UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

THAYS DE CARVALHO AMORIM BOLZAN

AVALIAÇÃO *in vitro* DA SENSIBILIDADE DO MICROBIOMA ORAL DE CÃES LABRADORES RETRIEVERS FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS

ALEGRE-ES
2018

THAYS DE CARVALHO AMORIM BOLZAN

AVALIAÇÃO *in vitro* **DA SENSIBILIDADE DO MICROBIOMA ORAL DE CÃES LABRADORES RETRIEVERS FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.
Orientador: Prof. Dr. : Marcos Santos Zanini
Co-orientadora: Prof.ª Drª.: Juliana Aparecida Severi

ALEGRE-ES
2018

THAYS DE CARVALHO AMORIM BOLZAN

AVALIAÇÃO *in vitro* DA SENSIBILIDADE DO MICROBIOMA ORAL DE CÃES LABRADORES RETRIEVERS FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

_____
Profª. Drª. Juliana Aparecida Severi
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

_____
Profª. Drª. Janaina Cecília Oliveira Villanova
Universidade Federal do Espírito Santo

_____
Prof. Dr. Dirlei Molinari Donatele
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

À UFES e ao HOVET, que foram a minha segunda casa dos últimos anos, que me acolheram de braços abertos, proporcionando todas as ferramentas para a construção da minha formação acadêmica e da minha pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Ao meu orientador Marcos Santos Zanini, pela amizade, por toda oportunidade e confiança concedida.

À minha coorientadora Juliana Aparecida Severi por ter me acolhido de sorriso e braços abertos, com sua serenidade me ensinou e me ajudou durante todo o meu experimento.

À professora Janaína Villanova por ter colaborado para que esse projeto tomasse forma farmacêutica.

Ao professor Dirlei Donatele por ceder o laboratório e sempre estar disposto a ajudar. A professora Ana Paula, por toda ajuda e carinho e ao professor Ulysses Viana, obrigada por tudo.

À minha amiga inspiradora Cinthya Cardinot, obrigada por toda confiança e carinho.

Ao médico veterinário Paulo Sérgio Cruz de Andrade Júnior, por toda disponibilidade e ajuda no Centro de Formação em Treinadores e Instrutores de Cães-Guia do IFES – Campus de Alegre.

Ao professor Marco Antonio Gioso, pela confiança e oportunidade que me concedeu a trilhar pelos caminhos da Odontologia Veterinária, muito obrigada.

À minha mãe de coração que sempre me conduziu com maestria pelos caminhos da pesquisa cientifica: Lenir Cardoso Porfirio, obrigada por toda dedicação e amizade.

Aos meus pais, Alonso de Oliveira Amorim e Maria José de Carvalho Amorim por tudo que me proporcionaram, são por vocês e graças a vocês que mais esse sonho foi concretizado. Meus agradecimentos a vocês são eternos.

Ao meu marido, Raphael Bolzan, por ser tão especial em minha vida e estar ao meu lado me dando apoio nesse momento tão importante, amo você.

Aos meus animais de estimação: Pretinha, Isis, Tomate, Valore e Pompom pelo amor sincero e companhia.

A todos os amigos e técnicos do laboratório, Winner Duque, Laís Magnago, Ítalo Câmara, Roselena Abreu, Thais Martins, Taiana Alencar, Yuri Almeida agradeço imensamente por todo apoio que me deram durante o experimento.

A todas as minhas amigas e amigos, vocês também fazem parte dessa conquista. Por tornarem mais alegre os momentos difíceis.

Agradeço à FAPES pelo apoio e a todos os que fizeram parte desta conquista, e que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui, e me proporcionaram a realização dessa nova etapa de vida.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

BOLZAN, THAYS DE CARVALHO AMORIM. **AVALIAÇÃO** *in vitro* **DA SENSIBILIDADE DO MICROBIOMA ORAL DE CÃES LABRADORES RETRIEVERS FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS**. 2018. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos das espécies: *Anacardium ocidentalis*; *Harpagophytum procumbens*; *Momordica charantia* L.; *Punica granatum*; *Psidium guajava* L.; *Stryphnodendron adstringens e Uncaria tomentosa*, frente ao microbioma oral de 12 cães Labradores retriviers. Para isso, utilizaram-se extratos polares das amostras vegetais. Realizou-se a análise fitoquímica qualitativa e quantitativa para determinação das principais classes de metabólitos presentes. Em seguida, determinou-se a concentração inibitória mínima dos extratos pelo método de difusão em disco em Brain Heart Infusion Agar, a partir de soluções das amostras vegetais nas concentrações de 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL, aplicadas sobre discos de papel filtro. A seguir, os discos foram transferidos para placas de petri, com meio de cultura agar BHI semeadas com saliva dos 12 cães, contendo microbioma oral dos mesmos. Após 12 horas de incubação a 37^0C foram avaliados os halos de inibição resultante da ação dos extratos sobre o microbioma e comparados com os halos de inibição de disco de clorexidina 0,12% como controle. Para interpretação dos dados foi empregada a análise de variância seguida do teste de Tukey com nível de significância de 5%. O extrato de *Punica granatum* demonstrou maior halo de inibição nas concentrações 250 mg/mL e 125 mg/mL, enquanto a *Psidium guajava* apresentou maior halo de inibição na concentração de 250 mg/mL. Os extratos de *Anacardium ocidentalis, Uncaria tomentosa, Stryphnodendron adstringens, Momordica charantia* L, tiveram halos semelhantes aos halos do controle clorexidina 0.12%. Pode-se relacionar que a atividade antimicrobiana dos referidos extratos esteja associada à presença de compostos fenólicos, taninos condensados e flavonóides, cujas presenças foram confirmadas nos ensaios fitoquímicos. Os resultados obtidos demonstraram que o microbioma oral dos 12 cães, foram mais sensíveis aos extratos de *Punica granatum* e *Psidium guajava* 125mg/mL e 250 mg/mL, quando comparados ao controle clorexidina a 0,12%, reforçando a

importância das plantas medicinais como recurso terapêutico e sua aplicabilidade na odontologia veterinária.

Palavras-chave: Fitoquímica. Periodontite. Plantas medicinais.

ABSTRACT

BOLZAN, THAYS DE CARVALHO AMORIM. *in vitro* **EVALUATION OF ORAL MICROBIOMA SENSITIVITY IN LABRADOR RETRIEVERS WITH PLANTS EXTRACTS**. 2018. 56p. Thesis (Master's Degree in Veterinary Science) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

The aim of this research was to evaluate the antimicrobial activity in vitro ofspecies extracts on oral microbioma from 12 Labrador retriviers. The plants species are: *Anacardium ocidentalis*; *Harpagophytum procumbens*; *Momordica charantia* L.; *Punica granatum*; *Psidium guajava* L.; *Stryphnodendron adstringens* and *Uncaria tomentose*. Polar extracts from plant samples was used in this research. The qualitative and quantitative phytochemical assay was performed to classify the main metabolites classes existent. Then was settled the minimal inhibitory concentration of extracts by diffusion test using disco in Brain Heart Infusion Agar. Plants samples concentration used in this test was 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL put on filter paper discos. Next, these discos were transfer to petri dishes with BHI Agar strewed together with saliva content oral microbioma from twelve dogs. After 12 hours of incubation in 32^{o}C was analysed the results of inhibition halo from extract action on microbiome compared to inhibition halos of 0,12% chlorhexidine discos as a control. Variance analyses and Turkey's test were employed to data interpretation with 5% significance. *Punica granatum* extract shows a large inhibition halo in concentrations of 250 mg/mL and 125 mg/mL where as, *Psidium guajava* had a large inhibition halo in concentrations of 250 mg/mL. Extracts from *Anacardium ocidentalis*, *Uncaria tomentosa*, *Stryphnodendron adstringens*, *Momordica charantia* L., had halos same as 0,12% chlorhexidine control. Under these circumstances, perhaps the antibacterial activity of extractsis associated with the presence of phenolic compounds, condensed tannin and flavonoids as show in phytochemical assay. In conclusion, the results show that oral microbioma from 12 dogs was more sensitivity using *Punica granatum* and *Psidium guajava* extacts, in concentrations of 125 mg/mL and 250 mg/mL, camapred to 0,12% chlorhexidine control. For these reasons, is possible see the importance of medicinal plants as a therapeutic resource and an applicability in veterinary odontology.

Keywords: Phytochemical. Periodontitis. Medicinal Plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Anatomia dental..... 17

Figura 2- Representação do método de difusão em disco para análise do extrato (FPG- Folha de goiabeira) com microbioma oral de Labradores..... 40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Descrição e procedência das espécies vegetais utilizadas no antibiograma..... 32

Quadro 2- Testes utilizados para a caracterização qualitativa da composição fitoquímica dos extratos..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS

CAO - Cascas do caule de *Anacardium ocidentalis* - Cajueiro
CPG - Cascas dos frutos de *Punica granatum* - Romã
CSA - Cascas do caule de *Stryphnodendron adstringens* – Barbatimão
CUT - Cascas do caule de *Uncaria tomentosa* – Unha de gato
FAO - Folhas de *Anacardium ocidentalis* - Cajueiro
FPG - Folhas de *Psidium guajava* - Goiabeira
MSC - Folhas de *Momordica charantia* - Melão de São Caetano
RHP - Raízes de *Harpagophytum procumbens* – Garra do diabo
DP - Doença Periodontal
EJ - Epitélio Juncional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização qualitativa da composição química dos extratos 38

Tabela 2- Avaliação de compostos fenólicos totais dos extratos..... 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 17
2.1 Anatomia da boca..... 17
2.2 Dente..... 17
2.3 Periodonto..... 18
2.4 Doença periodontal..... 18
2.5 Microbioma..... 19
2.6 Placa bacteriana..... 20
2.7 Cálculo dentário..... 20
2.8 Gengivite..... 21
2.9 Periodontite..... 21
2.10 Tratamento e profilaxia da doença periodontal..... 22
2.11 Plantas Medicinais..... 23
CAPÍTULO 1: **AVALIAÇÃO** *in vitro* **DA SENSIBILIDADE DO MICROBIOMA ORAL DE CÃES LABRADORES RETRIEVERS FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS**..... 26
RESUMO..... 27
ABSTRACT..... 29
3. INTRODUÇÃO..... 31
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 32
4.1 Preparação do extrato vegetal..... 33
4.2 Análise fitoquímica dos extratos vegetais..... 33
4.3 Doseamento de fenóis totais..... 34
4.4 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana..... 35
4.7 Análise estatística..... 36
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 37
6.CONCLUSÕES..... 46
7. REFERÊNCIAS..... 47

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) acomete as estruturas que suportam e protegem os dentes como a gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal. A DP inicia-se pela deposição continuada de placa bacteriana e pode comprometer os tecidos adjacentes ao dente. As bactérias podem penetrar na corrente sanguínea e se acumular em outros órgãos devido à bacteremia. Em consequência, podem ocasionar perturbações sistêmicas como, glomerulonefrite, hepatite, poliartrite e endocardite bacteriana (GIOSO, 2007; GORREL, 2010).

A prevalência da DP aumenta com a idade, e atinge cerca de 80% dos cães com mais de cinco anos (MARRETA, 2004). Considera-se que a DP é a principal causa de perdas dentárias nos animais de companhia, sendo também responsável por diminuir a qualidade de vida dos pequenos animais (WILLIAMS, 1997).

Atualmente há uma estreita relação entre os humanos e seus animais de companhia que se baseia em relações afetivas. Com base nesse contexto, no que se diz respeito à preocupação com a qualidade de vida e saúde dos pequenos animais, há uma crescente demanda pelos consumidores acerca de um mercado específico voltado para os animais de companhia.

As plantas medicinais têm sido estudadas em medicina veterinária, a fim de se preconizar e validar o seu uso como precursoras de fármacos com propriedades terapêuticas (KANERIA et al., 2012; BARATHIKANNAN et al., 2016).

Na atualidade, já se encontra produtos fitoterápicos de uso veterinário que são comercializados. Os mesmos destinam-se, não somente ao tratamento e profilaxia de patologias, como também higienização e embelezamento. Dentre estes, algumas empresas já fornecem produtos com plantas medicinais, desenvolvidos para a higienização da cavidade oral de cães e gatos e tratamento da DP (NEVES, et al., 2012; COLMERY, 2005).

No Brasil, estudos sobre as plantas medicinais têm se destacado, incluindo a elaboração de leis e programas que incluem a inserção da fitoterapia na prática médica humana como alternativa de tratamentos. Em medicina veterinária ainda não há programas específicos que insiram o uso de fitoterápicos no tratamento de doenças em animais.

Neste trabalho, em que se expõe um cenário pouco documentado da utilização de plantas medicinais no tratamento e prevenção da doença periodontal em animais de companhia, torna-se necessário pesquisar alternativas a clorexidina, para profilaxia e tratamento da doença periodontal, a fim de identificar potenciais substitutos nas plantas medicinais para aplicação na terapia antimicrobiana e prevenção da doença periodontal em cães.

O objetivo desta pesquisa consistiu na avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de sete extratos vegetais sobre o microbioma oral coletado em cães Labradores Retrievers, tendo em vista eleger um ou mais extratos a serem incorporados, em uma forma farmacêutica apropriada para o uso como adjuvante na profilaxia da doença periodontal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia da boca

A cavidade oral executa função primordial no sistema digestório. Sua principal função consiste em apreender e triturar os alimentos através da mastigação. A boca inclui os lábios, cavidade oral e suas paredes, língua, dentes e glândulas salivares (HORST; HANS-GEORG, 2016).

2.2 Dente

Os dentes são estruturas localizadas nos alvéolos dos ossos incisivos, do osso maxilar e da mandíbula. O dente consiste em: coroa, raiz, esmalte, dentina, cemento e polpa (sistema endodôntico), tecidos esses que estão sujeitos às alterações metabólicas tóxicas e infecciosas (Figura 1) (GUEDES, 2006).

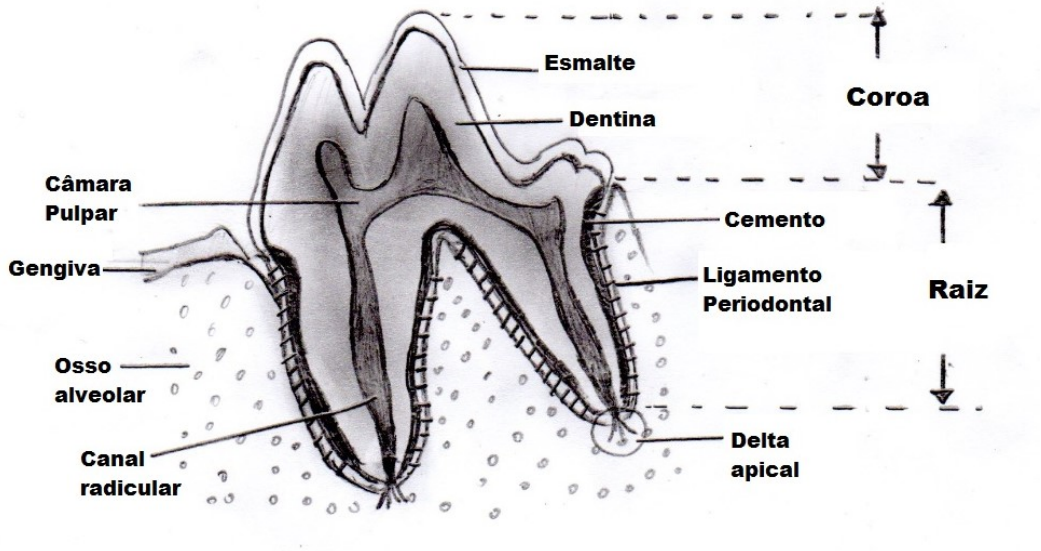

Figura 1: Anatomia dental. Fonte: Arquivo Pessoal.

A anatomia básica dos animais é semelhante aos humanos. Porém há diferenças quanto à quantidade dos dentes, formato e espaçamento entre os mesmos (GORREL, 2010).

2.3 Periodonto

O periodonto é o conjunto de tecidos integrados que sustentam e protegem o dente, os quais consistem em: gengiva, osso alveolar, cemento e o ligamento periodontal (DEBOWES, 2004).

A gengiva é a parte da mucosa mastigatória que cobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes, forma-se um revestimento em torno de cada dente e divide-se em gengiva livre, que se adapta perfeitamente a superfície do dente, e gengiva inserida, firmemente aderida ao periósteo subjacente ao osso alveolar (GORREL, 2010; LINDHE et al., 2010).

A gengiva está fixada ao dente por meio do epitélio juncional (EJ), que quando saudável fixa-se ao esmalte dentário. Em processos patológicos à medida que o osso é lesionado e, por conseguinte, reabsorvido, há formação de bolsa periodontal, entre o dente e o osso, pois o epitélio juncional migra em direção apical (GIOSO, 2007; GORREL, 2010).

O osso alveolar no qual estão inseridos os dentes é formado pelas cristas dos ossos da mandíbula ou maxila que sustentam os dentes. Desenvolve-se durante a erupção dentária e sofre atrofia quando os dentes caem, além de sofrer influências externas e sistêmicas (DEBOWES, 2004).

O cemento radicular é um tecido avascular, não inervado, mineralizado, altamente especializado, que recobre, por aposição de camadas, a dentina radicular e que fixa às fibras do ligamento periodontal a raiz do dente (LANZA et al., 2003).

O ligamento periodontal é um importante componente do periodonto de sustentação, formado por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e celular, que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar. Funciona como um ligamento suspensor para os dentes e está em permanente atividade fisiológica (LINDHE et al., 2010).

2.4 Doença periodontal

A doença periodontal (DP) é uma afecção comum na rotina clínica em pequenos animais, e atinge cerca de 80% de cães acima de quatro anos de idade (PIERI, et al., 2016). A DP é induzida pela presença da placa bacteriana dentária,

responsável pela inflamação dos tecidos adjacentes aos dentes (FIORELLINI, ISHIKAWA e KIM, 2006; DEBOWES, 2010). Todavia, há uma variedade de fatores que influenciam a DP, podendo ter causas determinantes tais como, microbiológicos, comportamentais, ambientais, sistêmicos ou até genéticos (VAN DYKE e DAVE, 2005).

A DP crônica em cães e gatos é recorrente, e se não for tratada, pode comprometer os tecidos adjacentes ao dente. Os sinais clínicos da DP consistem em halitose intensa, sialorréia espessa, hemorragia oral, mobilidade dentária, cálculo e gengivite (GIOSO, 2003).

Na mesma cavidade oral, diferentes dentes podem ter diferentes estágios de DP, o que promove elevados níveis de dor e eventual perda dentária (GORREL, 2004; GIOSO, 2007).

2.5 Microbioma

O termo microbioma foi elaborado por Joshua Lederberg, geneticista e Nobel da medicina em 1958, e refere-se à comunidade de microrganismos que coloniza o organismo (DEWHIRST et al., 2010; ZHU et al., 2010).

A diversidade de microrganismos que compõe o microbioma depende das características do local anatômico onde colonizam, sendo influenciado pela umidade, pH, temperatura e nutrientes (RIBEIRO et al., 2014).

Os animais de companhia apresentam o pH da cavidade oral em torno de 7,5 a 9,0, isso explica o fato de apresentarem maior quantidade de cálculo em comparação a outras espécies, pois, sabe-se que o pH alcalino favorece a calcificação do cálculo dentário (GIOSO, 2007).

Na cavidade oral de cães saudáveis, mais de 400 espécies bacterianas já foram identificadas (GIOSO, 2007). Muitos destes microrganismos associam-se para formar biofilmes, que são resistentes à tensão mecânica ou tratamento antimicrobiano. A maioria das bactérias que estão na cavidade oral são espécies comensais, no entanto, podem tornar-se patogênicas em respostas às alterações do ambiente, como por exemplo, a falta de higiene oral (AVILA et al., 2009).

2.6 Placa bacteriana

A placa bacteriana consiste em material pegajoso e amarelado depositado sobre a superfície dentária, sendo o principal fator iniciador da DP, também chamada de induto mole ou biofilme dentário (HOLCOMBE, 2014; ROBERTS e DARVEAU, 2015).

A placa bacteriana supragengival é composta predominantemente por bactérias aeróbias Gram positivas, enquanto a placa subgengival é mais complexa, com presença de bactérias Gram positivas e Gram negativas, aeróbias e anaeróbias (HAWKINS, 1997; SCHWACH-ABDELLAOUI et al., 2000).

A progressão da DP caracteriza-se pelo desvio do tipo predominante do microbioma subgengival (GROVE, 1997; BRUSCHI et al., 2006).No início da afecção, o biofilme é constituído por bactérias de forma cocoide, Gram positivas, aeróbias, sem motilidade, não patogênicas. Já nos estágios mais avançados de DP, ocorre a proliferação de bactérias anaeróbias, Gram-negativas e com motilidade (GIOSO, 2007).

Embora seja bem elucidado que a placa bacteriana desencadeia a DP, as consequências graves da doença, que levam a perda dentária irreversível, parecem ser mediadas pelo hospedeiro (BARTOLD e VANDYKE, 2013). Uma hipótese de estudo é que os antígenos produzidos pelas bactérias que constituem o biofilme dentário iniciam uma resposta inflamatória do hospedeiro frente aos microrganismos, em resposta se torna crônica e altamente maléfica ao hospedeiro (VAN DYKE, 2009).

2.7 Cálculo dentário

Os efeitos patogênicos da placa bacteriana são aumentados devido à precipitação de sais minerais (carbonato de cálcio e fosfato de cálcio) provenientes da saliva. Forma-se o cálculo dental, material calcificado, duro, com superfície irregular e rugosa, conhecido como calculo dental ou “tártaro” (termo leigo) (CORRÊA, 1996; GIOSO, 2007).

O cálculo por si só não é patogênico. A grande relevância do cálculo na doença periodontal está em sua capacidade de reter placa bacteriana em sua superfície (GORREL, 2010).

2.8 Gengivite

A gengivite é a resposta inflamatória da gengiva induzida pela presença da placa bacteriana e limita-se aos tecidos moles da gengiva. A profundidade do sulco gengival encontra-se normal. Em cães a profundidade da sondagem periodontal varia entre 1-3 mm, e no gato 0,5 a 1 mm (GORREL, 2010; DAVIS et al., 2016).

Enquanto não há perda de inserção do epitélio juncional, a gengivite pode ser reversível. Caso não seja tratada, a gengivite pode evoluir para periodontite (GIOSO, 2007).

Wiggs e Lobprise (1997) desenvolveram um sistema de pontuação baseado nos níveis de inflamação gengival e sondagem periodontal de cães e gatos. Nesse sistema, a gengiva saudável (G0) é encenada, por meio de quatro níveis de gengivite aumentada pela gravidade da doença (G1-G4), seguido de quatro níveis de doença periodontal (DP), no qual se estabelece a periodontite (PD), por meio de quatro níveis (PD1-PD4), com a PD4 sendo a mais grave, e PD1 sendo uma periodontite inicial.

2.9 Periodontite

A presença da placa bacteriana desencadeia uma resposta imunológica do animal frente ao agente agressor, resultando no aumento de prostaglandinas inflamatórias, estimulação osteoclástica e ativação enzimática. A resposta imunológica exacerbada atua como fator de destruição das estruturas que compõem o periodonto de sustentação. Este processo é chamado de periodontite, sendo este irreversível (GIOSO, 2007)

A periodontite é a doença oral mais difundida em cães. Portanto, ocorrem variações na prevalência, devido às divergências em composições de idade e raça

dos grupos de estudo e variações dos critérios utilizados para definir o diagnóstico da periodontite (DAVIS et al., 2016).

2.10 Tratamento e profilaxia da doença periodontal

O tratamento da DP em medicina veterinária é cirúrgico e fundamenta-se na remoção da placa bacteriana supra e subgengival, no polimento das coroas dentárias e na instituição de antibioticoterapia adequada (WILLARD, 2006; BRESCÓ SALINAS et al., 2006).

Portanto, o tratamento cirúrgico não deve ser utilizado como terapia única, pois a permanência da placa bacteriana pode levar à mineralização e à formação de cálculo dentário (HAWKINS, 1997). Sendo assim, a escovação dentária é o procedimento mais adequado para a prevenção da doença periodontal, por meio da higienização diária dos dentes, é possível a remoção mecânica da placa. Na intenção de aumentar a eficiência da remoção, uma das alternativas consiste na administração de substâncias antibacterianas que, impedindo a proliferação ou adesão de bactérias à superfície dos dentes, inibem o desenvolvimento da doença periodontal (PIERI et al., 2010).

A clorexidina a 0,12% é a subtância antisséptica de escolha na rotina da odontologia veterinária para combater as bactérias da placa dentária (HENNET, 2002). Todavia, a utilização desse medicamento possui efeitos secundários, como escurecimento do esmalte dentário, perda de sensação e sabor dos alimentos, ulceração da mucosa oral e proporciona a proliferação de microrganismos resistentes (DANTAS, et al., 2007).

Em odontologia humana o tratamento periodontal também consiste em profilaxia profissional, e a prevenção da placa bacteriana pode ser mecânica, química ou a associação de ambas. O controle da placa bacteriana envolve diversos mecanismos, como o uso de fio/fita dental, escovação dental e o uso de enxaguatórios bucais (SVOBODA et al., 2004). Embora haja uma grande diversidade de produtos considerados efetivos na prevenção da formação do biofilme dental e consequente controle da gengivite, é reconhecido que o antimicrobiano mais eficaz é a clorexidina 0,12% (KÖNIG et al., 2002; MONFRIN; RIBEIRO, 2000).

2.11 Plantas Medicinais

Na atualidade, tem sido dada atenção para o uso de plantas medicinais com atividades antimicrobianas. Em inúmeros estudos, há relatos que a atividade antimicrobiana apresentada por diferentes extratos vegetais pode estar ligada à presença de compostos orgânicos provenientes dos metabolismos primários e/ou secundários das plantas, tais como, flavonóides, taninos, alcalóides, saponinas e terpenos (SCALBERT, 1991; HARBORNE e WILLIAMS, 2000; BYLKA et al., 2004; VELURI et al., 2004; KUETE et al., 2006).

Entre as espécies selecionadas para o presente estudo as atividades terapêuticas de variados componentes do *Punica granatum* (Romã) sugerem uma ampla gama de aplicações clínicas para a prevenção e tratamento de doenças. Extratos do fruto e casca possuem atividade antioxidante (KAUR et al., 2006). Além disso, apresenta atividades antibacterianas, anticonvulsivantes, antiinflamatórias, antifúngicas, imunomoduladores, cardioprotetoras, antimutagênicos, antiespasmódico e antidiabéticas (SINGH et al., 2009).

A romã pertence à família Punicaceae e a romãzeira como é conhecida popularmente, é um arbusto ramificado ou arvore pequena de até três metros de altura (LORENZI e SOUZA, 2001; LORENZI e MATOS, 2008). Estudos demonstram que as variadas atividades biológicas descritas para a *P. granatum* estão estritamente relacionadas à sua composição química. As principais partes utilizadas da planta são as folhas e cascas dos frutos. Pesquisas de isolamento e caracterização vêm sendo realizadas para elucidar os componentes presentes nos extratos de romã, dentre eles os principais são os polifenóis englobando taninos, flavonóides, alcalóides, ácidos orgânicos, dentre outros (WANG et al., 2010).

A *Psidium guajava* é conhecida no Brasil como goiaba. É uma planta nativa de América tropical e pertence à família Myrtaceae (LEVY e CARLEY, 2012). Verificou-se que o extrato das folhas possui propriedades analgésicas, antiinflamatórias, (OJEWOLE et al., 2006; HAIDA et al., 2011) antimicrobianas (NAIR et al., 2007), antidiarreica, antipirética, hipoglicêmica, anestésica e atividade depressora do sistema nervoso central (HAIDA et al., 2011). Além disso, o extrato de folha é usado em muitas preparações farmacêuticas como um sedativo para a tosse (METWALLY et al., 2010). O extrato de folha de goiaba contém flavonóides que

possuem propriedades antioxidantes dose-dependentes (NAKAMURA et al., 2000), e atividade antiinflamatória (HAVSTEEN, 1993; YOSHIMOTO et al., 1983)

O *Stryphnodendron adstringens,* (Família: Leguminosae-Mimosoidae), é uma planta nativa dos cerrados do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Seu nome popular é “barbatimão” e a planta é indicada de forma empírica para várias doenças, como, corrimento vaginal, hemorragias uterinas e intestinais, feridas abertas, úlceras estomacais, leucorréia, afecções escorbúticas, para esses males são usados chás das cascas (GLASENAPP, 2011; LORENZI e MATOS, 2002). O barbatimão se destaca por altos teores de taninos em suas cascas (SANTOS et al., 2002; DI STASI et al., 2002) e suas ações farmacológicas são associadas aos compostos fitoquímicos encontrados: flavonas, flavonóide, xantonas, taninos condensados e saponinas (SILVA et al., 2015).

A *Uncaria tomentosa* (Família: Rubiaceae) ou popularmente “unha de gato” é uma planta medicinal amplamente utilizada na medicina popular no tratamento de várias enfermidades como gastrite, reumatismo, artrite e certas afecções epidérmicas, como a candidiose oral (GATTUSO et al., 2004; JURGENSEN et al., 2005; KLOUCEK et al., 2005; MARTINO, 2006; PAIVA et al., 2009; DREIFUSS et al., 2010). Os compostos fitoquimicos responsáveis por suas atividades terapêuticas são: alcalóides oxindólicos, N-oxi-oxindólicos e indólicos, triterpenos glicosilados, taninos e flavonóides (HEITZMAN et al., 2005; BERTOL et al., 2012).

Anacardium ocidentalis (Família: Anacardiaceae) é uma árvore tropical originalmente indígena do Brasil, onde é popularmente conhecida como "caju". Estudos demonstraram atividades: antiinflamatória, antidiabética, inibidor da enzima acetilcolinesterase e antimicrobiana (PEREIRA et al., 2015) bem como no tratamento de úlceras leishmanianas devido a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FRANÇA et al., 1996). Os seus principais efeitos antimicrobianos e antiinflamatórios são devidos principalmente aos metabólitos: polifenóis, flavonóides e taninos (THOMAS, et al., 1985; DE MORAIS et al., 2005, AGRA, 2007).

Momordica charantia (Família: Cucurbitaceae) ou “Melão de são Caetano” possui ação antimicrobiana e antifúngica (PONZI et al., 2010), antidiabético, carminativo, anti-helmíntico, antimicrobianos, antivirais, imunoestimulante, laxante, antioxidante, inseticida (YESILADA et al., 1999; BASCH et al., 2003) seus efeitos farmacológicos estão associados aos principais compostos químicos encontrados como esteróides, flavonóides, alcalóides e taninos (COSTA et al., 2011).

Harpagophytum procumbens (Família: Pedaliaceae), ou conhecida popularmente como “Garra do diabo”. O seu uso empírico baseia-se em tratamento de algumas afecções como: febre, afecções cutâneas, artrite e doenças do trato digestivo (GRANT et al., 2007). O principal princípio ativo desse extrato é o iridóido que é responsável pelos efeitos terapêuticos da planta, tendo sido atribuído a ela efeitos antiinflamatórios (ANDERSEN et al., 2004; SETTY e SIGAL 2005), e analgésicos (LIM et al., 2014).

Dentre a grande diversidade da flora brasileira as plantas supracitadas foram escolhidas por haver na literatura, relatos do uso das mesmas com efeitos antimicrobianos. A partir das drogas vegetais foram obtidos extratos alcoólicos obtidos pela técnica de percolação. O liquido extrator empregado foi o álcool etílico visando à extração de compostos polares.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO *in vitro* DA SENSIBILIDADE DO MICROBIOMA ORAL DE CÃES LABRADORES RETRIEVERS FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS

Artigo a ser submetido à publicação ao periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO *in vitro* DA SENSIBILIDADE DO MICROBIOMA ORAL DE CÃES LABRADORES RETRIEVERS FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS.[1]

Thays de Carvalho Amorim Bolzan[2], Juliana Aparecida Severi[2], Janaina Cecília Oliveira Villanova [2], Ana Paula Madureira[3], Dirlei Donatele[2], Marcos Santos Zanini[2]

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos das espécies: *Anacardium ocidentalis*; *Harpagophytum procumbens*; *Momordica charantia* L.; *Punica granatum*; *Psidium guajava* L.; *Stryphnodendron adstringens e Uncaria tomentosa*, frente ao microbioma oral de 12 cães Labradores retriviers. Para isso, utilizaram-se extratos polares das amostras vegetais. Realizou-se a análise fitoquímica qualitativa e quantitativa para determinação das principais classes de metabólitos presentes. Em seguida, determinou-se a concentração inibitória mínima dos extratos pelo método de difusão em disco em Brain Heart Infusion Agar, a partir de soluções das amostras vegetais nas concentrações de 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL, aplicadas sobre discos de papel filtro. A seguir, os discos foram transferidos para placas de petri, com meio de cultura agar BHI semeadas com saliva dos 12 cães, contendo microbioma oral dos mesmos. Após 12 horas de incubação a 37^0C foram avaliados os halos de inibição resultante da ação dos extratos sobre o microbioma e comparados com os halos de inibição de disco de clorexidina 0,12% como controle. Para interpretação dos dados foi empregada a análise de variância seguida do teste de Tukey com nível de significância de 5%. O extrato de *Punica granatum* demonstrou maior halo de inibição nas concentrações 250 mg/mL e 125 mg/mL, enquanto a *Psidium guajava* apresentou maior halo de inibição na concentração de 250 mg/mL. Os extratos de *Anacardium ocidentalis, Uncaria tomentosa, Stryphnodendron adstringens, Momordica charantia* L, tiveram halos semelhantes aos halos do controle clorexidina 0.12%. Pode-se relacionar que a atividade antimicrobiana dos referidos extratos

[1]Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) do primeiro autor.

[2]Departamento de Medicina Veterinária, CCAE-UFES, Alegre-ES, Brasil. Rua: Alto Universitário, s/n. Centro, Alegre-ES. CEP: 29500-00 Caixa Postal 16. E-mail para contato: mv.thaysamorim@gmail.com
[3]Departamento de Engenharias e Biossistemas, UFSJ.

esteja associada à presença de compostos fenólicos, taninos condensados e flavonóides, cujas presenças foram confirmadas nos ensaios fitoquímicos. Os resultados obtidos demonstraram que o microbioma oral dos 12 cães, foram mais sensíveis aos extratos de *Punica granatum* e *Psidium guajava* 125mg/mL e 250 mg/mL, quando comparados ao controle clorexidina a 0,12%, reforçando a importância das plantas medicinais como recurso terapêutico e sua aplicabilidade na odontologia veterinária.

Palavras-chave: Fitoquímica. Periodontite. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the antimicrobial activity in vitro of species extracts on oral microbioma from 12 Labrador retriviers. The plants species are: *Anacardium ocidentalis*; *Harpagophytum procumbens*; *Momordica charantia* L.; *Punica granatum*; *Psidium guajava* L.; *Stryphnodendron adstringens* and *Uncaria tomentose*. Polar extracts from plant samples was used in this research. The qualitative and quantitative phytochemical assay was performed to classify the main metabolites classes existent. Then was settled the minimal inhibitory concentration of extracts by diffusion test using disco in Brain Heart Infusion Agar. Plants samples concentration used in this test was 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL put on filter paper discos. Next, these discos were transfer to petri dishes with BHI Agar strewed together with saliva content oral microbioma from twelve dogs. After 12 hours of incubation in 32^{o}C was analysed the results of inhibition halo from extract action on microbiome compared to inhibition halos of 0,12% chlorhexidine discos as a control. Variance analyses and Turkey's test were employed to data interpretation with 5% significance. *Punica granatum* extract shows a large inhibition halo in concentrations of 250 mg/mL and 125 mg/mL where as, *Psidium guajava* had a large inhibition halo in concentrations of 250 mg/mL. Extracts from *Anacardium ocidentalis*, *Uncaria tomentosa*, *Stryphnodendron adstringens*, *Momordica charantia* L had halos same as 0,12% chlorhexidine control. Under these circumstances, perhaps the antibacterial activity of extractsis associated with the presence of phenolic compounds, condensed tannin and flavonoids as show in phytochemical assay. In conclusion, the results show that oral microbioma from 12 dogs was more sensitivity using *Punica granatum* and *Psidium guajava* extacts, in concentrations of 125 mg/mL and 250 mg/mL, camapred to 0,12% chlorhexidine control. For these reasons, is possible see the importance of medicinal plants as a therapeutic resource and an applicability in veterinary odontology.

Keywords: Phytochemical. Periodontitis. Medicinal Plants.

3. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) pode ser classificada em moléstia que acomete as estruturas que suportam e protegem o dente: gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal. Estima-se que a DP é uma das doenças mais comuns em cães e gatos, sendo sua prevalência de até 80% em animais com idade superior a três anos (SEMEDO-LEMSADDEK, et al., 2016).

O surgimento e a progressão da DP caracterizam-se pelo desvio no tipo predominante do microbioma subgengival (GROVE, 1997; BRUSCHI et al., 2006). No início da afecção, a placa bacteriana é constituída predominantemente por bactérias cocoides, Gram positivas, aeróbias, sem motilidade, não patogênicas como *Actinomyces* e *Streptococcus* spp., já nos estágios mais avançados de DP, ocorre à proliferação de bactérias anaeróbias, Gram-negativas e com motilidade (GIOSO, 2007;TELHADO, et al., 2004). Com a evolução do processo, o microbioma passa a ser composto por bactérias anaeróbias Gram-negativas (LACERDA e ALESSI, 2002).

A (DP) inicia-se pela deposição continuada de placa bacteriana e pode comprometer os tecidos adjacentes ao dente. As bactérias podem penetrar na corrente sanguínea e se acumular em outros órgãos devido à bacteremia. Em consequência, podem ocasionar perturbações sistêmicas como: glomerulonefrite; hepatite; poliartrite e endocardite bacteriana (GIOSO, 2007; GORREL, 2010).

Diante da realidade apresentada justifica-se o presente estudo, que tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos das espécies CAO – casca do cajueiro (*Anacardium ocidentalis*); CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); CPG- casca da romã (*Punica granatum*); CUT- casca de unha de gato (*Uncaria tomentosa*); FPG- folhas da goiabeira (*Psidium guajava L.*); MSC- folhas de melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.); RHP - raiz de garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*) frente ao microbioma oral de um grupo controlado de cães.

.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Veterinária e Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAE-UFES) e no Laboratório de Produção Farmacêutica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS-UFES), do Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, s/n - Guararema, município de Alegre, Estado do Espírito Santo, com aprovação do comitê de ética registrado sob o número 046/2015.

O material vegetal utilizado neste trabalho foi selecionado, a partir de um banco de plantas medicinais disponíveis no Laboratório de Produção Farmacêutica do CCENS-UFES. A escolha foi feita com base na ação antimicrobiana, disponibilidade de droga vegetal, de extrato bruto e/ou facilidade de acesso durante a coleta para obtenção de material em quantidade compatível com o requerido para execução de todas as etapas propostas nesta pesquisa. Selecionou-se o total de sete espécies vegetais, sendo as espécies nativas provenientes de coletas em diferentes localidades do estado do Espírito Santo (Alegre e Jerônimo Monteiro) e as espécies exóticas, que não dispõem de cultivo padronizado no Brasil, de procedência comercial junto à empresa especializada do setor Centroflora de São Paulo (Quadro 1).

Nome científico	**Nome popular**	**Sigla**	**Parte utilizada**	**Extrato**	**Local de coleta**	**Registro**
Anacardium ocidentalis	Cajueiro	CAO	Casca do caule	Etanólico	Jerônimo Monteiro-ES	VIES30551
Harpagophytum procumbens	Garra do Diabo	RHP	Raiz	Etanólico	Centroflora-SP	NT
Momordica charantia	Melão de São Caetano	MSC	Folhas	Etanólico	Alegre-ES	NT
Psidium guajava	Goiabeira	FPG	Folhas	Etanólico	Jerônimo Monteiro-ES	VIES30552
Punica granatum	Romã	CPG	Casca do fruto	Etanólico	Alegre- ES	VIES34873
Stryphnodendron adstringens	Barbatimão	CSA	Casca	Etanólico	Centroflora-SP	NT
Uncaria tomentosa	Unha de gato	CUT	Casca do caule	Etanólico	Centroflora-SP	NT

NT: sem registro neste momento.
Quadro 1 – Descrição e procedência das espécies vegetais utilizadas no antibiograma.

4.1 Preparação do extrato vegetal

O procedimento de preparação do material vegetal ocorreu de forma semelhante para todas as espécies vegetais. Realizou-se a coleta do material vegetal a partir de exemplares adultos e sadios. Uma porção fértil foi selecionada para a confecção de exsicatas e posterior depósito em Herbário para documentação. O restante do material foi separado manualmente de possíveis interferentes e inspecionado quanto à integridade das respectivas partes (cascas, raízes ou folhas), sendo desprezadas aquelas que apresentassem algum tipo de dano.

Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Produção Farmacêutica da UFES, higienizadas em água corrente para a remoção de sujidades e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar em temperatura média de 50° C. Posteriormente, realizou-se a moagem em moinho de facas, com malha de 0,5 mm, a fim de obter um pó fino para extração.

O processo extrativo consistiu na mistura do líquido extrator alcoólico com a droga vegetal. A mistura foi mantida em recipiente fechado até o intumescimento do pó e então transferida para funil de separação para extração por percolação. As soluções extrativas resultantes foram concentradas em rotaevaporador em temperatura inferior a 45ºC. Para secagem completa dos extratos, as amostras foram transferidas para frascos de vidro e congeladas para que fosse feita a liofilização da água residual, sendo obtidos assim os extratos brutos vegetais que foram utilizados para avaliação da eficácia antimicrobiana.

4.2 Análise fitoquímica dos extratos vegetais

A caracterização qualitativa dos extratos foi realizada com base nos protocolos propostos por Matos (2009) e Wagner et al. (1984), com modificações. Os testes realizados tiveram o objetivo de confirmar a presença ou não de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, glicosídeos cardiotônicos, alcaloides e saponinas (Quadro 2).

Classe de composto investigada	Teste realizado
Alcalóides	Dragendorff[a]
	Bertrand[a]
	Sonnenschein[a]
Fenólicos	$FeCl_3$ 5%[a]
Flavonóides	$AlCl_3$ 5%[b]
	Taubouk[b]
	Pacheco[c]
	Shinoda[c]
	Pew[c]
Heterosídeos cardioativos	Pesez[b]
	Keller-killiani[d]
Saponinas	Agitação em solução aquosa[e]
	Aplicação em ágar-sangue[f]
Taninos	Gelatina 2%[a]
	$FeCl_3$ 1%[a]
	$Pb(CH_3COO)_2$[a]
	$Cu(CH_3COO)_2$[a]
Terpenóines	Liebermann-Buchard[g]

[a] Formação de precipitado característico
[b] Intensificação de fluorescência sob luz UV e mudança de cor para amarelado.
[c] Mudança de coloração do meio reacional para castanho-avermelhado
[d] Formação de dor castanho-avermelhada no anel e azul na fase acética
[e] Formação de espuma estável sob adição de HCl 1%
[f] Formação de halo transparente sobre ágar
[g] Formação de anel azul-esverdeado para núcleo esteroidal, ou rosa-violáceo para núcleo terpênico.

Quadro 2 – Testes utilizados para a caracterização qualitativa da composição fitoquímica dos extratos:

4.3 Doseamento de fenóis totais

Para a determinação dos compostos fenóicos totais foi utilizado o protocolo proposto por Singleton e Lamuela-Raventos (1999), pela medida da absorvância da amostra a 750 nm em espectrofotômetro modelo Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific), utilizando reagente de Folin-Ciocalteau e ácido gálico como padrão. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorvância da amostra-teste contra uma curva de calibração construída com ácido gálico e expresso como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por g de amostra testada, segundo a equação:

$$FT = \frac{[\ F\ ]\ x\ 1000}{[\ A\ ]}$$

Onde:
FT: teor de fenóis totais,
[F]: concentração de fenóis da amostra-teste (µg/mL), obtida pela leitura da absorvância da amostra e posterior interpolação da concentração pela curva de calibração do padrão,
[A]: concentração da amostra-teste (µg/mL).

Os resultados são apresentados na Tabela 3.

4.5 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana

Relizou-se a avaliação da atividade antimicrobiana dos sete extratos hidroalcoólicos frente ao microbioma oral dos 12 cães da raça Labrador Retrivier, sete fêmeas e cinco machos, com peso médio de 28 kg, com idade de um ano, determinando sua suscetibilidade através do método de difusão em disco em Brain Heart Infusion Agar (BHI), com modificações ao método de Kirby-Bauer. Foi utilizado um swab estéril para a coleta do microbioma oral contido na saliva dos 12 cães, os swabs coletados foram semeados nas placas de Agar (BHI). A partir de alíquotas dos extratos vegetais secos, realizou-se a diluição dos mesmos em propilenoglicol nas concentrações: 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL e 5 mg/mL. Foram utilizados discos de papel filtro com seis mm de diâmetro previamente impregnados com 20 uL dos extratos de cada planta teste. Como controle positivo utiizou-se os discos estéreis impregnados com clorexidina veterinária comercial a 0,12%. Como controle negativo utilizou-se discos estéreis impregnados com propilenoglicol. Os discos impregnados com as amostras foram distribuídos, equidistantes, com auxílio de uma pinça estéril, sobre a superfície do meio de cultura previamente semeado com o inóculo bacteriano. As placas foram incubadas em estufa microbiologica a 37°C por 12 horas.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), após o período de incubação de 12 horas, as placas foram lidas e o diâmetro da zona de inibição foi mensurado ao milímetro inteiro mais próximo, utilizando paquímetro de medição. Todas as medições de zona de inibição foram realizadas por um único examinador.

4.6 Análise estatística

Foi realizado o teste de Shapiro Wilk, além da avaliação de características como assimetria e curtose, para verificação da normalidade dos dados amostrais. Uma vez verificado que as variáveis se mostravam normalmente distribuídas foi realizada uma análise de variância e em seguida aplicado o pós-teste paramétrico de comparação múltipla de médias de Tukey. Foi utilizado para todas as análises um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no software Graphpad Prisma versão 6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Atualmente a clorexidina 0,12% é de uso recorrente para o tratamento da doença periodontal em cães (HARVEY, 1992; BROOK e NIEMIEC, 2008). Na odontologia humana em geral, a clorexidina é utilizada como padrão em relação à potência de outros agentes antimicrobianos (HORTENSE et al., 2010). No entanto a clorexidina 0,12%, em tratamentos prolongados pode ocasionar efeitos indesejáveis como: perda do paladar, escurecimento do esmalte dos dentes, ardência e ulcerações da mucosa (ZANINI et al., 1995; LASCALA E MOUSSALLI, 1995, GIOSO, 2007). Como alternativa ao controle da placa bacteriana inclui-se, na estratégia terapêutica, o uso da fitoterapia nos programas preventivos e curativos, tanto em medicina veterinária quanto na medicina humana. Com base nesse contexto, esse crescimento, tem estimulado a avaliação de extratos de plantas para o uso na odontologia com ação antibacteriana (SILVA et al., 2006; AGRA et al., 2007).

Sabe-se que as plantas produzem uma variedade de compostos químicos em seu metabolismo secundário (AHMAD, 2001). Dentre esses, os compostos fenólicos são divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos são caracterizados como compostos que precipitam proteínas, incluindo proteínas salivares (Rocha et al., 2011). Essas propriedades são fundamentais para explicar o papel dos taninos na proteção vegetal contra patógenos e na detenção de herbívoros que se alimentam destas plantas. Ilha et al., (2008) destacaram o efeito anti-séptico e antimicrobiano aos taninos. Este estudo corroborou com os demais extratos (CAO) *Anacardium ocidentalis*; (CSA) *Stryphnodendron adstringens*; (CPG) *Punica granatum*; (FPG) (*Psidium guajava* L.), os quais apresentaram a presença de taninos condensados e que foram observados halo de inibição frente ao microbioma oral de labradores.

De acordo com relatos de Manrique e Santana (2008), a presença de flavanóides nos extratos pode ser correlacionada à atividade antifúngica e antimicrobiana. Assim como no presente estudo, em que os extratos de: (CAO) (*Anacardium ocidentalis*); (CSA) (*Stryphnodendron adstringens*); CPG (*Punica granatum*) CUT- Casca de Unha de gato (*Uncaria tomentosa*); FPG- (*Psidium guajava* L.); RHP - Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*)

apresentaram em sua composição fitoquimica a presença de flavanóides (Tabela 2) e nos testes de sensibilidade antimicrobiana todos os extratos demonstraram halo de inibição frente ao microbioma oral dos cães testados.

Nos testes realizados para a avaliação fitoquímica foi possível identificar as principais classes de metabólitos presentes nos extratos estudados. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização qualitativa da composição química dos extratos.

Classe de composto	Ensaios realizados	Resultado positivo observado
Alcalóides	Dragendorff Bertrand Sonnenschein	CUT
Compostos fenólicos	FeCl3 5%	RHP, CUT, FPG, CSA, MSC, CPG, CAO,
Flavonoides	AlCl3 5% Pacheco Shinoda Pew Taubouk	CUT, RHP, FPG, CSA, CAO,
Heterosídeos cardioativos	Pesez Keller-killiani	Nenhum
Saponinas	Formação de espuma estável Atividade hemolítica	MSC
Taninos	Gelatina 2% Pb(AcO)2 FeCl3 1% Cu(AcO)2	FPG[1], CSA[2], CPG[2], CAO[2],
Terpenóines	Liebermann-B	RHP, CUT, FPG, CSA, MSC, CAO

CAO – Casca do cajueiro (*Anacardium ocidentalis*); CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); CPG- casca do romã (*Punica granatum*) CUT- Casca de Unha de gato (*Uncaria tomentosa*); FAO – Folha do cajueiro (*Anacardium ocidentalis*); FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.); MSC- Folha do Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.); RHP - Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*); [1]Taninos hidrolisáveis, [2]Taninos condensados.

Com o protocolo utilizado, para a avaliação dos fenóis totais presentes nos extratos foram possíveis determinar por interpolação da absorvância da amostra-teste contra uma curva de calibração construída com ácido gálico. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação de compostos fenólicos totais dos extratos

Extratos	**%FT**	**gEAG/100g Amostra**
CPG	56,496	56,50
FPG	20,443	20,44
CUT	36,491	36,49
CSA	43,060	43,06
CAO	38,007	38,01
RHP	8,544	8,54
MSC	3,190	3,19

*%FT = Porcentagem de teor de fenóis totais
*gEAG/100g Amostra = Equivalente de ácido gálico por 100g da amostra testada.
CPG- casca do romã (*Punica granatum*); FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.); CUT- Casca de Unha de gato (*Uncaria tomentosa*); CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); CAO – Casca do cajueiro (*Anacardium ocidentalis*); RHP - Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*); MSC- Folhas de Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.)

Considerando o microbioma normal oral de cães constituído por bactérias de forma cocoide, Gram positivas, aeróbias, sem motilidade, não patogênicas como *Actinomyces*e *Streptococcus* spp (HAWKINS, 1997; SCHWACH-ABDELLAOUI et al., 2000; GIOSO, 2007) verificou-se a ação de inibição (Figura 2) para o microbioma normal de cães Labradores com os extratos testados conforme os gráficos apresentados nas figuras de 1 a 7.

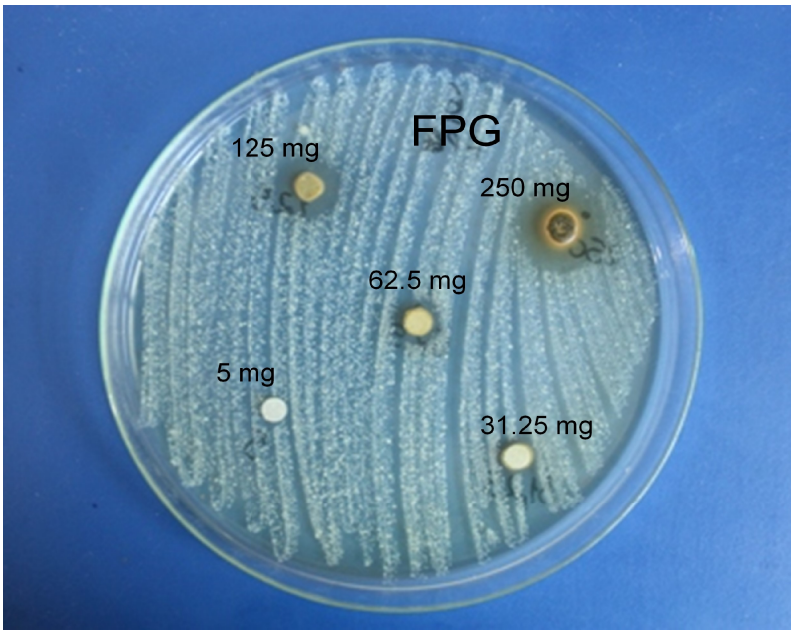

Figura 2: Representação do método de difusão em disco (FPG- Folha de goiabeira) Placa de Petri com microbioma oral de Labradores com discos de 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL e 5 mg/mL após 12 horas de encubação. Fonte: Arquivo pessoal.

A clorexidina 0,12% apresentou sensibilidade maior que todas as concentrações do extrato de *Momordica charantia* L. (MSC) (Gráfico 1).

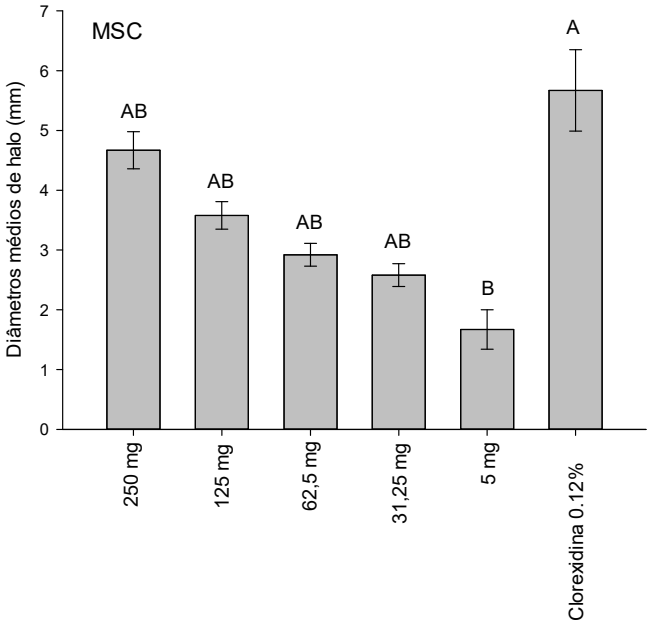

Gráfico 1 – Representação do teste paramétrico da comparação de médias dos halos em milímetros observados para a determinação da sensibilidade antimicrobiana em microbiota oral de cães Labradores contendo discos impregnados com os extratos de *Momordica charantia* L. nas

concentrações: 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL e controle com clorexidine 0,12%.

O extrato de *Harpagophytum procumbens* (RHP) não apresentou sensibilidade semelhante ao grupo controle de clorexidina 0,12%. Sendo observado conforme o Gráfico 2, que quando comparado o halo de inibição do RHP a clorexidina 0.12%, os halos obtidos pela clorexidina demonstraram-se maiores quando comparados aos halos obtidos pelo RHP.

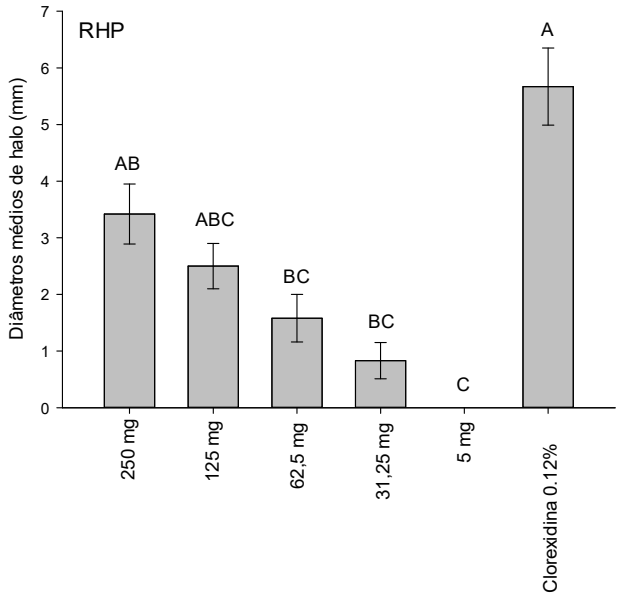

Gráfico 2 – Representação do teste paramétrico da comparação de médias dos halos em milímetros observados para a determinação da sensibilidade antimicrobiana em microbiota oral de cães Labradores contendo discos impregnados com os extratos de *Harpagophytum procumbens* nas concentrações: 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL e controle com clorexidine 0,12%.

A atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentalis* foi analisada por Melo e colaboradores (2006) e os resultados observados foram que o extrato obteve efeito de inibição nas concentrações de 0,31 mg/mL em bactérias comuns do microbioma oral humano: *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* e de 0,15 mg/mL em *Streptococcus sanguis* , sendo semelhantes aos resultados encontrados comparados a clorexidina 0,12%. No presente estudo o extrato de *Anacardium occidentalis* na concentração de 250 mg/mL também foi semelhante ao halo de inibição obtido pela clorexidina 0,12% frente ao microbioma oral de Labradores Retriviers (Gráfico 3).

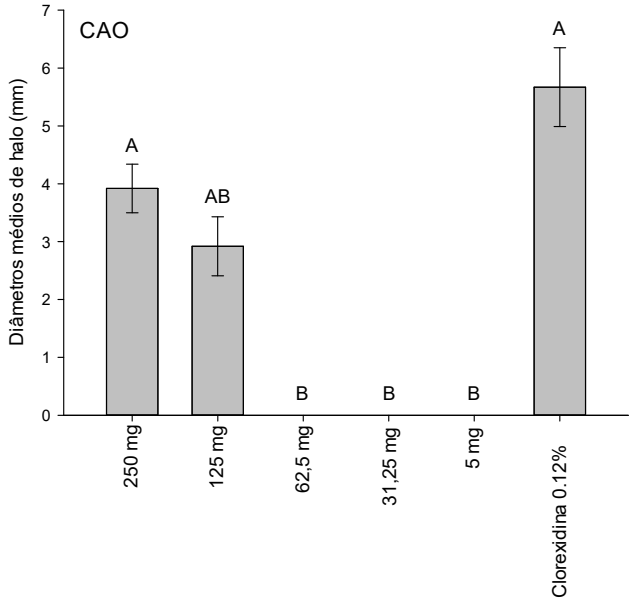

Gráfico 3 – Representação do teste paramétrico da comparação de médias dos halos em milímetros observados para a determinação da sensibilidade antimicrobiana em microbiota oral de cães Labradores contendo discos impregnados com os extratos de *Anacardium ocidentalis* nas concentrações: 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL e controle com clorexidine 0,12%.

O extrato *Uncaria tomentosa* (CUTI) demonstrou sensibilidade semelhante à clorexidina 0,12% na concentração de 250 mg/mL (Gráfico 4).

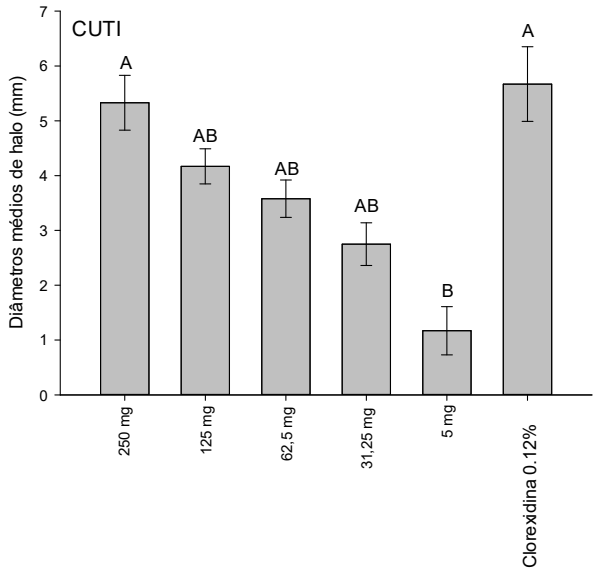

Gráfico 4 – Representação do teste paramétrico da comparação de médias dos halos em milímetros observados para a determinação da sensibilidade antimicrobiana em microbiota oral de cães Labradores contendo discos impregnados com os extratos de *Uncaria tomentosa* nas concentrações: 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL e controle com clorexidine 0,12%.

O microbioma oral demonstrou maior sensibilidade antimicrobiana ao extrato *Psidium guajava* L (FPG) quando comparado o halo de inibição da clorexidina a

0,12% na concentração de 250 mg/mL, e na concentração de 125 mg/ml apresentou-se semelhante a clorexidina 0,12% (Gráfico 5).

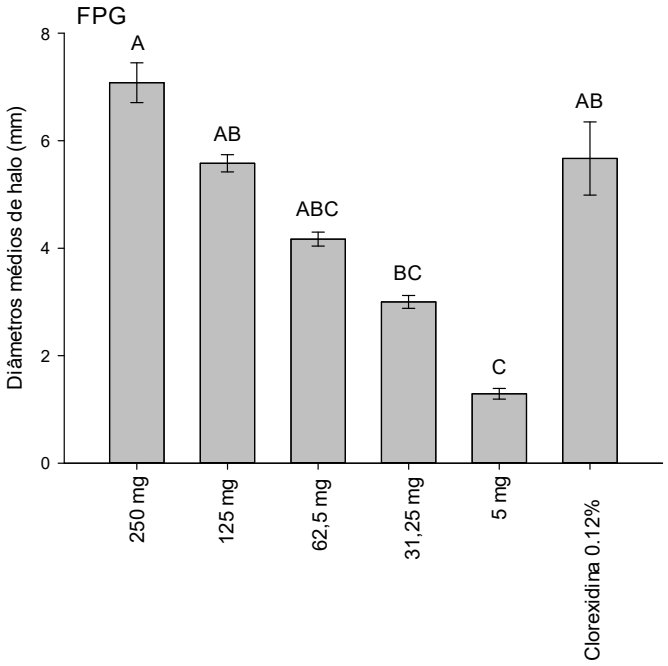

Gráfico 5 – Representação do teste paramétrico da comparação de médias dos halos em milímetros observados para a determinação da sensibilidade antimicrobiana em microbiota oral de cães Labradores contendo discos impregnados com os extratos de *Psidium guajava* nas concentrações: 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL e controle com clorexidine 0,12%.

O extrato *Stryphnodendron adstringens* (CSA) demonstrou-se semelhante à clorexidina 0,12% na concentração de 250 mg/mL (Gráfico 6).

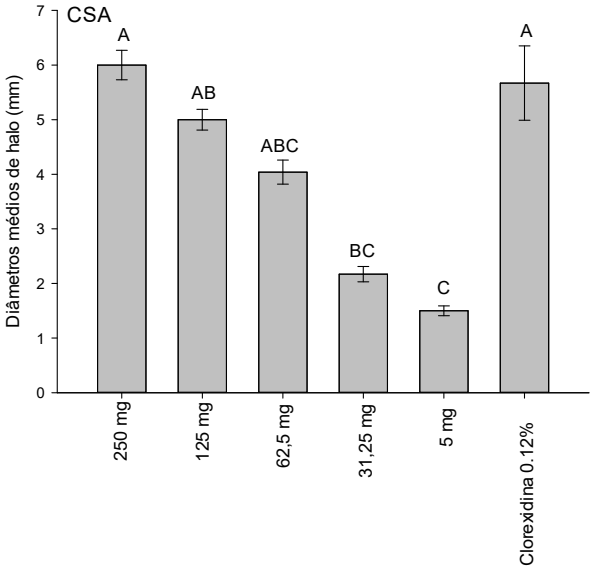

Gráfico 6 – Representação do teste paramétrico da comparação de médias dos halos em milímetros observados para a determinação da sensibilidade antimicrobiana em microbiota oral de cães

Labradores contendo discos impregnados com os extratos de *Stryphnodendron adstringens* nas concentrações: 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL e controle com clorexidine 0,12%.

No presente estudo o extrato *Punica granatum* na concentração de 250 mg/mL e 125 mg/mL apresentou halos superiores a clorexidina 0,12%, (CPG) e halo semelhante a clorexidina a 0,12% na concentração de 62,5 mg/mL (Gráfico 7).

Esses resultados corroboram com um estudo feito por Pereira et al., (2006) que observaram atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da romã frente a linhagens comuns ao biofilme supregengival humano: *Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis, Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

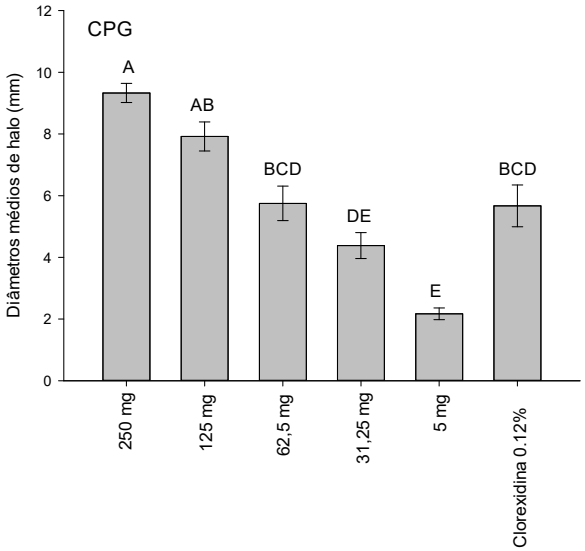

Gráfico 7 – Representação do teste paramétrico da comparação de médias dos halos em milímetros observados para a determinação da sensibilidade antimicrobiana em microbiota oral de cães Labradores contendo discos impregnados com os extratos de *Punica granatum* nas concentrações: 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 5 mg/mL e controle com clorexidine 0,12%

Em um estudo feito por Evangelista et al., (2013), apenas 8% dos cirurgiões-dentistas humanos afirmaram já ter indicado tratamento com plantas medicinais como terapia para seus pacientes, e 90% dos Cirurgiões-Dentistas participantes alegaram não estarem preparados para fazer este tipo de tratamento. Esses dados sugerem que na odontologia humana poucos profissionais estão preparados para utilizarem tratamentos com o uso de plantas medicinais em seus pacientes, e na medicina veterinária são escassos os tratamentos para prevenção de doença periodontal em cães.

Teixeira (2016), em seu estudo feito em Portugal, fez um levantamento onde os inquiridos que não eram Médicos Veterinários, responderam que apenas 50% dos Médicos Veterinários examinam a cavidade oral de seus cães quando vão a uma consulta. Teixeira afirma que os Médicos Veterinários têm um elevado grau de conhecimento sobre a doença periodontal, todavia esse conhecimento decresce no que toca à sua profilaxia.

Em resumo, o extrato de *Punica granatum* demonstrou maior halo de inibição comparado aos grupos controles de clorexidina 0,12% nas concentrações 250 mg/mL e 125 mg/mL. A *Psidium guajava* apresentou maior halo de inibição na concentração de 250 mg/mL quando comparada a clorexidina 0,12%, Os extratos de *Anacardium ocidentalis*, *Stryphnodendron adstringens, Uncaria tomentosa*, *Anacardium ocidentalis*, L, *Stryphnodendron adstringens*, *Momordica charantia* L, demonstraram-se semelhantes ao clorexidina 0,12%. *Harpagophytum procumbens* não apresentou estatística significativa.

Ressalta-se a importância deste trabalho que utilizou plantas medicinais inéditas com ação antimicrobiana frente ao microbioma oral em cães, pois estudos sobre plantas medicinais para o controle e prevenção da doença periodontal em cães são escassos, sendo assim destaca-se a inovação de tratamentos utilizando as plantas medicinais avaliadas como alternativa para a terapêutica odontológica veterinária.

.

6. CONCLUSÕES

Os constituintes fitoquímicos encontrados nos extratos foram alcalóides, compostos fenólicos, flavanóides, saponina, taninos e terpenóides.

A ausência de heterosídeos cardioativos sugere que não há toxicidade para todos os extratos testados.

Os extratos: *Mormodica charantia* L., *Uncaria tomentosa, Psidium guajava*, *Stryphnodendron adstringens*, *Punica granatum* apresentaram atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas: 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL e 5 mg/mL.

O extrato de *Harpagophytum procumbens* não apresentou atividade na concentração de 5mg/mL.

O extrato *Anacardium ocidentalis* apresentou atividade somente nas concentrações de 250 mg/mL e 125 mg/mL

O maior halo de inibição da *Punica granatum* (Romã) quando comparado aos demais extratos, pode estar relacionado à maior atividade deste extrato, provavelmente em função do alto teor de compostos fenólicos totais.

Agradecimentos:

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Espirito Santo (FAPES).

7. REFERÊNCIAS

AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drugres is tant human pathogens. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 113-123, 2001.

ANDERSEN, M. L., SANTOS, E. H., MARIA DE LOURDES, V. S., DA SILVA, A. A E TUFIK, S. Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 325-330, 2004.

AVILA, M., OJCIUS, D. M., E YILMAZ, Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest. **DNA and cell biology**, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009.

BARATHIKANNAN, K.; VENKATADRI, B.; KHUSRO, A.; AL-DHABI, N.A.; AGASTIAN, P.; ARASU, M.V.; CHOI, H.S.; KIM, Y.O Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties.**BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, n.16, p. 264, 2016.

BARTOLD, P. M.; VANDYKE, T. M. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontology 2000**, v.62, p. 203–217, 2013.

BASCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bittermelon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. American **Journal of Health-System Pharmacy**, v. 60, n. 4, p. 356-359, 2003.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493–496, 1966.

BERTOL, G.; FRANCO, L.; OLIVEIRA, B.H. HPLC Analysis of Oxindole Alkaloids in *Uncaria Tomentosa*: Sample Preparation and Analysis Optimisation by Factorial Design. **Phytochemical Analysis**; v.23, n.2, p. 143–51, 2012.

BRESCÓ SALINAS, M.; COSTA R. N.; BERINI, AYTÉS. L.; GAY, E., C. Susceptibilidad antibiótica de las bacterias causantes de infecciones odontogénicas. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal** (Internet), v. 11, n. 1, p. 70-75, 2006.

BROOK, A.; NIEMIEC, D.V.M. Periodontal disease – topical review. **Companion Animal Medicine**, Santa Bárbara, v. 23, n. 2, p. 72-80, 2008.

BRUSCHI, M. L.; PANZERI, H.; FREITAS, O. D.; LARA, E. H. G.; GREMIÃO, M. P. D. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, p. 29-47, 2006.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **JANA**, v. 7, n. 2, p. 9-16, 2004.

COLMERY, B. The gold standard of veterinary oral health care. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.35, n. 4, p. 78-787, 2005.

CORRÊA, H.L; VENTURINI, M.A.F.A. Cálculo dentário subgengival. **Clínica Veterinária**, v.1, n.5, p.6-7, 1996.

COSTA, J. G. M.; NASCIMENTO, E. M.; CAMPOS, A. R.; RODRIGUES, F. F. Antibacterial activity of *Momordica charantia* (Curcubitaceae) extracts and fractions. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 45, 2010.

DANTAS. E.; XAVIER, C.; SEGUNDO, G.; PAIVA, M., LIMA, K. Dental staining by chlorhexidine: case report. **Odontologia Clínico-Científica**. v.6, p.8-175, 2007.

DAVIS, I.J.; JONES, A.W.; CREESE, A.J.; STAUNTON,R.; ATWAL, J.; CHAPPLE, I.L.C.; HARRIS, S.; GRANT, M.M. Longitudinal quantification of the gingival crevicular fluid proteome during progression from gingivitis to periodontitis in a canine model. **Journal of Clinical Periodontology** , v.43, p. 584–594, 2016.

DE MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. A. P.; DA SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy,** v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

DEBOWES, L.J. Odontologia: **Aspectos Periodontais**. In: Ettinger, S.J.; Feldman,E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1189-1205 p.

DEBOWES, L.J. **Problems with the gengiva**.In:Niemiec BA (Ed.), Small Animal Dental Oral and Maxillo facial Disease, a Color Handbook: London: Manson, 2010, 159-181p.

DEWHIRST, F. E., CHEN, T., IZARD, J., PASTER, B. J., TANNER, A. C., YU, W. H., LAKSHMANAN, A., WADE, W. G. The human oral microbiome. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002-5017, 2010.

DI STASI, L.C.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Fabalesmedicinais. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**.2. ed. São Paulo: Editora UNESP; 2002,276-320p.

DREIFUSS, A.A.; BASTOS-PEREIRA, A.L.; AVILA, T.V.; SOLEY, B.S.; RIVERO, A.J.; AGUILAR, J.L.; ACCO, A. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 130, p. 33-127, 2010.

EVANGELISTA, S. S.; SAMPAIO, F. C.; PARENTE, R. C.; BANDEIRA, M. F. C. L.. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 513-519, 2013.

FIORELLINI, J.P.; ISHIKAWA, S.O.; KIM, D.M. **Gingival inflammation**. In: Carranza FA, editor. Clinical periodontology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006, 355–361p.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in anendemicarea of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 229-232, 1996.

GATTUSO, M.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, S.; PEREYRA, E.L. Morphoanatomical studies of Uncaria tomentosa and Uncaria guianensis bard and leaves. **Phytomedicine**. v. 11(2-3), p. 213-23, 2004.

GIOSO, M. A. **Odontologia para o Clínico de Pequenos Animais**. 1ª ed.. São Paulo, 2003, 202p.

GIOSO, M. A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 2ª ed. São Paulo, 2007.13p.

GLASENAPP, J. S. **Variação aloenzimática e estrutura genética populacional de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae)**. Tese pós-graduação em genética e melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Coorientadores: Cosme Damião Crus e Ernane Ronie Martins.

GORREL, C. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsivier, 2010.

GORREL, C; GRACIS, M; HENNET, P; VERHAERT, L. FOCUS: **Doença Periodontal no Cão.**ed. Especial. Paris: Aniwa Publishing, 2004.

GRANT, L.; MCBEAN, D. E.; FYFE, L e WARNOCK, A. M. A review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 3, p. 199-209, 2007.

GROVE, T.K. Odontologia. Afecção periodontal. In:ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. Moléstias do cão e do gato.4.ed. SãoPaulo: Manole, 1997. v.2, 1523-1524 p.

GUEDES, R.M.C.; NUNES, V.A. **Patologias do Sistema Digestivo**. In: Serakides, R. Caderno didático: Patologia Veterinária. Belo Horizonte: FEPMVZ,269-318, 2006.p

HAIDA, K.S.; BARON, A.; HAIDA, K.S. Phenolic compounds and antioxidant activity of two varieties of guava and rue**. Revista Brasileira de Ciências da Saúde,** v.28, p. 11-19, 2011.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARVEY, C.E. **Basic Techniques – extraction and antibiotic treatment**. In HARVEY, C.E.; ORR, H.S. (2ª edição). Manual of Small Animal dentistry West Sussex: KCO.1992, 29-35 p.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a classof natural products of high pharmacological potency**. Biochemical pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HAWKINS, B.J. Periodontal disease in dogsandcats. In:MARRETTA, M.S. et al. **Veterinary dentistry: managingthe dental patient.**Orlando: Veterinary Learning Systems,1997,17-22. p

HEITZMAM, M.E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND G.B. Ethnobotany, phyto chemistry and pharmacology of Uncaria Rubiaceae. **Phytochemistry**, v.66, n.1, p. 5-29, 2005.

HENNET, P. Effectiveness of a dental gel to reduce plaque in beagle dogs. Journal of **Veterinary Dentistry**, v.19, n.1, p.11-14, 2002.

HOLCOMBE, L.J.; PATEL, N.; COLYER, A.; DEUSCH, OLIVER.; O'FLYNN, C.; STEPHEN., EARLY. Canine Plaque Biofilms: Characterization of Key Bacterial Interactions Involved in Initial Colonization of Enamel.**PLOS ONE** , v.2, p. 1-24, 2014.

HORST, E. K.;HANS-GEORG, L. **Anatomia dos Animais Domésticos** - Texto e Atlas Colorido, 6ed, artmed, 2016. 307p.

HORTENSE, S. R.; CARVALHO,E. D. S.; CARVALHO, F. S. D.; SILVA, R. P. R. D.; BASTOS, J. R. D. M.; & BASTOS, R. D. S. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.

ILHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. R. L.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 387-393, 2008.

JURGENSEN, S.; DALBO, S.; ANGERS, P.; SANTOS, A.R.; RIBEIRO DO-VALLE, R.M. Involvement of 5-HT2 receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa***. Pharmacology Biochemical Behavior**. v. 81, n.3, p77- 466, 2005.
KANERIA, M.; KANANI, B.; CHANDA, S. Assessment of effect of hydroalcoholic and decoction methods on extraction of antioxidants from selected Indian medicinal plants. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 195-202, 2012.

KAUR, G.; JABBAR, Z.; ATHAR, M.; ALAM, M. S. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice**. Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 984-993, 2006.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antivacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **Journal of Ethonopharmacology**. v. 99, n.2, p. 12- 309, 2005.

KÖNIG, J.; STORCKS, V.; KOCHER, T.; BÖSSMANN, K.; PLAGMANN, H. C. Anti-plaque effect of tempered 0.2% chlorhexidine rinse: an in vivo study. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 3, p. 207-210, 2002.

KUETE, V.; TANGMOUO, J. G.; BENG, V. P.; NGOUNOU, F. N.; LONTSI, D. Antimicrobial activity of the methanolic extract from thest embark of Trides moste monomphalocarpoides (Sapotaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 104, n. 1, p. 5-11, 2006.

LACERDA, M.S.; ALESSI, A.C. Avaliação histobacteriológica de dentes envolvidos com doença periodontal em cães, após raspagem periodontal. **Journal of Bioscience**, v.18, n.1, p.137-149, 2002.

LANZA M. D.; HENRIQUES S. E. F.; MARTINS F.F. **Limites cervicais dos preparos de dentes com finalidade restauradora.** In: HENRIQUES S. E. F. Reabilitação Oral: Filosofia, Planejamento e Oclusão. São Paulo: Santos, 2003. Cap.11, p.233-49.

LASCALA, N.T.; MOUSSALLI, N.H. **Compêndio terapêutico periodontal**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1995. 263p.

LEVY, A.S.; CARLEY, S. Cytotoxic activity of hexane extracts of *Psidium Guajava L* (Myrtaceae) andcassia Alata L (Caesalpineaceae) in Kasumi-1 and OV2008 cancercelllines, **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**,v.11, n.2, p. 201-207, 2012.

LINDHE J.; LANG N. P.; KARRING T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**.5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, 1304p.

LIM, D. W.; KIM, J. G.; HAN, D E KIM, Y. T. Analgesic effect of *Harpagophytum procumbens* on post operative and neuropathic pain in rats. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1060-1068, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M**. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa:Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002, 512 p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2 ed., São Paulo, 2008, 350-351 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001, 1088p.

MANRIQUE, A. J.;SANTANA, W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejassinaguijón, Melipon aquadrifasciata, Melipon acompressipes, Tetragoniscaangustula y Nannotrigona sp. de Brasil y Venezuela.**Zootecnia Tropical**. [online],v.26, n.2,2008.

MARRETA, S.M. Periodontia. In.: ROZA, M.R. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2004. 119-134 p.

MARTINO, L.; MARTINO, J.L.; FRANCESCHELLI, S.; LEONE, A.; PIZZA, C.; DE FEO, V. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 107, n.1, p. 4-91, 2006.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 3. ed**. Fortaleza: Edições UFC**, 2009, 148 p.

MELO, A. F. M.; SANTOS, E. J. V.; SOUZA, L. F. C.; CARVALHO,A.A. T.; PEREIRA, M. S. V.;HIGINO,J. S. Atividade antimicrobiana in vitrodo extrato de *Anacardium occidentale L*. sobre espécies de Streptococcus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p.202-205, 2006.

METWALLY, A. M.; OMAR, A. A.; HARRAZ, F. M.; EL SOHAFY, S. M. et al. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, n. 23, p. 212, 2010.

MONFRIN, R. C. P. E RIBEIRO, M. C. Avaliação *in vitro* de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 54, n. 5, p. 400-407, 2000.

NAIR, RATHISH; CHANDA, SUMITRA. In-vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 452-458, 2007.

NAKAMURA, Y.; ISHIMITSU, S.; TONOGAI, Y. Effects of quercetin and drutin on serumand he paticlipid concentrations, fecal steroid excretion and serum antioxidant properties**. Journal of Health Science**, v. 46, n. 4, p. 229-240, 2000.

NEVES, C. C.; BRACCIALLI, C. S.; HATAKA A.; FELICIANO, M. A. R. Avaliação do conhecimento de proprietários dos Animais de Companhia sobre Higiene Oral. **Revista Científica Eletrônica De Medicina**, n. 18, 2012.

NIEMIEC, B. A. Periodontal disease. **Topics in companion animal medicine**, v. 23, n. 2, p. 72-80, 2008.

OJEWOLE, J. A. Antiinflamatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. **Methods and findings in Experimental and clinical pharmacology**, v. 28, n. 7, p. 441-446, 2006.

PAIVA, L.C.A.; RIBEIRO, R.A.; PEREIRA, J.V.; OLIVEIRA, N.M.C. Avaliação clínica e laboratorial do gel da Uncaria tomentosa (Unha de Gato) sobre candidose oral. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n.2A, p. 423-8, 2009.

PEREIRA, A.V; AZEVÊDO, T.K.B; HIGINO, S.S.S; SANTANA, G.M; TREVISAN, L.F.A; AZEVEDO, S.S; PEREIRA, M.V; PAULA, A.F.R. Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. **Revista AGROTEC**. v. 36, n. 1, p. 121-127, 2015.

PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V.; SAMPAIO, F.C.; SAMPAIO, M.C.C.; ALVES, P.M.; ARAÚJO, C.R.F.; HIGINO, J.S. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira Farmacognnesia**, v. 16, p. 88-93, 2006.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; FIORINI, J.E.; SCHNEEDORF, J.M. Clinical and microbiological effects of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) on dental plaque forming bacteria in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v.62, n.3, p.85-578, 2010.

PONZI, E. A. C.; OLIVEIRA, T. L. D.; MORAIS, I. A. F. D.; SILVA JÚNIOR, J. J. D.; GERBI, M. M.; SOUZA, I. A. D., PSIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 10, n. 1, p. 89-94, 2010.

RIBEIRO, A. A., LANGBEHN, J. K., DIAMANTE, N. A., RHODEN, S. A., & PAMPHILE, J. A. MICROBIOMA HUMANO: UMA INTERAÇÃO PREDOMINANTEMENTE POSITIVA. **REVISTA UNINGÁ REVIEW,** v. 19, n. 1, 2014.

ROBERTS, F. A.; DARVEAU, R. P. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. **Periodontology 2000**, v. 69, p.18–27, 2015.

ROCHA,W. S.;LOPES,R. M.;DA SILVA,D. B.;VIEIRA,R. F.; DA SILVA, J. P.;AGOSTINI-COSTA,T. DA S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do Cerrado.**Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 292-299, 2002.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; VIVIEN-CASTIONI, N.; GURNY, Robert. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 83-99, 2000.

SEMEDO-LEMSADDEK, T.; TAVARES, M.; SÃO BRAZ, B.; TAVARES, L.; OLIVEIRA, M. Enterococcal infective endocarditis following periodontal disease in dogs. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146860, 2016.

SETTY, A. R. E SIGAL, L. H . Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. Elsevier, 2005. p. 773-784.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F.Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 455-62, 2006.

SILVA,M. V. S., FRAZÃO,T. S., FERREIRA,M. M. A. V.;VIEIRA,D. B.;DO VALE,R. F. F.;DO CARMO,L. H.; YANO,T;DE FIGUEIREDO,P. M. S. Assessment in Vitro of

Antibacterial Activity of Manipulated Product, on Solution Form, Obtained from Dry Extract of Leaves of *Psidium guajava* L.**International Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 64, 2015.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G.K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extract susing in vitro models. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.81-6, 2002.

SINGLETON, V. L; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**. v.299, p. 152–178, 1999.

SVOBODA, J.M. Periodontal disease: prophylaxis and oral hygiene procedures. **EMC Dentisterie** , v.1, n.1, p. 349-360, 2004.

TEIXEIRA, P. M. **Doença periodontal em cães: nível de conhecimento dos proprietários acerca da doença e da sua profilaxia.** 81f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária)-Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2016.

TELHADO,J.; MAGANIN, A.J.;DIELE, C. A.;E MARINHO, M. S. Incidência de cálculo dentário e doença periodontal em cães da raça pastor alemão. **Ciência Animal Brasileira,**v. 5, n. 2, p. 99-104, 2004

THOMAS, M. M. G e BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 13, n. 3, p. 289-300, 1985.

VAN DYKE, T. E. Guest editorial: the etiology and pathogenesis of periodontitis revisited. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 1, 2009.

VAN DYKE, T. E.; DAVE, S.Risk factors for periodontitis. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 7, n. 1, p. 3, 2005.

VELURI, R.; WEIR, T. L.; BAIS, H. P.; STERMITZ, F. R.; VIVANCO, J. M. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1077-1082, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. Plant drug analysis: a thin layerchromatography atlas. **Berlin: Springer Verlag**, 1984. 320 p.

WANG, R.; DING,Y.; LIU, R.; XIANG,L.; DU, L. Pomogranate: constituents, bioactivities and Pharmacokinetics.**Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**. v. 4, n. 2, p. 77-87, 2010.

WIGGS, R.; LOBPRISE, H. Veterinary dentistry, principles and practice. Philadelphia: **Wiley Online Library**. p. 152, 1997.

WILLARD, M. D. Distúrbios da cavidade oral, faringe e esôfago. In: COUTO, C. G.; NELSON, R. W. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 398-399 p.

WILLIAMS, R.C. Odontologia. Afecção periodontal. In:ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. Moléstias do cão e do gato. 4.ed. SãoPaulo: Manole, 1997. v.2, 1523-1524 p.

YESILADA, E.; SEZIK, E.; HONDA, G.; TAKAISHI, Y.; TAKEDA, Y.; TANAKA, T. Traditional medicine in TurkeyIX::Folk medicine in north-west Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 195-210, 1999.

YOSHIMOTO, T.; FURUKAWA, M.; YAMAMOTO, S.; HORIE, T.;WATANABE-KOHNO, S. Flavonoids: potent inhibit ors of arachidonate 5-lipoxygenase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 116, n. 2, p. 612-618, 1983.

ZANINI, A.C.; BASILE, A.C.; MARTIN, M.I. et al. **Guia de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1995. 787p

ZHU, BAOLI., WANG, XIN., LI, LANJUAN. Human gut microbiome: the second genome of human body. **Protein & cell**, v. 1, n. 8, p. 718-725, 2010.