento da bactéria, onde sua concentração inibitória mínima foi de 0,075mg/mL. Os autores concluíram que os extratos testados podem auxiliar no tratamento de infecções causadas por *Helicobacter pylori*, bem como, podem contribuir no desenvolvimento de uma nova e eficaz droga contra esse agente. Ochi *et al.* (2005) também estudaram a ação inibitória do extrato de *Santalum album* sobre cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a claritromicina. Além disso, os autores extraíram oito substâncias contidas nessa planta com o objetivo de testá-las individualmente. Onze substâncias foram identificadas no extrato, onde todas elas apresentaram alguma ação inibitória no crescimento da bactéria testada.

Romero *et al.* (2005) estudaram as propriedades antibacterianas de remédios naturais usados normalmente no sul do Texas, indicadas no tratamento de feridas e infecções. Vinte e três plantas foram selecionadas, onde extratos aquosos e tinturas etanólicas foram preparadas de cada planta. Para análise das propriedades antimicrobianas das plantas, o Teste de Difusão em Disco foi realizado, utilizando-se grupo controle negativo (solvente somente) e positivo (discos impregnados com antibióticos) frente a três espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Houve inibição do crescimento bacteriano nos discos impregnados com os extratos etanólicos, formando halos ao seu redor, que variaram de 1 a 5mm de diâmetro. Dez plantas apresentaram grande atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, e nove das vinte e três plantas produziram a mesma atividade contra as outras espécies testadas. As zonas de inibição formadas pelos discos de antibióticos do grupo controle positivo foram, de uma maneira geral, maiores e mais uniformes que os halos produzidos pelas plantas. Os autores concluíram então que os remédios naturais testados neste trabalho e utilizados na medicina popular no Texas são potencialmente efetivos agentes antibacterianos, principalmente contra *Staphylococcus aureus*.

Steenkamp *et al.* (2004) estudaram também as propriedades cicatrizantes e antibacteriana de plantas utilizadas no Sul da África para tratar feridas. Os autores utilizaram cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* testando nove extratos aquosos e metanólicos. Os extratos de *Terminalia sericea* e *Gunnera perperna* obtiveram maior atividade antibacteriana contra *S. pyogenes* e *S. aureus* quando comparados com os outros. Entretanto, nenhum extrato estimulou o desenvolvimento de fibroblastos. Concluiu-se então que as plantas não estimulam a cicatrização, apenas podem agir controlando a infecção local.

Algumas cepas bacterianas são capazes de produzir certas enzimas que impedem a ação de alguns antibióticos que normalmente a combateriam. Essa característica torna a espécie bacteriana resistente a ação de antibióticos, tornando mais difícil o tratamento. Isso ocorre por exemplo, com cepas de *Staphylococcus aureus*, que podem produzir enzimas chamadas de beta-lactamases, que hidrolizam um ou vários antibióticos do grupo beta-lactâmicos, conferindo à essa bactéria, resistência a sua ação. Assim, Agil *et al.* (2005) estudaram a atividade antibacteriana de plantas indianas contra cepas isoladas de *Staphylococcus aureus* produtoras de beta-lactamase e comprovadamente resistentes a antibióticos beta-lactâmicos. A ação sinérgica de antibióticos com as plantas também foi estudada. Os extratos das plantas *Camellia sinensis*, *Delonix regia*, *Holarrhena antidysenterica*, *Lawsonia inermis*, *Punica granatum*, *Terminalia chebula* e *Terminalia belerica* mostraram um amplo espectro de atividade antibacteriana, com halos de inibição do variando de 11 a 27mm. O extrato de *Ocimum sanctum* mostrou melhor atividade contra a cepa de *S. aureus* resistente, enquanto *Allium sativum* e *Citrus sinensis* mostrou nenhuma ou pouca atividade. Alguns componentes foram extraídos das plantas que apresentaram atividade antibacteriana e classificados como: alcalóides, glicosídeos, flavonóides, fenóis e saponinas,

sendo que os fenóis e os flavonóides foram os componentes que demonstraram maior atividade.

Nostro *et al.* (2004) estudaram a ação antibacteriana do extrato etanólico de *Helichrysum italicum* sobre cepas bacterianas padrão de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis*. Além disso, os autores avaliaram a influência desse extrato na aderência sacarose dependente na superfície do vidro e a agregação celular de *Streptococcus mutans*. Os resultados mostraram que todas as cepas bacterianas estudadas foram susceptíveis ao extrato etanólico da planta, com a concentração inibitória mínima variando de 31,25 a 62,5 µg/mL. O extrato também foi capaz de diminuir em quase 90% a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície do vidro, além de afetar também a agregação bacteriana. Com esses resultados, os autores concluíram que há um interesse considerável em usar componentes naturais como métodos alternativos no controle de variados microorganismos.

Uma substância chamada bakuchiol, isolada das sementes e das folhas da planta *Psoralea corylifolia* Linn, natina da China foi estudada por Katsura *et al.* (2001) com o objetivo de estudar melhor "*in vitro*" sua propriedade antimicrobiana e seus efeitos na formação da placa dentária, já que essa planta é utilizada e indicada na medicina tradicional oriental para patologias orais. Foram utilizadas dezoito cepas bacterianas padrão de bactérias presentes na cavidade oral de humanos, tais como *Streptococcus* spp, *Lactobacillus* spp e *Porphyromonas* spp. Frente aos testes realizados, bakuchiol demonstrou efeito bactericida contra todas as cepas testadas, onde a Concentração Inibitória Mínima variou de 1 a 4 µg/mL. Além disso, essa substância foi também efetiva contra a aderência celular de *Streptococcus mutans* na superfície do vidro e a formação de glucano insolúvel na presença de sacarose, inibindo também a redução de PH em ambos os casos. Assim, os autores sugerem que o uso do bakuchiol poderá ser um componente eficaz para o desenvolvimento de agentes antibacterianos contra patógenos orais, tendo além disso, um ótimo potencial para uso como aditivos alimentares e enxágües orais para prevenir e tratar a placa e cárie dentária.

Extratos de 13 plantas brasileiras foram estudados por Holetz *et al.* (2002) com o objetivo de avaliar a atividade dessas plantas contra bactérias e fungos. De todas as plantas, 10 apresentaram variados níveis de atividade antibacteriana, tais como: *Piper regnellii* contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, *Punica granatum* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Psidium guajava* apresentou pouca atividade contra *Staphylococcus aureus* e as outras cepas testadas. Das dez plantas que apresentaram alguma atividade, cinco apresentaram substâncias em comuns na extração de seu princípio ativo, três delas pertencentes a mesma família Asteraceae. Além da atividade antibacteriana, uma ação antifúngica (contra *Candida* spp) foi descrita em nove das treze plantas estudadas.

Quatro componentes antibacterianos foram isolados da folha da goiabeira (*Psidium guajava*) de acordo com Arima & Danno (2002). Os autores identificaram quatro flavonóides (dois novos e dois conhecidos) baseados em testes químicos e de espectroscopia. A concentração inibitória mínima dos dois novos compostos isolados foram de 200 µg/mL para *Salmonella enteritidis* e de 250 µg/mL e 300 µg/mL para *Bacillus cereus*.

Hu *et al.* (2000) estudaram o efeito antibacteriano da *Coptidis rhizoma*, uma planta utilizada na medicina tradicional japonesa para tratar afecções orais. O extrato foi preparado por fervura da planta em água durante duas horas. Alcalóides foram identificados na planta, analisados por cromatografia e testados contra bactérias orais ao se determinar a concentração inibitória mínima e a inibição da atividade proteolítica bacteriana. O extrato foi capaz de inibir o crescimento de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp, *Actinomyces* spp e *Actinobacillus* spp, (com uma variação de 0,031 a 0,25 mg/mL na concentração inibitória mínima) porém, teve menos efeito antibacteriano contra *Streptococcus* spp e *Lactobacillus* spp. Na menor concentração inibitória mínima, o extrato teve atividade bacteriostática

enquanto que na maior concentração, sua atividade foi bactericida. Além disso, houve inibição de um alcalóide extraído da planta da atividade da enzima colagenase. Os autores concluíram, que o extrato testado foi capaz de inibir significativamente o crescimento de bactérias periodontopatogênicas, sugerindo portanto, a utilização desse extrato em aplicações clínicas para tratar doenças periodontais.

2.5. Outros Produtos Naturais

Estudos tem mostrado a ação de vários remédios naturais usados na medicina moderna para auxiliar e combater diversos tipo de infecções. Entre eles, se encontra a própolis, que de acordo com Castaldo & Capasso (2002), possui vários efeitos tais como: antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiinflamatório, antipirético, cicatrizante e imunomodulador.

Vicente & Hirooka (1987) estudaram a atividade antimicrobiana da própolis, “*in vitro*”, contra alguns microorganismos da cavidade oral do homem. Os fungos não foram inibidos pela própolis, porém, apresentou efeito bacteriostático. Em *Streptococcus pyogenes* houve inibição da produção de hemolisina e efeito bactericida em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI).

Em outro trabalho brasileiro, Santos *et al.* (2002) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato da própolis oriundo de Minas Gerais contra nove cepas de bactérias anaeróbias causadoras da periodontite humana. Todas as espécies bacterianas analisadas se mostraram susceptíveis ao extrato de própolis, indicando assim, uma atividade antibacteriana considerável, sugerindo que sua ação se deve a um efeito sinérgico de muitos componentes presentes no extrato de própolis, especialmente os flavonóides.

Koo *et al.* (2000) também estudaram a atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias orais, inibição da formação de glicana insolúvel (produzida pelo *Streptococcus mutans* e importante para a formação da placa dentária), de uma associação de extratos de própolis e da *Arnica montana*, normalmente usada por pessoas com infecções orais e feridas em geral. Os resultados se mostraram satisfatórios em todas as 15 cepas estudadas, havendo inibição em diferentes graus em todos os parâmetros testados.

3. OBJETIVOS

- Isolar e identificar a microbiota presente na cavidade oral de cães, para que as bactérias isoladas sirvam de referência fisiológica no teste de difusão em disco e na microdiluição.
- Avaliar a atividade antimicrobiana "*in vitro*" de extratos de plantas e de amostras de produtos comerciais, sobre cepas padrão de bactérias encontradas na cavidade oral de cães.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) daqueles extratos que apresentaram alguma atividade antibacteriana no Teste de Difusão em Disco (TDD).

4. METODOLOGIA

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ. Devido à grande diversidade microbiológica oral canina, optou-se em fazer primeiramente, um levantamento das principais bactérias aeróbias presentes na cavidade oral dos cães.

4.1. Levantamento Microbiológico

4.1.1. Coleta, processamento e isolamento das amostras

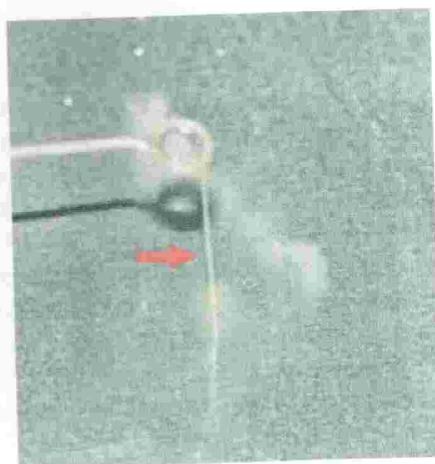
Utilizaram-se 16 cães sem raça definida, provenientes do canil da Sociedade Protetora dos Animais de Volta Redonda (SPA-VR), onde, através de swabs estéreis, foram coletadas amostras da cavidade oral de cães neonatos, aos 45 dias de vida, aos 6 meses de idade e com 1 ano, em diferentes sítios orais tais como: gengiva, língua, dentes e saliva.

As amostras foram plaqueadas em agar Mitis-salivarius, Baird Parker e agar Sangue. Após incubação em aerobiose a 37° C por 24 a 48 horas, observou-se intenso crescimento bacteriano, especialmente em agar Sangue e Baird Parker, com colônias diferenciadas tanto no tamanho quanto no aspecto e coloração, com o aparecimento de hemólise completa e incompleta de colônias em agar sangue.

4.1.2. Identificação presuntiva

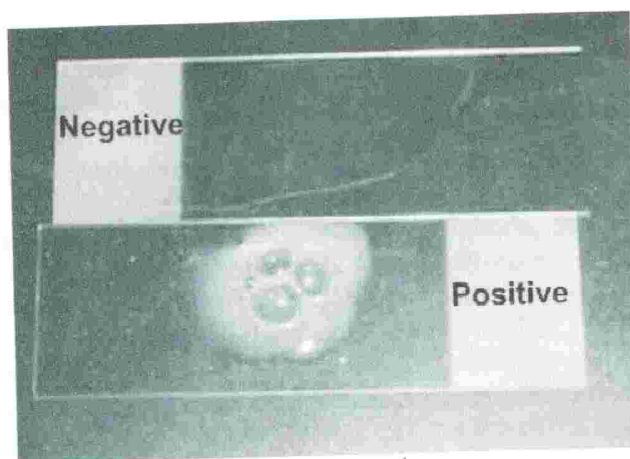
- Coloração de Gram.
- Hidróxido de Potássio a 3%.
- Prova da Catalase.

A identificação presuntiva das colônias isoladas consistia na bateria de coloração de Gram, realizada após o período de incubação de 24 horas, para observação das características morfotintoriais. Após esta etapa, a prova de hidróxido de potássio (KOH) a 3% era aplicada, onde o resultado positivo era verificado pela formação de um gel viscoso, caracterizando bactérias Gram-negativas (Figura 1). Por fim, realizava-se o teste da catalase, onde em uma lâmina de vidro, uma gota de suspensão bacteriana era colocada, com o auxílio de alça de platina, e adicionada de uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O resultado positivo era caracterizado pela produção de bolhas de gás (Figura 2), devido à quebra, pela enzima catalase, da substância adicionada (TORTORA *et. al*, 2003).



www.science.nhmccd.edu

Figura 1: Prova do Hidróxido de Potássio (KOH) a 3% positiva, mostrando a formação de um gel viscoso.



www.apsnet.org/

Figura 2: Prova da catalase positiva com produção de bolhas de gás e a negativa sem a produção.

Após essa triagem, testes mais específicos de identificação foram usados para diferenciação entre espécies bacterianas tais como: hidrólise da esculina, Voges-Proskauer e fermentação do sorbitol para *Streptococcus* spp e prova da coagulase, resistência a bacitracina, redução de nitratos e Voges-Proskauer para *Staphylococcus* spp.

4.1.3. Identificação de *Staphylococcus* spp

- Prova de Coagulase.
- Resistência a Bacitracina
- Prova de Voges-Proskauer
- Fermentação de Maltose
- Redução de Nitratos

As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp eram identificadas pela apresentação de cocos Gram-positivos ao microscópio ótico, resultado negativo na prova de KOH e do teste de catalase positivo. Após essa rotina, era inoculado em Ágar Manitol Vermelho de Fenol e posteriormente procedia-se o teste de coagulase. Este teste era feito a partir da inoculação do crescimento bacteriano obtido em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), incubado a 37 °C por 24 horas. 0,1 mL da suspensão bacteriana era inoculado em 0,5 mL de sangue total de coelho, acrescido de uma solução de citrato a 3% e incubada a 37 °C por 6 horas para a visualização do coágulo (KONEMAN *et al.*, 2001). Para os isolados coagulase-positivos, eram realizados os testes de Voges-Proskauer, redução de nitratos e fermentação da maltose para diferenciação das espécies. Os isolados coagulase-negativos eram submetidos a prova de resistência a bacitracina para diferenciação com o gênero *Micrococcus* spp.

4.1.4. Identificação de *Streptococcus* spp

- Prova de hidrólise da esculina
- Prova de Voges-Proskauer
- Fermentação de Sorbitol

As bactérias do gênero *Streptococcus* spp eram identificadas pela apresentação de cocos Gram-positivos ao microscópio ótico, resultado negativo na prova de KOH e teste de catalase negativo. Os isolados eram submetidos aos testes supracitados para diferenciação das espécies de interesse.

4.2. Seleção e Preparo das Amostras para Execução dos Ensaios

Após análise dos dados obtidos do levantamento efetuado, da revisão de literatura feita e de informações obtidas com especialistas da área, optou-se em trabalhar com quatro cepas padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mitis* (ATCC 903), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Estas foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) do Rio de Janeiro. As amostras vinham liofilizadas em ampolas próprias, e no fluxo laminar eram abertas por serragem do vidro da ampola e suspensas com a adição de 0,3 mL do meio de cultura na forma líquida indicado para cada bactéria. Para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizado o caldo Trypticase Soja, para *Streptococcus mitis* (ATCC 903) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi utilizado o caldo Trypticase Soja acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril, e para *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) utilizou-se caldo nutriente com 5% de sangue de coelho desfibrinado estéril. A suspensão final de cada bactéria foi dispensada nos mesmos meios de cultura utilizados para a suspensão, porém na forma sólida (agar). Todas as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 a 48 horas. Após crescimento das colônias e realização dos testes pertinentes, as bactérias foram estocadas em freezer a - 5 °C em caldo nutriente com 20% de glicerol.

As amostras das cepas padrão foram inoculadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas antes da realização dos ensaios, para que todas estivessem em fase exponencial de crescimento durante o experimento.

Após o período de incubação, verificou-se crescimento bacteriano através da turvação do caldo BHI, onde, a partir dele, foram realizadas 3 diluições de acordo com a metodologia indicada por Mann & Markam (1998). As diluições foram feitas retirando-se 0,2 mL do caldo BHI incubado e acrescentando a 0,8 mL do caldo BHI estéril, se sucedendo da mesma

maneira no terceiro tubo, de modo que a solução final ficasse com uma concentração bacteriana ideal para a realização do TDD.

4.3. Extratos de Plantas e Amostras de Produtos Naturais

Através de indicações dos pesquisadores do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), foram selecionadas nove extratos de plantas brasileiras a serem testadas, preparadas e fornecidas pelo NPPN da UFRJ, de acordo com a disponibilidade de cada planta. Todos os extratos foram fornecidos liofilizados e solúveis em solução aquosa.

As espécies selecionadas e testadas foram: *Psidium guajava* (goiaba), *Ipomoea batatas* (batata doce), *Sedum dendroideum*, *Eleusine indica*, *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe brasiliensis*, *Kalanchoe gastonis-bonnieri*, *Ludwigia nervosa* e *Mimosa xanthocentra*.

Além desses, foram testados extratos comerciais fornecidos pela Grindélia farmácia de manipulação: óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), extrato de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) e extrato de alho (*Allium sativum*), compostos esses com atividade antimicrobiana conhecida, porém, que não foram ainda testados contra bactérias da cavidade oral.

Para que todos os extratos ficassem com uma concentração padrão, os líofilos foram solubilizados com água destilada proporcionalmente para cada peso de massa, de modo que todos ficassem com uma concentração final de 200mg/mL. Após a solubilização, o extrato foi esterilizado por filtração com Micropore 0,22 µm em filtro laminar, e posteriormente estocados em freezer. Para os extratos comerciais, a concentração pré-determinada pelo o fabricante também foi de 200mg/mL, onde o veículo desses extratos foi testado como grupo controle negativo.

4.4. Avaliação “in vitro”

4.4.1. Teste de difusão em disco

Para determinação da suscetibilidade das amostras bacterianas frente aos extratos fitoterápicos foi utilizada metodologia recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). As suspensões das bactérias a serem testadas foram preparadas através de lavagem e diluição na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/ml, distribuindo-se 0,2mL do inóculo sobre as placas em meio sólido (ágar Mueller Hinton).

Foram distribuídos 10 µl de cada extrato (na concentração de 200 mg/mL), em discos de papel de filtro estéreis Whatman número 2, com 6mm de diâmetro e dispostos na superfície de cada ágar previamente inoculado. Após incubação por 24 horas a 36°C, os diâmetros da zona de inibição ao redor do depósito do extrato foram observados e medidos. Além disso, foram feitos dois tipos de controles: o positivo e o negativo. No controle positivo, foram utilizados discos de penicilina para *Streptococcus* spp. e discos de vancomicina para *Staphylococcus aureus*. E nos controles negativos, os discos de papel filtro foram impregnados com 10 µl de água destilada (no caso dos extratos das plantas) ou 10 µl do veículo hidro-alcoólico (no caso dos extratos comerciais).

4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, foi utilizado a metodologia de microdiluição em poços empregada por Mann & Markam (1998) para aqueles extratos em que houve alguma atividade antibacteriana.

Foram realizadas diluições do extrato em base 2, utilizando como diluente água destilada, da seguinte maneira: foi colocado 200µl de água destilada em 9 tubos eppendorf estéreis e, no primeiro tubo eppendorf, adicionou-se 200 µl do extrato (a 200mg/mL). A mistura foi bem homogenizada, passando-se posteriormente, 200 µl ao tubo seguinte até a diluição de 1/512.

Após a microdiluição, foram feitos poços com 0,5 cm de diâmetro nas placas contendo Agar Mitis-salivarius (para *Streptococcus* spp) e ágar Mueller Hinton (para *Staphylococcus aureus*) previamente inoculados com a bactéria a ser testada. Esses poços foram preenchidos com 30 µl de cada diluição do extrato a ser testado, bem como adicionando 30 µl de água destilada no poço controle negativo, e 30 µl de extrato puro no poço controle positivo.

Após incubação de 24 a 48 horas a 37°C, os halos de inibição da atividade bacteriana puderam ser medidos, e a CIM determinada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do Teste de Difusão em Disco e da Concentração Inibitória Mínima estão discriminados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Teste de Difusão em Disco e Concentração Inibitória Mínima de extratos de plantas sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Staphylococcus aureus*, presentes na cavidade oral de cães.

na cavidade oral de caes		Microorganismos								H
Planta	1		2		3		4			
	TDD mm	CIM	TDD mm	CIM	TDD mm	CIM	TDD mm	CIM		
Extratos brutos										
<i>Psidium guajava</i>	(-)	-	(-)	-	(-)	-	11	6,25	10	
<i>Sedum dendroideum</i>	(-)	-	(-)	-	7	200	(-)	-	8	
<i>Kalanchoe pinnata</i>	7	200	8	200	8	50	(-)	-	9	
<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	10	200	11	200	17	50	(-)	-	8	
<i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	12	200	9	200	20	50	(-)	-	9	
<i>Ludwigia nervosa</i>	(-)	-	(-)	-	(-)	-	10	100	10	
<i>Ipomoea batatas</i>	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	
<i>Eleusine indica</i>	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	
<i>Mimosa xanthocentra</i>	(-)	-	(-)	-	6	200	8	200	(-)	
Extratos Comerciais										
<i>Copaifera langsdorffii</i>	10	12,5	25	6,25	15	50	8	12,5	(-)	
<i>Maytenus ilicifolia</i>	(-)	-	(-)	-	7	100	7	50	(-)	
<i>Allium sativum</i>	8	100	7	200	10	200	9	200	(-)	
Veículo	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	

1 : *Streptococcus mitis*

2 : *Streptococcus mutans*

3 : *Streptococcus oralis*

4 : *Staphylococcus aureus*

TDD: teste de difusão em disco

H: hemólise

CIM: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL).

(-) : resultado negativo

- : teste não realizado

As espécies bacterianas isoladas da cavidade oral de cães condizem com as espécies referenciadas na literatura (WIGGS & LOBPRIDE, 1997), com predominância das bactérias Gram positivas. Como o isolamento bacteriano foi feito através de swabs orais de cães filhotes e clinicamente sadios. A cultura em anaerobiose não foi realizada, pois quando filhotes, a proporção de bactérias anaeróbias é baixa (quando comparadas às bactérias aeróbias), sendo julgadas, portanto, de pouca importância nessa faixa etária. Além disso, nenhuma alteração periodontal séria foi verificada nos cães.

Em cães neonatos, prevaleceu o grupo de estreptococcus orais: *Streptococcus mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* (Figura 3). Enquanto nos animais de 45 dias, houve uma significativa mudança na população microbiana, que se tornou mais heterogênea, com a introdução de *Bacillus* spp e *Candida* spp.

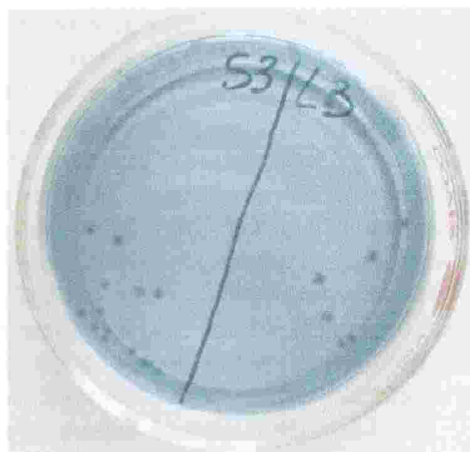


Figura 3: *Agar Mitis Salivarius* mostrando o crescimento de colônias de *Streptococcus* spp isoladas da saliva (S3) e da língua (L3) de cães com 6 meses de idade.

Não houve grandes diferenças na microbiologia oral dos cães com faixa etária de 6 meses e 1 ano de vida, onde pode-se observar um aumento na proporção de *Staphylococcus* spp, sendo identificados como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*, além dos estreptococcus orais (*Streptococcus mitis*, *S. salivarius* e *S. mutans*), *Bacillus* spp e *Candida* spp. Algumas características morfológicas bacteriana foram identificadas através do Gram, e presumidamente identificadas como pertencentes ao gênero *Corynebacterium* spp e *Actinomyces* spp.

Características morfológicas distintas foram observadas em colônias em agar sangue, isoladas de diferentes sítios orais de cães, como mostra a Figura 4.

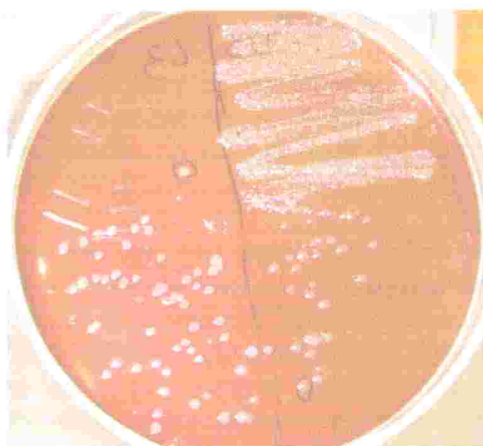


Figura 4: Colônias bacterianas isoladas em Agar sangue mostrando colônias não hemolíticas com características morfológicas diferentes, isoladas da língua e do dente de cães com 45 dias de vida.

Muitas plantas estudadas no mundo inteiro são facilmente encontradas no Brasil tais como a mangueira (*Mangifera indica*) e a goiabeira (*Psidium guajava*), estudadas por Bairy et

al. (2002) e Arima & Danno (2002) respectivamente. Em ambas as plantas, os autores encontraram grande atividade inibitória do crescimento bacteriano. A goiaba (*Psidium guajava*), em especial, tem sido indicada na medicina popular e tradicional para diferentes distúrbios, tais como: diarreias, processos infecciosos, dores de estômago, entre outros (OLAJIDE *et al.*, 1999), e vários trabalhos já comprovaram seu efeito antimicrobiano contra as seguintes espécies: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, etc. (DIDRY *et al.*, 1998; ABDELRAHIM *et al.*, 2002).

No presente trabalho, apesar da mangueira não ter sido estudada, pode-se confirmar a propriedade antibacterina da *Psidium guajava*, demonstrando sua atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Figura 5), não inibindo, entretanto, as outras espécies de *Streptococcus* spp. Como essas duas plantas são facilmente encontradas em todo território nacional, temos à disposição uma grande “farmácia natural” que poderá nos auxiliar na prevenção e controle de muitas doenças orais.

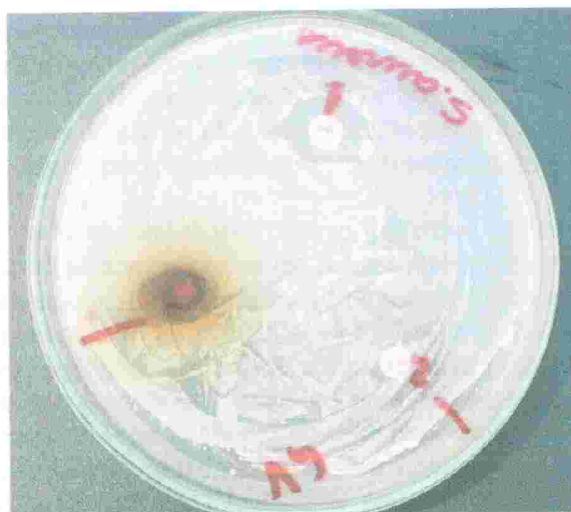


Figura 5: Teste de Difusão em disco do extrato de goiaba frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em Agar Mueller Hinton. A inibição do crescimento bacteriano do grupo controle positivo com vancomicina (1) foi menor do que a ação inibitória do extrato (3)

Holetz *et al.* (2002) por sua vez, não encontraram uma inibição no crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* por *Psidium guajava* tão marcante quanto o encontrado nesse trabalho e também por Arima & Danno (2002). Provavelmente, essa diferença nos resultados pode ser explicada pela diferença de concentração do extrato da planta que foi utilizado no teste de difusão em disco. De qualquer maneira, a atividade antibacteriana foi confirmada nos três trabalhos, fazendo da *Psidium guajava* uma planta com um alto potencial antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, sugerindo estudos clínicos visando sua utilização em processos infecciosos onde há o envolvimento desse agente. Como, de acordo com Arima & Danno (2002), foram identificados flavonóides na constituição dessa planta, sugere-se que essas substâncias podem ser consideradas como as responsáveis por esse efeito inibidor do crescimento bacteriano.

Ahmed *et al.* (2005) ao testar a ação antibacteriana de *Ludwigia adscendenses* contra *Staphylococcus aureus* não encontrou nenhuma atividade. No presente trabalho, a planta *Ludwigia nervosa*, pertencente ao mesmo gênero da planta referida anteriormente apresentou

atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Essa diferença de atividade pode ser explicada pela diferença da espécie da planta que foi testada nos dois trabalhos, o que nos sugere uma possível diferença entre seus compostos e constituintes, levando assim, a um resultado final diferente ao se testar plantas do mesmo gênero.

Além disso, deve-se pensar também que inúmeros são os fatores que podem interferir em uma possível atividade de uma planta, como por exemplo, as características físicas e climáticas da região onde ela foi coletada, o tipo de solo em que a planta se encontra, o modo de preparo do extrato final, a presença de pragas, etc. Todos esses fatores podem influenciar de uma certa maneira, há atividade de uma planta, seja antibacteriano ou não.

Algumas cepas bacterianas testadas nesse trabalho não estão presentes somente na cavidade oral, podendo causar doenças e infecções em outros órgãos e locais. É o caso, por exemplo, do *Staphylococcus aureus* uma bactéria que está presente tanto na boca quanto em feridas de pele, nas mamas ou até mesmo nas pneumonias. Assim, os extratos de plantas que demonstraram alguma atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* poderão supostamente ser utilizados de alguma forma no controle da maioria das infecções causadas por esse agente, ou seja, um mesmo extrato poderá servir tanto para controlar infecções orais causadas por *Staphylococcus aureus* quanto para tratar feridas causadas por esse mesmo agente etiológico, como relataram Romero *et al.* (2005) e Steenkamp *et al.* (2004) ao testar extratos de plantas normalmente utilizadas para tratar feridas frente ao *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, duas espécies bacterianas presentes tanto na cavidade oral quanto em feridas.

Estudos futuros poderão ser feitos com o objetivo de ampliar os testes de sensibilidade das plantas avaliadas para outras espécies bacterianas presentes na cavidade oral, como as bactérias anaeróbias, que em cães adultos com periodontite instalada pode chegar a 95% dos microorganismos presentes na boca (WIGGS & LOBPRISE, 1997). Com isso, poderá haver uma ampliação dessa atividade antibacteriana, possibilitando um controle mais eficaz no aparecimento de desordens e infecções periodontais quando utilizarmos esses extratos. Ao melhorar a saúde oral dos cães, promove-se secundariamente, uma melhora na saúde geral desse animal, pois uma lesão oral que tem como característica um processo infeccioso envolvendo muitas bactérias funciona como porta de entrada para a instalação de várias doenças sistêmicas graves tais como a insuficiência renal e hepática, as artrites sépticas, as endocardites e até mesmo as encefalites.

O uso de substâncias antimicrobianas ou antisépticas na cavidade oral de cães com doença periodontal grave não é capaz de controlar a grande infecção instalada, pois as placas e os cálculos dentários formados dificultam a ação dessas substâncias, funcionando como verdadeiras barreiras de proteção aos microorganismos. Assim, o uso tópico de qualquer substância antibacteriana em enxágües orais deve ter uma característica de prevenção da ocorrência desses processos infecciosos, devendo ser utilizados, portanto, antes da formação do biofilme bacteriano e do aparecimento de periodontites na higienização oral dos cães ou após a remoção cirúrgica das placas e cálculos dentários.

Como se observou no teste de difusão em disco, não houve crescimento das cepas padrão de *Streptococcus* spp em ágar Mueller Hinton. Como a técnica proposta pelo NCCLS não faz restrições ao meio de cultura quanto ao gênero ou espécie bacteriana a ser avaliada (sendo portando um meio padrão), ao se testar as cepas padrão *Streptococcus mitis* (ATCC 903), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), deve-se utilizar um meio seletivo para estreptococos tal como ágar Azida ou um meio enriquecido, com o objetivo de termos um crescimento adequado das bactérias, tornando o teste viável. No atual trabalho, tentou-se utilizar o agar sangue, porém, as espécies de *Streptococcus* spp avaliadas eram todas hemolíticas, alterando os resultados tanto do Teste de Difusão em Disco quanto o da microdiluição em poços. Portanto, foi utilizado o Agar Mitis Salivarius (Figura

6), um meio enriquecido e seletivo para estreptococos orais, havendo crescimento suficiente para a leitura dos testes após, entretanto, 48 h de incubação em estufa a 37°C.



Figura 6: Teste de difusão em Disco do extrato de goiaba frente ao *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), em agar mitis salivarius. Somente o grupo controle positivo (penicilina) pode inibir o crescimento bacteriano.

Wan *et al.* (2002) compararam cinco meios seletivos para o crescimento de *Streptococcus mutans*: o agar mitis salivaris com bacitracina (MSB), agar mitis salivaris com kanamicina e bacitracina (MSKB), Agar Glicose sacarose telurito bacitracina (GSTB), agar tripticase soja sacarose bacitracina (TSSB) e agar tripticase “fermento” cisteína sacarose bacitracina (TFCSB). De todos esses meios, os mais sensíveis e seletivos para o crescimento bacteriano foram: o TFCSB e o TSSB, precedido do MSB. Assim o uso de agar Mueller Hinton como meio base para crescimento de *Streptococcus mutans* não é indicado.

A planta *Kalanchoe brasiliensis*, também conhecida como folha-da-fortuna ou folha-grossa, é empregada na medicina no tratamento de infecções pulmonares e gniturinárias, além de auxiliar no tratamento tópico de queimaduras, feridas, úlceras de pele, verrugas e ter ação antihistamínica (ALMEIDA *et al.*, 1997). Suas propriedades terapêucas são: antimicrobiana, hipotensora e antiinflamatória. A ação antimicrobiana foi confirmada nesse trabalho, ao inibir o crescimento de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. O mesmo ocorreu com *Kalanchoe gastonis-bonnieri* e *Kalanchoe pinnata*, plantas pertencentes a mesma família (Crassulaceae), esta última muito conhecida e requisitada pela sua beleza, sendo uma das flores mais compradas em todo Brasil, e usadas no tratamento da gastrite, furúnculos. Além disso, *Kalanchoe pinnata* possui grandes propriedades medicinais, tais como: analgésica, antitérmica, depurativa, cicatrizante e anti-leshmania (SILVA *et al.*, 1999). Por inibir o crescimento de *S. mutans*, mais uma indicação terapêutica das plantas *Kalanchoe brasiliensis*, *Kalanchoe gastonis-bonnieri* e *Kalanchoe pinnata* deverá ser acrescentada: a ação anti-cárie. Porém, antes da planta ser usada em enxágües orais, seu efeito tóxico deverá ser investigado, pois plantas do gênero *Kalanchoe* são consideradas plantas tóxicas, e seu uso contínuo pode causar hipotiroidismo em humanos (LORENZI & ABREU, 2002). Um grande efeito hemolítico pode ser observado no Teste de Difusão em Disco, usando como meio de cultura o agar sangue. Ao redor dos discos de papel filtro embebidos nos extratos de *Kalanchoe brasiliensis*, *Kalanchoe gastonis-bonnieri* e *Kalanchoe pinnata*, pode-se observar um grande halo de hemólise, indicando portanto, um possível efeito tóxico (Figura 7).

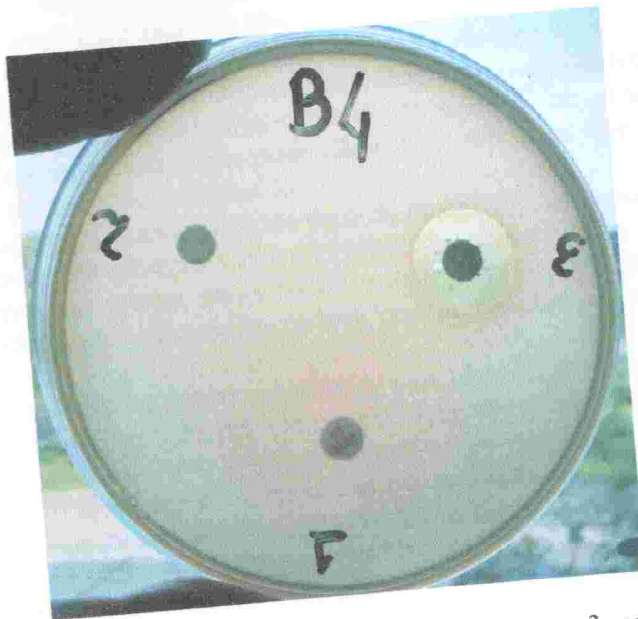


Figura 7: Halo de hemólise em Agar sangue. O disco 3 continha extrato de *Kalanchoe brasiliensis*, onde, ao seu redor, pode-se observar um grande halo de hemólise com margens bem definidas, podendo ser confundidas com halo de inibição de crescimento bacteriano.

Além dessas espécies de plantas, esse efeito hemolítico pode ser observado em mais três extratos testados: *Sedum dendroideum*, *Psidium guajava* e *Ludwigia nervosa*, como indicadas na Tabela 2, coluna 'H'.

Uma possível ação tóxica desses extratos testados tem que ser avaliado antes de sua utilização "in vivo", como foi proposto por Takarada *et al.* (2004) ao testarem o efeito dos óleos utilizados no trabalho em cultivo celular. A presença de hemólise em alguns testes de sensibilidade antimicrobiana quando se utilizou como meio de cultura o agar sangue, demonstra a possibilidade de citotoxicidade, "in vivo", podendo causar danos a outros tipos celulares tais como as células epiteliais, podendo causar úlceras, estomatites e gengivites. Até que esses extratos hemolíticos sejam estudados quanto a sua atividade tóxica, não poderemos afirmar sua segurança. Da mesma forma, todos os extratos devem ser testados quanto a sua toxicidade, pois há várias formas de causar intoxicações, seja em animais ou humanos. Como o propósito do trabalho foi uma pré-avaliação dos extratos para um posterior uso em enxágües orais visando a prevenção de patologias orais, esses fatores devem ser muito bem estudados e esclarecidos. No cão, ainda pode ocorrer a ingestão desses extratos se utilizados como enxágües orais, o que dificilmente ocorre em humanos onde o enxágüe se faz por meio de bochechos. Podendo ocasionar efeitos colaterais secundários a essa ingestão tais como gastrite, vômitos, salivação excessiva, inapetência, febre, anorexia, etc, mas todos esses sinais devem ser verificados através de estudos "in vivo", pois só assim é que podemos afirmar se o extrato utilizado produz algum efeito colateral ou não. Caso não ocorra nenhum efeito colateral, uma possível indicação seria a utilização desses extratos via oral com o objetivo de amenizar ou evitar distúrbios gastro-intestinais de causa bacteriana, como se faz a muitos anos na medicina humana e nos costumes populares com o uso de chás e ervas que combatem, curam ou aliviam diferentes patologias. Além do uso desses artifícios naturais em cães ser muito restrito nos dias de hoje, há poucos estudos clínicos na medicina veterinária demonstrando a ação dessas plantas que tanto são estudadas "in vitro" na medicina humana.

A forma como essas plantas são processadas, comercializadas e vendidas também pode interferir na ação terapêutica final da planta, como propôs Lírio (2001) ao analisar a qualidade higiênica de chás comercializados no município de São Paulo. A presença de sujidades e a falta de higiene no preparo das plantas, chás e extratos comercializados pode interferir na ação do fitoterápico. Assim, uma determinada ação de uma planta comprovada tanto laboratorialmente quanto clinicamente pode não ser tão eficaz na fase final de seu uso devido a um preparo ou processamento indevido.

Várias formulações contendo o extrato puro da planta são possíveis a partir da ação terapêutica comprovada dessas plantas, tais como cápsulas, comprimidos, soluções orais e tópicas, pomadas, cremes, etc. Além disso, se há o isolamento do princípio ativo dessas plantas, novas substâncias com ação antibacteriana podem ser desenvolvidas e utilizadas nessas formulações.

Outras possíveis utilizações dessas substâncias para cães estão nas rações e nas "fitas mastigatórias" disponíveis no mercado pet. Os constituintes dos extratos das plantas podem ser adicionados na ração de cães com o objetivo de melhor aproveitar os efeitos terapêuticos dessas plantas, pois as linhas de rações terapêuticas ou de tratamento cresceram muito nos últimos anos, com a introdução de diferentes tipos de formulações nutricionais que tanto auxiliam na manutenção da saúde animal, tais como rações para cães com periodontite e que evitam a formação de cálculos dentários, rações para distúrbios gastro-intestinais, rações para animais diabéticos, para prevenir a catarata e a formação de cálculos renais, etc, além de rações específicas indicadas somente para uma determinada raça, com o objetivo de suprir uma necessidade peculiar. Por que não adicionar nessas rações, compostos naturais sem efeitos colaterais indesejáveis que também podem auxiliar na melhora da saúde animal, não só dos animais de companhia mas também para animais de produção. Tem-se também disponível no mercado pet, "fitas mastigatórias" que possuem um composto enzimático que ajuda a prevenir a formação da placa bacteriana. Deste modo, a introdução dessas fitas impregnadas com o extrato da planta que possui atividade antimicrobiana com seu princípio ativo pode ser de grande auxílio na prevenção e controle de infecções orais e periodontopatias. Em humanos, novos produtos com bases fitoterápicas têm sido lançados no mercado, como as pastas dentais que contêm produtos naturais em sua composição, visando a diminuição de gengivites e sangramentos orais. A indústria de cosméticos também têm investido muito em produtos naturais, ao lançar no mercado variadas linhas com bases naturais, tais como xampus, cremes hidratantes corporais e faciais, etc.

Várias metodologias são aplicadas para a determinação da CIM de extratos de plantas, tais como a redução da resazurina, a microdiluição em tubos, a microdiluição em placas e em poços. Para que a leitura da microdiluição em tubos possa ser realizada, é preciso que o extrato fitoterápico seja translúcido, bem como o meio de cultura utilizado, pois a leitura se faz por turvação do meio. Por isso, se o extrato a ser testado não for límpido, a leitura do resultado da microdiluição se torna difícil ou na maioria das vezes impossível. Um filtro de clarificação poderá ser utilizado para tornar o extrato o mais translúcido possível, porém, nesse trabalho, mesmo após a filtração, os extratos testados não ficaram translúcidos, impossibilitando o método da microdiluição em tubos. Assim, o método escolhido foi o da Microdiluição em poços feitos no meio de cultura, pois a leitura nesse método é feita através do halo de inibição formado ao redor do poço que contém o extrato, independentemente de sua transparência.

Há poucos estudos na medicina veterinária sobre plantas utilizadas em higiene oral de cães, ao contrário da medicina humana, onde vários trabalhos científicos comprovam o efeito benéfico dessas plantas brasileiras nos processos patológicos orais no homem, com estudos experimentais "in vivo" e "in vitro".

Como as condições laboratoriais muito diferem das condições reais "in natura" da cavidade oral tanto dos animais quanto dos humanos, os extratos testados "in vitro" devem ser testados "in vivo" para saber se a ação antibacteriana dos extratos comprovada neste trabalho se dará de forma semelhante quando utilizados na cavidade oral dos animais. A mesma atividade antibacteriana demonstrada laboratorialmente pelos extratos é esperada quando os utilizarmos na cavidade oral, porém, vários fatores podem interferir com esse efeito inibidor do crescimento das bactérias orais testadas, tais como o pH da boca, o efeito da saliva, ação do sistema imune e de certas enzimas, a temperatura corporal, a quantidade e variedade bacteriana presentes no local, um possível processo infeccioso, o tipo de dieta que é consumida, etc. Todas essas variantes podem interferir de uma certa maneira na ação antibacteriana desses extratos. O pH da cavidade oral, por exemplo, é um fator que está em constante mudança de acordo com a curva determinada por Stephan (1940). A ação dos extratos testados em um pH diferente do estudado "in vitro" pode ser modificada. Assim, sugere-se o estudo dessa atividade em diferentes concentrações de acidez, pois não se pode padronizar um pH oral, já que a produção de ácidos na cavidade oral é multifatorial (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 2001). Se a atividade antibacteriana for mantida em diferentes variações do pH do meio, provavelmente "in vivo" essa atividade se preservará no que diz respeito à acidez do meio.

O tipo de dieta consumida também poderá interferir nessa atividade antibacteriana, pois de acordo com Frostell (1964), se uma pessoa possui uma dieta rica em glicose, sacarose, frutose e maltose a produção de ácidos será muito mais rápida quando comparada com aquelas pessoas que possuem uma dieta rica em amido e lactose. A freqüente ingestão de sacarose também tem significativa relação na formação da placa dental e no aparecimento de desordens periodontais, mudando a composição da placa bacteriana (Staat, 1975). No caso dos cães, a ingestão de sacarose é muito reduzida, principalmente naqueles cães que são criados apenas com rações comerciais, que são balanceadas nutricionalmente.

Outro fator que poderá interferir na ação desses extratos "in vivo" é a presença da saliva na boca. Dentre as várias funções da saliva, ela ajuda a umedecer o alimento que está sendo digerido, fazer a primeira digestão do alimento, funcionar como solução tampão, neutralizando o pH da boca e regulando o do estômago, defesa natural através da ação de enzimas, além de ter um papel importante na desmineralização e remineralização dos dentes, limpeza de restos alimentares e bactérias e na diluição e neutralização dos produtos metabólicos da placa (TANZER, 1989). Com isso, o processo salivar tem que ser levado em consideração quando se usa esses extratos em enxágues orais, pois a saliva pode tanto auxiliar a possível ação terapêutica do extrato quanto atrapalhar a sua ação.

Uma mesma planta que possui um respaldo positivo na pesquisa científica de sua ação "in vitro", pode não agir da mesma maneira "in vivo". Um dos fatores que pode influenciar nessa diferença de atividade é justamente a falta de cuidado com o preparo dos extratos ou amostras de plantas que são comercializadas no Brasil.

Um trabalho feito por Lício (2001) analisou a qualidade higiênica de chás comercializados no município de São Paulo, de acordo com os parâmetros legais do Ministério da Saúde, através da avaliação da presença ou não de sujidades. Sete marcas foram avaliadas num total de 67 amostras de erva cidreira (19), hortelã (16), erva doce (18) e camomila (14). Das amostras avaliadas, 44,8% apresentaram resultados em desacordo com as normas legais do ministério, o que pode refletir em inadequadas condições higiênicas nas etapas de produção dos chás. Assim, se as normas do Ministério da Saúde fossem acatadas com rigorosidade, talvez haveria uma maior atividade na ação preventiva ou terapêutica dessas plantas. Além disso, diminuiriam os riscos de efeitos colaterais advindos dessas sujidades.

A formação do biofilme dental não se dá somente pela presença da bactéria naquele local, mas por inúmeros fatores ambientais e de virulência bacteriana associadas aos microorganismos. Torna-se importante, portanto, o estudo não só da atividade antibacteriana dos extratos, mas também o estudo de outras propriedades como, por exemplo, a sua atividade antiplaca (PINHEIRO, 1987; ELVIN-LEWIS, 1980), que em alguns casos, se torna mais importante do que a ação antibacteriana, pois essa ação antiplaca poderá inibir a formação de biofilmes dentários através de um determinado mecanismo em comum a várias espécies bacterianas formadoras desse biofilme. Em contrapartida, um efeito inibidor do crescimento sobre uma determinada bactéria se torna muito específico, inibindo a formação somente do biofilme que a bactéria iria formar. O extrato ideal para ser usado na profilaxia da formação da placa dentária seria aquele que inibisse diferentes espécies bacterianas além de ter atividade antiplaca.

Um efeito antiplaca pode ser observado sem que haja alguma atividade antimicrobiana, pois os mecanismos envolvidos nessas duas situações são completamente diferentes, como pode comprovar Ooshima *et al.* (1994) que observou uma atividade antiplaca do chá preto, mas não observou inibição do crescimento da bactéria formadora da placa.

Um importante estudo a se fazer após a descoberta de um efeito antibacteriano, é a extração de seus princípios ativos ou a quantificação de seus constituintes como fez Park *et al.* (2003) ao isolar de plantas uma substância responsável pela inibição do crescimento bacteriano. Uma segunda etapa do estudo que se torna muito importante para tentarmos desvendar o possível mecanismo de ação desses extratos, como foi feito por Elvin-Lewis (1980), que associou a inibição da formação de biofilmes orais por chás com os seus constituintes em comum, identificados como taninos. Assim como Cury (1981) determinou a concentração de fluoreto solúvel em diferentes chás comerciais, estabelecendo uma relação entre essa concentração e a atividade antibacteriana previamente estudada. A ação antibacteriana, por isso, pode ser um somatório da ação de vários princípios ativos e diferentes constituintes. Portanto, sugere-se a extração dos princípios ativos das plantas estudadas bem como uma análise detalhada de seus constituintes na tentativa de elucidar ou relacionar a atividade antibacteriana encontrada com esses constituintes.

Após extração e identificação esses constituintes devem ser analisados separadamente para observar qual deles possui a maior atividade, sendo assim identificado o possível constituinte responsável pela ação inibidora do crescimento bacteriano, como relatou Lee (1986) ao relacionar a evolução do processo cariioso através do uso de chás com o conteúdo de flúor em suas composições. Além de atuarem diretamente na diminuição do crescimento bacteriano ou inibindo a formação do biofilme dental, esses constituintes podem agir protegendo as estruturas dentais ou diminuindo a ação nociva de certos metabólitos bacterianos sobre estruturas orais, como foi proposto por Yu *et al.* (1995) que comprovou a ação dos componentes orgânicos contidos no chá verde na proteção de esmalte dentário de ataques ácidos, sendo essa proteção aumentada drasticamente quando associado com fluoretos.

Em um trabalho de revisão sobre o efeito das plantas medicinais na prevenção e tratamento de infecções bacterianas, Mahady (2005) destaca as doenças infectocontagiosas como sendo uma significativa causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, ocorrendo em, aproximadamente, 50% de todas as mortes dos países tropicais e 20% das mortes nas Américas. Enfatiza ainda que apesar dos grandes avanços em estudos microbiológicos e no controle desses microorganismos, há uma esporádica incidência de epidemias devido ao aparecimento de microorganismos resistentes às drogas. Com esses impactos negativos na saúde, uma iniciativa global para o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas deve ser estudada. Durante muitos anos, componentes

químicos isolados de plantas medicinais, tem servido como um modelo para muitas drogas que possuem sua ação clinicamente comprovada, e agora estão sendo reavaliadas como agentes antimicrobianos. Os principais objetivos desses estudos estão em descobrir novas substâncias antimicrobianas, tratar novas enfermidades, controlar ou matar microorganismos já resistentes e ampliar as possibilidades de drogas disponíveis hoje no mercado. Milhares de espécies de plantas têm sido estudadas e testadas "*in vitro*" contra centenas de cepas bacterianas, e muitas plantas medicinais têm apresentado atividade contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Entretanto, poucos extratos têm sido testados em estudos "*in vivo*" envolvendo animais ou humanos para ser realmente comprovada a sua ação e eficácia.

Com o grande avanço do desmatamento no Brasil, muitas plantas são extintas do país sem antes serem estudadas. Perde-se com isso, valiosas chances de descoberta de novos compostos e formulações que poderiam estar nos auxiliando no controle e tratamento de tantas doenças incuráveis como o câncer.

A etiologia primária da doença periodontal é a infecção bacteriana, que forma um biofilme, também chamada de placa bacteriana nos dentes e nos tecidos moles da boca, proporcionando às bactérias uma resistência aos antimicrobianos. Para se tratar adequadamente um processo infeccioso oral, tem que reduzir ao máximo o número de bactérias naquela região, onde podemos utilizar métodos cirúrgicos, não cirúrgicos ou uma combinação dos dois. Ao focar o tratamento não cirúrgico da doença periodontal em animais, Cleland (2000) relata que para determinar a melhor terapia de cada caso, é necessário que se faça um detalhado exame da cavidade oral, com inspeção visual e o uso de sondas periodontais. A limpeza da área supragengival é o primeiro passo do processo de tratamento e o segundo seria a raspagem subgengival para remover a bactéria que está em contato direto com o periodonto, porém esse procedimento para ser efetivo, exige motivação, destreza manual e técnica meticulosa. Além disso, para o procedimento ser eficaz, é imprescindível o uso de instrumentação adequada, treinamento por parte do veterinário e tempo suficiente para a realização da técnica correta. E para melhorar os resultados terapêuticos deve-se utilizar um tratamento sistêmico por via oral com antibióticos ou o uso de anti-sépticos locais. Além disso, o sucesso da terapia periodontal também depende dos cuidados na higiene dental dos animais domésticos, onde esses cuidados devem ser reforçados como uma medida profilática no aparecimento de periodontopatias.

Um antibiótico bastante usado para tratar infecções orais, por exemplo, é a tetraciclina. Porém, 11% da microbiota oral cultivável é resistente a esse antibiótico, de acordo com VILLEDIEU *et al.* (2003), que estudou a prevalência de genes resistentes à tetraciclina, e pode concluir que há uma variedade desses genes resistentes que podem estar presentes em cães adultos saudáveis.

Com o aumento significativo da resistência bacteriana aos antibióticos, o uso dessas substâncias naturais com efeito antibacteriano comprovado, torna-se de grande importância na medicina veterinária e humana, principalmente nos tratamentos tópicos de infecções ou em enxágües orais, evitando a formação do biofilme, uma importante estratégia de perpetuação de diferentes microorganismos, de acordo com Auschill *et al.* (2000). Além disso, acrescenta-se o fato de que o biofilme é o início do aparecimento das doenças periodontais, a doença mais comum em cães adultos, podendo levar a sérias complicações sistêmicas de acordo com De Bowes, 1998. Assim, cuidando da saúde dos cães, a nossa também será cuidada, pois o relacionamento dos animais com os humanos está cada vez mais próximo.

6. CONCLUSÕES

No isolamento das bactérias da cavidade oral de cães, houve predominância de bactérias Gram positivas, sendo que nos animais neonatos, prevaleceu o grupo de estreptococcus orais: *Streptococcus mitis*, *S. salivarius* e *S. mutans*, havendo introdução de *Bacillus* spp e *Candida* spp nos animais de 45 dias. Nos animais de 6 meses e 1 ano de vida, pode-se observar um aumento na proporção de *Staphylococcus* spp, sendo identificados como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*, além dos estreptococcus orais (*Streptococcus mitis*, *S. salivarius* e *S. mutans*), *Bacillus* spp e *Candida* spp. Quase todos os extratos testados apresentaram alguma atividade antibacteriana. Apenas os extratos de *Ipomoea batatas* e de *Eleusine indica* não demonstraram nenhuma atividade. Entretanto, o extrato de *Copaifera langsdorffii* apresentou a maior atividade dentre os extratos, inibindo todas as quatro espécies bacterianas. Os extratos de *Psidium guajava*, *Sedum dendroideum*, *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe brasiliensis*, *Kalanchoe gastonis-bonnieri*, e *Ludwigia nervosa* apresentaram hemólise em crescimento em Agar sangue, podendo indicar uma possível ação tóxica desses extratos. O uso de plantas medicinais na profilaxia de afecções orais de cães pode ser de grande auxílio, porém, testes “*in vivo*” deverão ser feitos para a confirmação dos estudos “*in vitro*” já realizados e com resultados positivos, tanto na espécie humana quanto na canina, pois muitas bactérias são comuns nessas duas espécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHIM, S.I.; ALMAGBOUL, A.Z.; OMER, M.E.A.; ELEGAMI, A. **Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L.** Fitoterapia, v.73, p.713-715, 2002.
- ADERINOKUN, G.A.; LAWYOIN, J.O.; ONYEASO, C.O. **Effect of two common Nigerian chewing sticks on gingival health and oral hygiene.** Odontostomatology Tropical, v.22, n.87, p.13-18, 1999.
- AGIL, F.; KHAN, M.S.; OWAIS, M.; AHMAD, I. **Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.** J. Basic Microbiol. v.45, n.2, p.106-114, 2005.
- AHMED, F.; SELIM, M.S.; SHILPI, J.A. **Antibacterial activity of *Ludwigia adscendens*.** Fitoterapia, v.76, n.5, p.473-475, 2005.
- ALANIS, A.D.; CALZADA, F.; CERVANTES, J.A.; TORRES, J.; CEBALLOS, G.M. **Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders.** J. Ethnopharmacol. v.100, n.1-2, p.153-157, 2005.
- ALMAS, K.; AL-ZEID, Z. **The immediate antimicrobial effect of a toothbrush and miswak on cariogenic bacteria: a clinical study.** J. Contemp. Dent. Pract. v.15, n.5, p.105-114, 2004.
- ALMEIDA, C.C.S.; BOGOSSIAN, F.B.; DOI, A.P.K.; ISOYAMA, D.; HO, S.G.; ZONALLA, W.R.; NASSIS, C.Z. **Estudo da atividade antihistamínica da *Kalanchoe brasiliensis*.** Arquivo Médico ABC, v.20, n.1/2, p.7-10, 1997.
- ARIMA, H.; DANNO, G. **Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation.** Biosci. Biotechnol. Biochem. v.66, n.8, p.1727-1730, 2002.
- AUSCHILL, T.M.; ARWEILER, N.B.; NETUSCHIL, L.; BRECX, M.; REICH, E.; SCULEAN, A. **Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms.** Archives of Oral Biology, v.46, n.5, p.471-476, 2001.
- BAIRY, I.; REEJA, S.; SIDDHARTH, RAO, P.S.; BHAT, M.; SHIVANANDA, P.G. **Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microglora based on in vivo studies.** Indian J. Pathol. Microbiol. v.45, n.3, p.307-310, 2002.
- BIAVATTI, M.W.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; ALBUQUERQUE, S.; MAGALHÃES, C.M.; PAGNOCCA, F.C. **Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian Rutaceae species.** Phytomedicine, v.8, n.2, p.121-124, 2001.
- BORGSTRÖM, M.K.; EDWARDSSON, S.; SULLIVAN, A.; SVENSATER, G. **Dental plaque mass and production activity of the microbiota on teeth.** Eur. J. Oral Sci., v.108, n.5, p.412-417, 2000.

BUSSCHER, H.J.; PERDOK, J.F.; VANDER, M.E.I. **Bacterial growth and short-term clinical efficacy of a vegetable oil-based mouthrinse: preliminary study.** Clin Prev Dent, v.14, n.3, p.5-8, 1992.

CAI, L.; WEI, G.X.; VANDER B.P.; WU, C.D. **Namibian chewing stick, *Diospyros lycioides*, contains antibacterial compounds against oral pathogens.** J Agric Food Chem, v.48, n.3, p.909-914, 2000.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** Fitoterapia, v.73 Suppl.1, p.S1-S6, 2002.

CLELAND, W.P.J **Nonsurgical periodontal therapy.** Clin. Tech. Small Anim. Pract. v.15, n.4, p.221-225, 2000.

CURY, J.A. **Concentração de fluoretos em chás brasileiros e seu significado na prevenção de cárie.** Revista Gaúcha Odontológica, v.29, n.2, p.136-138, 1981.

DAROUT, I.A.; ALBANDAR, J.M.; SKAUG, N. **Periodontal status of adult Sudanese habitual users of miswak chewing sticks or toothbrushes.** Acta Odontol Scand, v.58, n.1, p.25-30, 2000.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.** Microbiology and molecular biology reviews, v. 64, n.4, p.847-867, 2000.

DeBOWES, L.J. **The effects of dental disease on systemic disease.** Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v.28, n.5, p.1057-1062, 1998.

DeSTEFANO, F.; ANDA, R.F.; KAHN, H.S.; WILLIAMSON, D.F.; RUSSELL, C.M. **Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality.** British Medical Journal, v.13, n.306, p.688-691, 1993.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; TROTIN, F.; PINKAS, M. **Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria.** Journal of Ethnopharmacology, v.60, p.91-96, 1998.

EISNER, E. **Dental Prophylaxis: Another piece in the preventive care mosaic.** Veterinary Clinics of North America, v.16, n.5, p.817-833, 1986.

ELVIN-LEWIS, M. **Anticariogenic potential of comercial teas.** J. Prev. Dent. v.6, p.273-284, 1980.

FERNANDES FILHO, E.; MORAIS, S.; FONSECA, S.; MOTA, O. **Preparação e avaliação clínica de um antiséptico bucal à base do óleo essencial da Planta Medicinal *Lippia sidoides* (Alecrim pimenta).** Rev. ABO Nac. v.6, n.5, p.323-325, 1998.

FROSTELL, G. **Quantitative determination of the acid production from different carbohydrates in suspensions of dental plaque material.** Acta Odont. Scand. v.22, p.457-475, 1964.

GIOSO, M.A. **Clínica odontológica**. Teleconferência, p.01, 1999. Disponível em <<http://www.loc.fmvz.usp.br/sobov>>. Acesso em setembro de 2002.

GIRÃO, V.C.; NUNES P.D.C.; MORAIS, S.M.; SEQUEIRA, J.L.; GIOSO, M.A. **A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease**. Preventive Veterinary Medicine, v.59, n.1-2, p. 95-102, 2003.

GNAN, S.O.; DEMELLO, M.T. **Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts**. Journal of Ethnopharmacology, v.15, n.68, p.103-108,1999.

GONZALEZ, M.; YSLAS, N.; REYES, E.; QUIROZ, V.; SANTANA, J.; JIMENEZ, G. **Clinical effects of a Mexican sanguinaria extract (*Polyconum aviculare* L.) on gingivitis**. Journal of Ethnopharmacology, v.74, n.1, p.45-51, 2001.

HARVEY, C. E.; EMILY, P. P. **Oral Surgery**, p.312-377. In: Small Animal Dentistry. Mosby, Baltimore, 1993.

HEDLUND, C.S. **Cirurgia da Cavidade Oral e da Orofaringe**, p.222-256. In: FOSSUM, TW. Cirurgia de Pequenos Animais, ed. Roca, 2002.

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J.S.; CHEN, C.P.; LIN, T.C.; LIN, C.C. **Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L.** J Pharma Pharmacol, v.53, n.2, p.187-191, 2001. (a)

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; CHEN, C.P.; HUANG, J.S.; LIN, C.C. **Antimicrobial activity of honokiol and magnolol isolated from *Magnolia officinalis***. Phytotherapy Research, v.15, n.2, p.139-141, 2001. (b)

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases**. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HWANG, J.K.; SHIM, J.S.; PYUN, Y.R. **Antimicrobial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens**. Fitoterapia, v.71, p.321-323, 2000.

IAUK, L.; LO BUE, A.M.; MILAZZO, I.; RAPISARDA, A.; BLANDINO, G. **Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria**. Phytother. Res. v.17, n.6, p.599-604, 2003.

JAGTAP, A.G.; KARKERA, S.G. **Extract of *Junglandaceae* regia inhibits growth, in-vitro adherence, acid production and aggregation of *Streptococcus mutans***. J Pharm Pharmacol, v.2, n.52, p.235-242, 2000.

JONES, B.D.; LISKA, W.D. **Gastroenterology**, 1986, 531p.

KIM, J.H. **Anti-bacterial action of onion (*Allium cepa*L.) extracts against oral pathogenic bacteria**. Journal of Nihon University School of Dentistry, v.39, n.3, p.136-141, 1997.

- KOLENBRANDER, P.E. **Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems.** Annual Review of Microbiology, v.54, p.413-437, 2000.
- KONEMAM, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico.** 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.
- KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.B.; PARK, Y.K.; CURY, J.A. **"in vitro" antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens.** Archives of oral biology, v.45, p.141-148, 2000.
- KRAHWINKEL, T.; WILLERHAUSEN, B. **The effect of sugar-free green tea chew candies on the degree of inflammation of the gingiva.** Europe Journal of Medicine Research, v.5, n.11, p.463-467, 2000.
- LEE, E.N.C. **Efeito do mate e do chá, comparado ao do flúor, na prevenção da cárie em ratos.** Estomat. Cult. v.16, n.2, p.17-22, 1986.
- LÍRIO, V.S. **Qualidade microscópica de chás: comparação com parâmetros legais.** Hig. Aliment. v.15, n.82, p.27-32, 2001.
- LI, X.C.; CAI, L.; WU, C.D. **Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens.** Phytochemistry, v.46, n.1, p.97-102, 1997.
- LOESCHE, W.J. **Cárie dental - uma infecção tratável.** Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1993.
- LOPES, J.L. **Sesquiterpene lactones from *Vernonia*.** Mem Inst Oswaldo Cruz, n.86, Suppl 2, p.227-230, 1991.
- LORENZI, H.; ABREU, M.F.J. **Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2002. 512p.
- MAHADY, G.B. **Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections.** Curr. Pharm. Des. v.11, n.19, p.2405-2427, 2005.
- MANN, C.M.; MARKAM, J.L. **A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils.** Journal of Applied Microbiology, v. 84, p.538-544, 1998.
- McCHESNEY, J.D.; CLARK, A.M.; SILVEIRA, E.R. **Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid.** Pharm Res, v.8, n.10, p.1243-1247, 1991.
- MEDAGLIA, T. **Plantas medicinais que curam.** Revista Terra, Editora Peixes, n. 149, p.29-35, 2004.
- MIRANDA, C.M.; van WYK, C.W.; van der BIJL, P.; BASSON, N.J. **The effect of areca nut on salivary and selected oral microorganisms.** Int Dent J, v.46, n.4, p.350-356, 1996.

MODESTO, A.; LIMA, K.; UZEDA, M. **Atividade antimicrobiana de três dentifrícios utilizados na higiene oral de bebês.** Ver. Assoc. Paul. Cir. Dent, v.55, n.1, p.43-48, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. NCCLS document M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 1997.

NIEVES, M.A.; HARTWIG, P.; KINYON, J.M.; RIEDESEL, D.H. **Bacterial isolates from plaque and from blood during and after routine dental procedures in dogs.** Veterinary Surgery, v.26, n.1, p. 26-32, 1997.

NISENGARD, N.; NEWMAN, N. **Microbiologia oral e imunologia.** São Paulo: Editora Santuário. 1997.395p

NOSTRO, A.; CANNATELLI, M.A.; CRISAF, G.; MUSOLINO, A.D.; PROCOPIO, F.; ALONZO, V. **Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract.** Lett. Appl. Microbiol. v.38, n.5, p.423-427, 2004.

NOSTRO, A.; CELLINI, L.; DI-BARTOLOMEO, S.; DI-CAMPLI, E.; GRANDE, R.; CANNATELLI, M.A.; MARZIO, L.; ALONZO, V. **Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*.** Phytother. Res. v.19, n.3, p.198-202, 2005.

OCHI, T.; SHIBATA, H.; HIGUTE, T.; KODAMA, K.H.; KUSUMI, T.; TAKAISHI, Y. **Anti-*Helicobacter pylori* compounds from *Santalum album*.** J. Nat. Prod. v.68, n.6, p.819-824, 2005.

OLAJIDE, O.A.; AWE, S.O.; MAKINDE, J.M. **Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*.** Fitoterapia, v.70, p.25-31, 1999.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; FUJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. **Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *mutans streptococci*.** Caries Research. v.27, n.2, p.124-129, 1993.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; TAMURA, Y.; HAMADA, S. **Reduction of dental plaque deposition in human by oolong tea extract.** Caries Research. v.28, n.3, p.146-149, 1994.

PARK, K.M.; YOU, J.S.; LEE, H.Y.; BAEK, N.I.; HWANG, J.K. **Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens.** Journal of Ethnopharmacology, v.84, p. 181-185, 2003.

PENMAN, S. **Dental conditions in the dog and cat.** Vet. Ann. p.223-232, 1990.

PERES, M.T.; DELLE MONACHE, F.; CRUZ, A.B.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A. **Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae).** Journal of Ethnopharmacology, v.56, n.3, p.223-226, 1997.

PINHEIRO, C.E. Efeito dos extratos de guaraná e de stévia rebaudiana bertonii (folhas), e do esteviosídeo, sob a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. Rev. Odont. USP, v.1, n.4, p.9-13, 1987.

PINHEIRO, C.F. Avaliação de goma de mascar. Rev. Gaúcha Odont. v.42, n.5, p.251-255, 1994.

ROMERO, C.D.; CHOPIN, S.F.; BUCK, G.; MARTINEZ, E.; GARCIA, M.; BIXBY, L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. J Ethnopharmacol. v.99, n.2, p.253-257, 2005.

SANTOS, P.J.; BESSA, C.F.; AGUIAR, M.C.; CARMO, M.A. Cross-sectional study of oral mucosal conditions among a central Amazonian Indian community, Brazil. Journal of Oral Pathology Medicine, v.33, n.1, p.7-12, 2004.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A.; BRAGA, F.C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. Journal of Ethnopharmacology, v.80, p.1-7, 2002.

SILVA, S.A.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN B. The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric oxide intermediates. Parasitology, v.118, n.6, p.575-582, 1999.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of Clinical Periodontology, v.25, p.134-144, 1998.

STAAT, R.H. Effect of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. J. Dent. Res. v.54, n.4, p.872-880, 1975.

STEENKAMP, V.; MATHIVHA, E.; GOUWS, M.C.; VAN RENSBURG, C.E. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. J Ethnopharmacol. v.95, n.2-3, p.353-357, 2004.

STEPHAN, R.M. Changes in the hydrogenion concentration on tooth surfaces and in caries lesions. J. Amer. Dent. Ass. v.27, p.718-723, 1940.

SUN, Y.; WANG, Y.; GUAN, X.; FENG, Y.; ZHAO, Y. Antimicrobial properties of *Flos Lonicerae* against oral pathogens. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, v.21, n.4, p.242-243, 1996.

TAIWO, O.; XU, H.X.; LEE, S.F. Antibacterial activities of extracts from Nigerian chewing sticks. Phytother Res, v.13, n.8, p.675-679, 1999.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral. Microbiol. Immunol. v.19, n.1, p.61-64, 2004.

TANZER, J.M. On changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. J. Dent. Res. v.68, p.1576-1587, 1989.

- TENENBAUM, H.; DAHAN, M.; SOELL, M. **Effectiveness of a sanguinarine regimen after scaling and root planing.** J Periodontol, v.70, n.3, p.307-311, 1999.
- THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica.** 3 ed. São Paulo, Livraria Santos Editora, 2001.
- TICHY, J.; NOVAK, J. **Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (*Streptococcus* sp.).** J Altern Complement Med, v.4, n.1, p.39-45, 1998.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.. **Microbiologia.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- UZEDA, M. **Microbiologia Oral.** Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2002. 104p.
- VAN HOUTE, J.; RUSSO, J.; PROSTAK, K.S. **Increase pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved.** J. Dent. Res. v.68, n.3, p.451-459, 1989.
- VICENTE, E.; HIROOKA, Y. **Estudos preliminares da atividade antimicrobiana de própolis.** Semina, v.8, n.2, p.76-79, 1987.
- VIEIRA, P.C.; BOLZANI, V.S. **Química de Produtos Naturais.** Sociedade Brasileira de Química, 2002. Disponível em <<http://www.s bq.org.br/PN-NET/quimica.htm>>. Acesso em novembro de 2004.
- VILLEDIEU, A.; DIAZ-TORRES M.L.; HUNT, N.; McNAB, R.; SPRATT, D.A.; WILSON, M.; MULLANY, P. **Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria.** Antimicrob Agents Chemother, v.47, n.3, p.878-882, 2003.
- Van der WEIJDEN, G.A.; TIMMER, C.J.; TIMMERMAN, M.F.; REIJERSE, E.; MANTEL, M.S.; van der VELDEN, U. **The effect of herbal extracts in an experimental mouthrinse on established plaque and gingivitis.** J Clin Periodontol, v.25, n.5, p.399-403, 1998.
- WAN, A.K.L.; SEOW, W.K.; WALSH, L.J.; BIRD, P.S. **Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*.** Australian Dental Journal, v.47, n.1, p.21-26, 2002.
- WEISS, E.I.; LEV-DOR, R.; KASHAMM, Y.; GOLDHAR, J.; SHARON, N.; OFEK, I. **Inhibiting interspecies coaggregation of plaque bacteria with a cranberry juice constituent.** Journal of Americal Dental Association, v.129, n.12, p.1719-1723, 1998.
- WIGGS, R.B.; LOBPRISE, H.B. **Veterinary Dentistry Principles and Praticce.** Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997, 748p.
- WOOD, S.R.; KIRKHAM, J.; MARSH, P.D.; SHORE, R.C.; NATTRESS, B.; ROBINSON, C. **Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy.** Journal of Dental Research, v.79, n.1, p.21-27, 2000.