

FÁBIO ALESSANDRO PIERI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)
E SEUS CONSTITUINTES, E AVALIAÇÃO DO BIOPRODUTO OBTIDO NA
INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DA PLACA DENTAL DE CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P618a
2012

Pieri, Fábio Alessandro, 1980-
Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba
(*Copaifera langsdorffii*) e seus constituintes, e avaliação do
bioproduto obtido na inibição de bactérias da placa dental de
cães / Fábio Alessandro Pieri. – Viçosa, MG, 2012.
xix, 91f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 80-91.

1. Doenças - Prevenção. 2. Odontologia veterinária. 3. Cão.
4. Bactérias. 5. Antissépticos. 6. *Copaifera*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08976

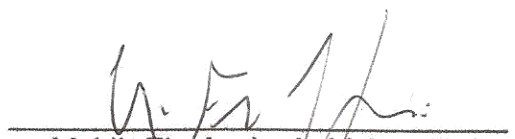
FÁBIO ALESSANDRO PIERI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)
E SEUS CONSTITUINTES, E AVALIAÇÃO DO BIOPRODUTO OBTIDO NA
INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DA PLACA DENTAL DE CÃES.**

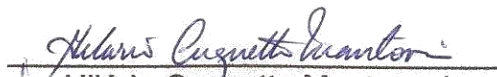
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 16 de fevereiro de 2012.


Luís Augusto Nero
(Coorientador)


Valdir Florêncio da Veiga Júnior
(Coorientador)


Marco Antônio Gioso


Hilário Cuquetto Mantovani


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

***A minha mãe, razão maior desta conquista, com todo amor!
Saudades eternas! E a todos que acreditaram e a tornaram real.***

*“E os saberes sobre as plantas, que curam,
se consolidariam como precursores das ciências
farmacêuticas sob novas nomenclaturas e com
outras nacionalidades. Os saberes dos brasilíndios
foram silenciados enquanto cientistas estrangeiros
extraíam o princípio ativo das plantas brasileiras...”*

(Marques, 1999)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e iluminar meu caminho e sem o qual nada poderia ter sido realizado e a Santo Expedito, de minha devoção;

À minha mãe, Adla Maria Martins (*in memorian*), que com sua força de vontade, perseverança, superação, garra, amor, devoção pelos seus filhos, me ensinou uma nova lição a cada dia de sua vida e continua ao meu lado e em meus pensamentos por todos os meus dias até que possamos nos encontrar novamente;

Ao meu irmão Diogo (te amo irmão!), companheiro de todos os momentos, à minha cunhada Renata e à minha afilhada linda, Sarah, pelos momentos de descanso, carinho e apoio incondicional;

À minha noiva Carol, que apesar da distância me apóia com todo o companheirismo, suporte, amor, carinho, compreensão, lições de bondade (é, ainda existem pessoas boas, e ela é uma), tudo isso regado a uma maravilhosa dose de bom humor e muitas risadas;

Ao pessoal de Jundiaí, meu sogro, Césão, apicultor, marceneiro, ferreiro e Médico pediatra nas horas vagas, minha sogra Neusa, à Juliana, minha cunhada Juliana, ao Gabriel, a Maiara, a Duda, o Rafael, o Roberto, a Cristina, à Nena e à Vanda;

À meus familiares, Hilário, Magda, Nego, Bia, Cleusa, Bianca, Guilherme, Roberta, Janaína, Júlia, Giovana, Laís, Guto, Cleonice, Junior e Matheus, Paula, Cleito, João e Selma pela incontestável ajuda e apoio durante a etapa mais difícil de minha vida;

A meu pai, José Carlos Pieri pelo apoio.

À minha orientadora, professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, por todo apoio, ensinamentos, e por realizar com extrema maestria a missão de me orientar, sempre com muita atenção, carinho, alegria e idoneidade científica;

Ao meu co-orientador, professor Luis Augusto Nero, a quem dedico muita admiração pelo seu profissionalismo, comprometimento e comportamento ético, por todos os ensinamentos durante meu treinamento, principalmente após meu ingresso na

comissão coordenadora do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFV, e pela amizade e confiança dispensada;

Aos meus co-orientadores, os Professores Abelardo Silva Junior, Andréa Pacheco Batista Borges e Valdir Florêncio da Veiga Junior pela atenção, auxílio, preocupação e suporte à realização deste trabalho;

Às secretárias da pós Rosi e Bete por toda a imensurável ajuda em todos os momentos de meu doutorado, pela agradável convivência durante meu mandato na comissão coordenadora da Pós-Graduação e pela preocupação e carinho com todos os alunos do programa;

Aos meus parceiros de república, Alexandre, André, Diogo, Lucas, Rafael e muito especialmente ao Artur e ao Guilherme, pelo longo tempo de convivência que me proporcionou diversos aprendizados. Levo vocês como irmãos em minha vida!

Ao meu grande amigo Cristian pelas festas, reuniões, sinucas, conversas, discussões científicas (ou não...) e pela extrema parceria nestes últimos 3 anos que nos rendeu esta amizade tão forte e sólida;

Ao “meu filho” Vitor (é assim que a Cida se refere a ele...), pela imensa dedicação na realização deste trabalho, tanto durante seu período como bolsista de iniciação científica, como após o fim de sua bolsa, e principalmente pelo forte vínculo de amizade que se formou entre nós;

Ao grande amigo João Carlos pela companhia nas tardes no DVT quando, ao sabor do inigualável café da Margô, tentávamos entender a complexidade existente entre amendoins e caveiras. Um dia ainda vamos entender... (é João, não resisti fazer esta paráfrase de sua dissertação...);

Aos grandes amigos do grupo Alfêneas pelas excepcionais confraternizações, todo fim de ano em Alfenas, que sempre fizeram com que eu voltasse a Viçosa com mais energia para concluir este trabalho;

A todos os estagiários que em algum momento tiveram atividades importantes para a realização deste trabalho: Lígia, Lívia, Marina Campos, Marina Vermelho, Mayara, Raphaela, Ana Carolina;

À Isabel (saudades da gargalhada!!!), Lucas (você é do laboratório?), David (ei, pequeno polegar!), Pricila, Maria Alejandra (Hola, Fávio), Bernardo, Pedro, Carol (a Mala!!! rrsrs), Isis, Larissa, e Elisa (agregada) colegas de LDBAC pelo companheirismo, amizade, alegria e principalmente por todas as tardes divertidíssimas.

Aos amigos Camila, Letícia, Raul e Livia pela imensa ajuda no experimento “in vivo”, fazendo a limpeza dental de todos os 18 cães do experimento;

Aos colegas do LIPOA pelo bom convívio durante os anos de realização deste projeto;

A todos os colegas do programa, os quais tive a honra de representar por 2 anos e 3 meses na coordenação do programa, pela confiança depositada;

À Universidade Federal do Amazonas pela autorização para o professor Valdir me co-orientar e permitir a realização de uma etapa deste projeto em seu Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia;

Ao discente de Doutorado da UFAM, Fabiano Vargas pelo auxílio durante a etapa química deste projeto;

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária, pela minha formação profissional e ética;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento deste trabalho, sem a qual seria impossível realizá-lo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado, fundamental para o meu sustento e permanência em Viçosa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de uma bolsa de iniciação científica e uma de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação para o Vitor e a Marina me auxiliarem na execução deste trabalho.

E a todas as pessoas que participaram desta etapa da minha vida e conviveram comigo durante a estadia em Viçosa-MG.

BIOGRAFIA

Fábio Alessandro Pieri, filho de Adla Maria Martins (*in memorian*) e José Carlos Pieri, nasceu no dia 24 de Julho de 1980 em Recife-PE.

Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2004), possui o título de Mestre em Ciência Animal obtido no programa de mestrado da Universidade José do Rosário Vellano na cidade de Alfenas-MG.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em nível de Doutorado, em março de 2008 e foi bolsista CAPES desde outubro de 2009. Nesta Universidade atuou como membro efetivo da comissão coordenadora do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária de janeiro de 2010 até Março de 2012, foi conselheiro efetivo do Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão (CEPE/UFV) no ano de 2011 e atuou como coordenador de imprensa da Associação de Pós-Graduandos da UFV na gestão 2010/2011. Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase nos seguintes temas: Odontologia, Microbiologia e Fitofarmacologia;

Atuou como docente substituto da Universidade Federal de Alfenas, ministrando o conjunto de disciplinas Microbiologia e Microbiologia Básica para os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas durante o primeiro semestre de 2008. Foi também professor adjunto da FAMINAS, em Muriaé-MG, ministrando no segundo semestre de 2009 o conjunto de disciplinas Microbiologia Clínica e Controle de Qualidade Microbiológico para o curso de Farmácia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Periodontia.....	3
2.1.1. Anatomia Dental dos Cães.....	4
2.1.2. Doença Periodontal.....	10
2.2. Copaiba.....	25
2.2.1. Histórico.....	27
2.2.2. Extração da óleo-resina.....	29
2.2.3. Composição química da óleo-resina.....	31
2.2.4. Aplicações industriais do óleo de copaíba.....	33
2.2.5. Utilização medicinal do óleo de copaíba.....	35
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1. Extração do óleo de copaíba.....	39
4.2. Avaliação do potencial antibacteriano do óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i>	40
4.3. Fracionamento do óleo de copaíba e identificação de suas frações.....	42
4.4. Isolamento e identificação de bactérias da placa dental de cães.....	43

4.5. Avaliação de atividade antimicrobiana do óleo de copaíba e de suas frações sobre os isolados da placa dental de cães.....	46
4.6. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba e do composto selecionado sobre isolados da placa dental de cães.....	47
4.7. Avaliação da inibição da formação da placa dental em “in vivo”	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. Extração do óleo de copaíba.....	51
5.2. Avaliação do potencial antibacteriano do óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i>	52
5.3. Fracionamento do óleo de copaíba e identificação de suas frações.....	56
5.4. Isolamento e identificação de bactérias da placa dental de cães.....	57
5.5. Avaliação de atividade antimicrobiana do óleo de copaíba e de suas frações sobre os isolados da placa dental de cães.....	66
5.6. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba e do composto selecionado sobre isolados da placa dental de cães.....	70
5.7. Avaliação da inibição da formação da placa dental em “in vivo”	74
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais estruturas da anatomia do órgão dental em cães.....5

Figura 2 – Organização da placa dental em cães: A) camada inicial monocelular de cocos e bastonetes Gram-positivos, distribuída irregularmente no dente; B) formação de placa única com crescimento microbiano de cocos e bastonetes Gram-positivos e produção de glicocálix; C) aumento da diversidade microbiana com adesão de bastonetes Gram-negativos; D) maturação do biofilme com presença de espiroquetas.....13

Figura 3 – Evolução da doença periodontal: A) Inicialmente com o periodonto sadio, a gengiva se apresenta rósea, sem edemaciação, o osso alveolar circunda por completo a raiz do dente; B) Na gengivite a gengiva se torna avermelhada, com leve edemaciação o osso alveolar continua ao redor de toda a raiz do dente; C) Com o desenvolvimento da periodontite leve visualiza-se a gengiva inflamada, avermelhada e há leve perda de sustentação do dente com a absorção do osso alveolar; D) Nas fases de periodontites moderada e severa há perda grave da sustentação do dente, com absorção severa do osso alveolar e a gengiva, muito inflamada pode se apresentar cianótica.....17

Figura 4 – Cão da raça poodle de 2 anos apresentando gengivite; A) rubor da região marginal da gengiva.....18

Figura 5 – Cão da raça poodle de 2 anos apresentando gengivite; A) rubor da região marginal da gengiva.....21

Figura 6 – Cão da raça Poodle, 14 anos, com doença periodontal severa. Observe coroa dental com grande presença de cálculo (a), retração gengival visível (b) e gengiva hiperêmica(c).....	21
Figura 7 – Proprietário praticando escovação dental em cão da raça poodle.....	22
Figura 8 – Árvores de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) localizadas na cidade de Alfenas-MG, sob as coordenadas geográficas 21°26'33" sul e 46°0'55" oeste.....	26
Figura 9 – Árvore de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) perfurada e preparada para extração de óleo-resina. 1 e 2: furos, superior e inferior com cano de PVC introduzido, em orifício produzido na árvore, para facilitar o escoamento do óleo.....	40
Figura 10 – Exsicata de <i>Copaifera langsdorffii</i> depositada no Herbário VIC, do departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.....	51
Figura 11 – Médias dos halos de inibição resultantes da ação de solução com óleo de copaíba a 10% (<i>Copaifera langsdorffii</i>) sobre diversos patógenos bacterianos.....	53
Figura 12 – Identificação em nível de gênero de 183 isolados da placa dental de cães baseada no sequenciamento de um fragmento do rDNA 16s.....	58

Figura 13 – Agrupamento genético de 183 isolados obtidos da placa dental inicial de 10 cães entre um e dois anos sem sinais clínicos de doença periodontal. Como grupo externo foi utilizada uma sequência de <i>Sulfolobus</i> sp depositada no GenBank.....	64
Figura 14 – Atividade antimicrobiana dos diferentes tratamentos contra diversos isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães.....	68
Figura 15 – Médias dos halos de inibição bacteriana de uma solução a 10% da fração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, obtida do óleo de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>), denominada Q-BIOMA 639, contra 20 isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães.....	71
Figura 16 – Visualização das placas obtidas no teste de concentração inibitória mínima utilizando resazurina 0,01% como indicador colorimétrico. Cada isolado foi inoculado em seis orifícios, sendo os três primeiros com a substância testada e os três seguintes apenas com o meio de cultura como controle de crescimento. Destacado em amarelo o resultado positivo para inibição da bactéria, onde não há conversão do corante para rosa, e há conversão nos três orifícios do controle. Em preto destacado isolado que não obteve crescimento no meio de cultura sem antimicrobiano, tornando o resultado nulo para este isolado. Em vermelho resultado negativo para inibição da bactéria: Há conversão do corante para rosa pela bactéria nos orifícios com a substância teste. Destacado em verde o controle de esterilidade dos meios utilizados.....	73

Figura 17 – Percentual do total de 32 de isolados da placa dental de cães com as Concentrações Inibitórias Mínimas estabelecidas nas diferentes concentrações do óleo de *Copaifera langsdorffii*.....75

Figura 18 –. Percentual do total de 33 isolados da placa dental de cães com as Concentrações Inibitórias Mínimas estabelecidas nas diferentes concentrações do composto LDBACUFV01..75

Figura 19 – Formação de placa bacteriana dental, após 15 dias de tratamento dos diferentes grupos; O resultado é expresso pelo percentual da área total da face vestibular dos dentes canino, molares e pré-molares superiores cobertos por placa bacteriana. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães de um a dois anos, sem sinais clínicos de doença periodontal, identificados em nível de espécie por suas sequências de fragmento do rDNA 16S comparadas com as depositadas no GenBank.....	59
Tabela 2 – Isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães de um a dois anos, sem sinais clínicos de doença periodontal, identificados a nível de gênero por suas sequências de fragmento do rDNA 16S comparadas com as depositadas no GenBank.....	60
Tabela 3 – Concentrações inibitórias mínimas do óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i> , e de um de seus sesquiterpenos e de clorexidina sobre isolados bacterianos oriundos da placa dental de cães.....	72

RESUMO

PIERI, Fabio Alessandro, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e seus constituintes, e avaliação do bioproduto obtido na inibição de bactérias da placa dental de cães.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-orientadores: Abelardo Silva Junior, Andréa Pacheco Batista Borges, Luis Augusto Nero e Valdir Florêncio da Veiga Junior

A doença periodontal acomete cerca de 85% dos cães com mais de quatro anos de idade e é causada pelo acúmulo de placa bacteriana na superfície dos dentes e pela reação do organismo a esta. O óleo de copaíba apresentou, anteriormente, resultados positivos na inibição da placa dental em cães, entretanto faltam estudos que identifiquem esta atividade sobre as bactérias oriundas de cães “in vitro” e que estabeleçam as substâncias ativas do óleo. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e seus constituintes, e avaliar o bioproduto obtido na inibição de bactérias da placa dental de cães. Foi utilizado um óleo de *C. langsdorffii*, submetido a fracionamento guiado por bioensaio e sua última fração teve seus compostos identificados. Para confecção da bacterioteca deste trabalho a placa dental supragengival de dez cães com idade entre um e dois anos foi obtida, cultivada em ágar Mitis Salivarius com diluições seriadas para obterem-se colônias isoladas e culturas puras a partir delas. As bactérias foram identificadas utilizando a técnica de PCR para amplificação de parte do gene 16S do rDNA e os fragmentos amplificados foram sequenciados e comparados com as seqüências depositadas no GenBank. O óleo íntegro teve sua capacidade antimicrobiana testada, por teste de difusão em ágar, contra 27 isolados de *Escherichia coli* provenientes de leite mastítico, um isolado de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e de *Haemophilus parasuis* além de cepas de referência de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Proteus mirabilis, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* e *Citrobacter freundii*. A capacidade antibacteriana do óleo íntegro e de suas frações iniciais foi testada contra 20 isolados da bacterioteca da placa dental com a mesma metodologia. Dos compostos majoritários identificados na última fração obtida foi selecionado um que teve sua concentração inibitória mínima avaliada sobre 34 isolados da bacterioteca e testado em ensaio com cães para verificar sua capacidade de inibir a formação de placa “in vivo” comparado a um controle negativo e um positivo com clorexidina 0,125%. Da placa dental dos 10 cães foi obtida uma bacterioteca de 183 isolados com predominância dos gêneros *Staphylococcus* (20,2%), *Enterococcus* (19,1%) e *Streptococcus* (18%). O óleo íntegro inibiu o crescimento das cepas padrão de *E. coli*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* com halos de inibição de 17, 18, 15 e 18mm respectivamente. Oito isolados selvagens de *E. coli* foram sensíveis ao óleo apresentando halos que variaram de 12 a 34mm. Quando testado sobre isolados da placa dental de cães, o óleo de copaíba inibiu 16/20 isolados de diversos gêneros com halos variando entre 10 e 15mm, e com relação às suas frações, a não ácida se apresentou superior, com atividade sobre 17/20 isolados e foi refractionada, por ter ação contra mais isolados do que a fração ácida, que inibiu apenas 8/20 isolados. A última fração foi obtida da não ácida e foi capaz de inibir 18/20 isolados da bacterioteca da placa dental de cães. O composto selecionado foi denominado LDBACUFV01 e teve sua concentração inibitória mínima estabelecida sobre 33 isolados da bacterioteca, sendo capaz de inibir 72% e foi considerado habilitado para o ensaio “in vivo”. Um bioproduto foi formulado com este composto e aplicado nos dentes de cães por 15 dias, sendo considerado superior ao controle negativo ($p<0,001$) e positivo ($p<0,05$) na redução da formação de placa bacteriana na superfície dental, pois a área de cobertura de placa nos dentes dos cães foi de

23,3%, 65% e 37,5% respectivamente. Conclui-se que o óleo de copaíba possui capacidade antimicrobiana sobre bactérias componentes da placa dental de cães e que o bioproduto obtido, com um composto da fração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos do óleo, pode ser utilizado para redução da placa dental de cães.

ABSTRACT

PIERI, Fabio Alessandro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*) and its constituents, and evaluation of obtained bioproduct in inhibition of dental plaque bacteria in dogs.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Abelardo Silva Junior, Andréa Pacheco Batista Borges, Luis Augusto Nero e Valdir Florêncio da Veiga Junior

Periodontal disease affects about 85% of dogs older than four years and is caused by the buildup of plaque on the tooth surface and its body's reaction. In other work, Copaiba oil presented positive results in the inhibition of dental plaque in dogs, however the literature do not present any study that identifying this activity against bacteria from dog's dental plaque "in vitro" and to establishing the oil active substances. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*) and its constituents, and evaluate the bioproduct obtained in the inhibition of dental plaque bacteria in dogs. *C. langsdorffii* oil was used, subjected to bioassay-guided fractionation and its last fraction had its compounds identified. The supragingival dental plaque of ten dogs aged between one and two years was obtained, grown on Mitis Salivarius agar with serial dilutions to obtain isolated colonies that was cultivated to pure cultures. The bacteria were identified using the PCR technique to amplify a part of the 16S rDNA gene and the amplified fragments were sequenced and compared with the sequences deposited in GenBank. The oil's antimicrobial activity was tested by agar diffusion test against 27 isolates of *Escherichia coli* from mastitic milk, an field isolated of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* and reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* and *Citrobacter freundii*. The antibacterial ability of oil and its fractions was tested against 20 isolates of dog's

dental plaque bacteria with the same methodology. One of the major compounds identified in the last fraction obtained was selected and had its minimum inhibitory concentration evaluated against 34 isolates of dental plaque bacteria from dogs and was tested in an assay using dogs to check their ability to inhibit plaque formation "in vivo" compared to a negative control and a positive with 0.125% chlorhexidine. Dental plaque was obtained from 10 dogs and 183 isolates were isolated and identified with a predominance of the genera *Staphylococcus* (20.2%), *Enterococcus* (19.1%) and *Streptococcus* (18%). Copaiba oil inhibited the standard strains of *E. coli*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* with inhibition zones with 17, 18, 15 and 18mm respectively. Eight wild strains of *E. coli* were sensitive to the oil showing halos ranging among 12 to 34mm. When tested on dental plaque bacteria isolated from dogs, copaiba oil inhibited 16/20 isolates with halos ranging among 10 and 15mm, and with respect to its constituents, the not acid fraction was more effective than acid fraction, with activity against 17/20 and 8/20 isolates respectively. The last fraction was obtained from the not acid and was able to inhibit 18/20 of target isolates. The selected compound was called LDBACUFV01 and had established its minimum inhibitory concentration against the isolates, being able to inhibit 72% and was considered qualified for the "in vivo" assay. The bioproduct was applied in dogs and had better effect in reducing dental plaque the formation than negative control ($p<0.001$) and positive control ($p<0.05$), with plaque coverage about 23.3%, 65% and 37.5% of total area of teeth respectively. In conclusion, copaiba oil presented antibacterial activity against bacteria of dogs dental plaque and a bioproduct obtained, with a sesquiterpene component of this oil, may be used in reduction of dental plaque in dogs.

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal, que envolve as estruturas de suporte e proteção dos dentes, é a enfermidade que mais acomete os cães, chegando a cerca de 85% de prevalência em animais com idade superior aos quatro anos. Esta doença tem como agente etiológico a placa bacteriana, que se desenvolve sobre a superfície dental, e a reação do sistema imunológico a estes agentes. A placa bacteriana se forma com a colonização inicial da superfície dental por bactérias autóctones, que favorecem a aderência de outras mais virulentas. Nesse ínterim, pode-se afirmar que o combate aos micro-organismos da fase inicial, colonizadoras iniciais da placa bacteriana, reverte-se numa ação preventiva em relação à formação da doença periodontal.

Entre várias formas de combate à placa dental, a mais indicada é a escovação. Outro meio de prevenir a formação da placa seria a administração de substâncias antibacterianas, que, ao impedirem o crescimento, adesão, ou ao destruírem bactérias, inibem também o desenvolvimento da placa bacteriana. Uma substância que é muito utilizada por veterinários e dentistas em tratamentos odontológicos é a clorexidina, usualmente comercializada na concentração de 0,12%. Entretanto, o uso da clorexidina deve ficar restrito a poucos dias, em tratamentos curtos, devido a seus efeitos indesejáveis, como escurecimento do esmalte dental, perda de paladar, ardência na cavidade oral e ulcerações na mucosa jugal, em de tratamentos mais longos.

Por esta razão, tem-se pesquisado novas substâncias com ação antimicrobiana sobre as cepas orais mais importantes na formação da placa dental, visando o estabelecimento de uma nova terapia preventiva alternativa associada à escovação, tanto para humanos quanto para cães.

A medicina tradicional, baseada em produtos naturais, tem servido como grande fonte de medicamentos alternativos para uso terapêutico em diversas doenças. A copaíba (*Copaifera* sp.) é uma árvore que tem se destacado, em especial no Brasil, por fornecer um óleo que possui indicações terapêuticas de diversas naturezas e, também, muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de confirmar suas propriedades, das quais se destacam suas atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, anti-sépticas e, mais recentemente, antitumorais.

Ensaio “in vitro”, têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba sobre componentes importantes da placa dental em humanos, como *Streptococcus mutans*. Entretanto, nenhum trabalho foi realizado até o momento para verificar sua atividade sobre bactérias provenientes da placa dental de cães.

Devido à alta incidência da doença periodontal em cães, aos inúmeros efeitos indesejáveis decorrentes do uso da clorexidina, o não conhecimento da microbiota da placa dental inicial e a necessidade de buscar alternativas de tratamento, este trabalho objetivou a identificação de compostos ativos do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) capazes de inibir bactérias componentes da placa dental de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Periodontia

A periodontia é a ciência que tem por objetivo o estudo do periodonto e o diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades que acometem este, visando à promoção e o restabelecimento da saúde bucal (Harvey e Emily, 1993; Roman et al., 1995).

O periodonto é o conjunto de estruturas que adjacentes ao elemento dental, fornece suporte e proteção ao mesmo. Estas estruturas são: gengiva, cemento, osso alveolar e ligamento periodontal (Harvey e Emily, 1993; Roman et al., 1995; De Marco e Gioso, 1997; Clarke, 2001).

A doença periodontal é a doença mais comum em cães e acomete cerca de 85% dos animais com mais de quatro anos de idade. Esta doença é progressiva e envolve duas fases: gengivite (reversível) e periodontite (irreversível, mas muitas vezes controlável). É causada pelo acúmulo de placas nos dentes. A placa é uma membrana, aderente, constituída por bactérias da saliva e fragmentos. As bactérias e os produtos bacterianos causam inflamação do tecido mole. A placa mineraliza-se para formar o cálculo dental, e migra para o interior do sulco gengival, provocando inflamação adicional, perda do ligamento periodontal, perda óssea e, por fim, perda do dente (Ford e Mazzaferro, 2007).

As afecções que acometem a cavidade oral devem ser identificadas em seus estágios iniciais, para que os animais possam ser tratados antes de apresentarem graves transtornos sistêmicos secundários relacionados à desnutrição e/ou infecções (Pachaly, 2006). Deve-se também atentar para formas de prevenção da

doença como escovação dental dos animais e uso de antimicrobianos como adjuvantes na terapia periodontal (De Marco e Gioso, 1997).

2.1.1. Anatomia Dental dos Cães

Como na maioria dos mamíferos domésticos e seres humanos, cães possuem dentição difiodonte, apresentando dois conjuntos de dentes, um decíduo ou primário e outro permanente, embora sejam edêntulos ao nascimento (Harvey, 1992).

A anatomia oral dos cães possui subdivisões e estruturas semelhantes às dos humanos (Fig. 1), diferindo na forma da cavidade, que varia inclusive entre as raças (Roza, 2004), na anatomia e quantidade dos elementos dentais contidos e no ápice dos dentes (Harvey e Emily, 1993). Os cães possuem, assim como os humanos, dentes incisivos, caninos, pré-molares e molares, diferindo entre si quanto às funções e números de raízes (Roza, 2004; Mitchell, 2005).

Os cães domésticos possuem, em sua dentição decídua, 28 dentes (12 incisivos, quatro caninos e 12 pré-molares) e, na permanente, 42 elementos dentais (12 incisivos, quatro caninos, 16 pré-molares e 10 molares) (Roza, 2004). Independente do número de raízes, função, tamanho e forma, os dentes possuem subdivisões comuns a todos os tipos (Roza, 2004), e formam o órgão dental, quando em conjunto com algumas estruturas adjacentes (Gioso, 2003).

Para o perfeito entendimento da doença periodontal, são importantes maiores esclarecimentos a respeito de um conjunto de estruturas que constituem a articulação alvéolo-dentária, o periodonto (Picosse, 1987).

O periodonto (peri, em volta de; odonto, dente) (Lindhe e Karring, 1997) é o conjunto de tecidos moles e duros (Mitchell, 2005) que dão suporte (Dillon, 1984; Harvey e Emily, 1993; Domingues et al., 1999), fixando, aderindo, o dente no osso

alveolar (Lindhe e Karring, 1997; Roza, 2004) e protegem o mesmo (Roza, 2004). As estruturas que compõem o periodonto são: o ligamento periodontal, cemento, gengiva e o osso alveolar (Carranza, 1983; Lindhe e Karring, 1997; Wiggs e Lobprise, 1997). Há uma divisão dessas estruturas de acordo com suas funções, existindo assim o periodonto de sustentação formado pelo cemento, o ligamento periodontal, o osso alveolar, e a gengiva que além de participar da sustentação também compõe o periodonto de proteção (Roza, 2004).

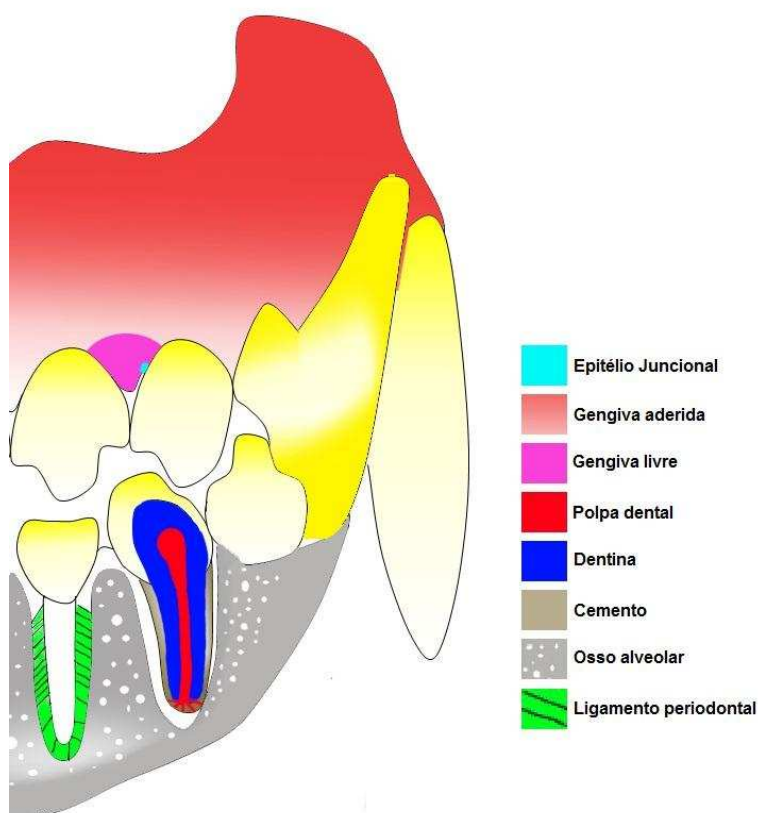


Figura 1 – Principais estruturas da anatomia do órgão dental em cães.

Fonte: Pieri et al. (2012a)

Gengiva

A gengiva é a parte da mucosa mastigatória que circunda a porção cervical do dente e recobre o processo alveolar (Lindhe e Karring, 1997). Tem como principal

função proteger as estruturas adjacentes ao dente, sendo então a primeira barreira de defesa contra a doença periodontal (Harvey e Emily, 1993). Podem ser diferenciadas duas partes: a gengiva livre e a aderida (Fig. 1) (Harvey e Emily, 1993; Lindhe e Karring, 1997; Johnston, 2001).

A gengiva livre pode ser rósea, ou pigmentada em algumas raças, com consistência firme e possui uma superfície opaca (Lindhe e Karring, 1997). A margem da gengiva livre é a borda da gengiva. Entre a gengiva livre e o dente, se forma uma cavidade (Mitchell, 2005) denominada sulco gengival, que, em condições normais no cão, varia em profundidade entre um e três milímetros (Harvey e Emily, 1993; Roza, 2004). O sulco é circundado por um epitélio aderido que secreta um fluido com células mediadoras de inflamação, imunoglobulinas e substâncias antibacterianas, importantes na proteção física e imunológica do epitélio juncional e tecidos profundos (Pope, 1993).

O epitélio juncional localiza-se no fundo do sulco, com células planas e alongadas (Hennet, 1995; Wiggs e Lobprise, 1997; Johnston, 2001), que aderem ao esmalte através de hemidesmossomos, promovendo a junção entre gengiva e o dente (Harvey e Emily, 1993; Johnston, 2001). O epitélio juncional termina na junção cimento-esmalte (Fig. 1) (Roza, 2004).

Em processos, como inflamação, hiperplasia ou a junção dos dois processos, o epitélio juncional pode regredir apicalmente, ou a gengiva aumentar, tornando o sulco gengival mais profundo (Harvey e Emily, 1993). Na hiperplasia gengival, o aprofundamento do sulco acontece sem perda de tecido periodontal, sendo denominado de pseudobolsa, porém quando já existe perda do tecido de sustentação e proteção do elemento dental, o sulco passa a ser chamado de bolsa periodontal, que pode ser de dois tipos: supra-óssea, quando o fundo da bolsa é

coronário ao osso alveolar de suporte, e intra-óssea quando o fundo encontra-se apicalmente localizado em relação ao osso alveolar adjacente. A profundidade da bolsa pode variar entre as regiões da boca, e até entre dentes vizinhos (Newman et al., 2004).

A gengiva aderida é a continuação da gengiva livre, que, resistente, é firmemente ligada ao osso subjacente, e estende-se até a junção mucogengival (Carranza, 1983).

Cimento

O cimento é um tecido duro e sem vascularização (Harvey et al., 1994; Hennes, 1995) que cobre a raiz do dente (Fig. 1) (Mitchell, 2005), composto por fibras colágenas embutidas em uma matriz orgânica, e possui em sua porção mineral, que é responsável por cerca de 65% do seu peso, cristais de hidroxiapatita (Lindhe e Karring, 1997). Possui, como principais funções, a inserção das fibras do ligamento periodontal à raiz do dente (Harvey e Emily, 1993; Lindhe e Karring, 1997; Roza, 2004), a contribuição para o processo de reparação da superfície radicular e a manutenção das fibras do ligamento periodontal (Picosse, 1987; Lindhe e Karring, 1997).

Existem dois tipos de cimento: primário (ou acelular) e secundário (ou celular). O primeiro é formado em associação com a formação da raiz e a erupção do dente (Lindhe e Karring, 1997), e ocupa os terços, coronal e médio da raiz dentária, sendo ocupado em sua maior parte pelas fibras de Sharpey, que são fibras colágenas do ligamento periodontal, que se prendem em uma extremidade ao cimento e por outra ao osso alveolar (Roza, 2004). O cimento secundário ou celular forma-se após a erupção do dente (Lindhe e Karring, 1997), localiza-se normalmente

na região periapical e é secretado pelos cementócitos ou cementoblastos, que são células que ficam aprisionadas à matriz orgânica do cimento, e que, por esse não possuir vascularização são nutridas a partir do ligamento periodontal.

Osso Alveolar

O osso alveolar compreende a maxila, o osso incisivo e mandíbula, que dá suporte aos elementos dentais em cavidades onde os mesmos ficam inseridos. Essas cavidades são denominadas de alvéolos (Picosse, 1987; Harvey e Emily, 1993; Roza, 2004).

Composto por 65% de sais minerais (Wiggs e Lobprise, 1997), esse osso possui consistência dura, e é muito denso e compacto, mas difere do cimento radicular, por possuir inervação e vascularização sanguínea e linfática (Lindhe e Karring, 1997).

O interior dos alvéolos é onde se localiza a placa cribiforme, que, radiograficamente, recebe a denominação de lâmina dura, caracterizada como uma linha radiopaca ao redor do alvéolo. Nessa placa se ligam as fibras do ligamento periodontal para fixação do dente, e é por onde passam os vasos, para a irrigação do ligamento e nutrição da matriz orgânica do cimento (Harvey e Emily, 1993; Roza, 2004).

O osso alveolar pode ser reabsorvido ou remodelado, de acordo com os estímulos que possa vir a sofrer (Harvey e Emily, 1993; Roza, 2004).

Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal é uma estrutura de tecido conjuntivo, que liga o dente ao seu alvéolo (Fig. 1), fixando-o (Lindhe e Karring, 1997; Figueiredo e Parra, 2002). Tem sua origem em células mesenquimais do saco dental (Picosse, 1987; Wiggs e Lobprise, 1997).

O ligamento periodontal contém nervos, grande vascularização, com vasos provindos da artéria maxilar no caso da maxila e da artéria alveolar inferior na mandíbula, e outras células, localizando-se entre o cemento radicular e a placa cribiforme. Sua altura, largura, qualidade e estado são determinantes para conferir ao elemento dental a sua mobilidade característica (Harvey e Emily, 1993; Lindhe e Karring, 1997; Roza, 2004).

Existem três categorias diferentes de fibras no ligamento periodontal: as fibras do grupamento gengival, as do grupamento transeptal e as do grupamento alvéolo-dental. As do primeiro grupamento são compostas pelas fibras dentogengivais (ligam o cemento à gengiva), as alveologengivais (ligam a placa cribiforme à gengiva) e as circulares (circundam o dente na altura da gengiva livre). As fibras do grupamento transeptal ligam o cemento supra-alveolar de dentes circunvizinhos. Por último as fibras do grupamento alvéolo-dental, são compostas pelas fibras: da crista alveolar (ligam crista alveolar ao cemento de forma oblíqua); horizontais, (ligam a crista ao cemento horizontalmente); oblíquas (ligam o cemento ao osso alveolar, possui maior numero de ligamentos); apicais (ligam o osso alveolar ao cemento em torno do ápice); e finalmente pelas inter-radulares (ficam entre raízes de dentes multirradulares) (Wiggs e Lobprise, 1997; Roza, 2004).

O ligamento periodontal desempenha várias funções no órgão dental, como funções física, formadora, sensorial, nutritiva e homeostática. A função física se

relaciona à sustentação do dente, absorção ao choque provocado pela força mastigatória e transmissão das forças oclusais ao osso (Figueiredo e Parra, 2002); já a função formadora é realizada através dos osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos; a reabsortiva através dos osteoclastos, cementoclastos e fibroclastos (Clarke, 2001); a função sensorial se refere à sua abundante inervação por fibras nervosas sensoriais capazes de transmitir sensações táteis, de pressão e dor pelas vias trigeminais; da mesma maneira a função nutritiva se dá pelos vasos sanguíneos, os quais fornecem nutrientes e outras substâncias requeridas pelos tecidos do ligamento, pelos cementócitos e pelos osteócitos mais superficiais do osso alveolar; finalmente a função homeostática ocorre pela sua capacidade de reabsorver e sintetizar a substância intercelular do tecido conjuntivo do ligamento, osso alveolar e cimento (Carranza, 1983; Figueiredo e Parra, 2002).

Em casos onde acontece avulsão completa do elemento dental, existe a possibilidade da reintegração do mesmo ao organismo, desde que restituído ao alvéolo de forma rápida, pois o ligamento periodontal tem a capacidade de aderir novamente ao cimento. Nestes casos deve-se proceder realizando o devido tratamento endodôntico, visto que a vascularização apical do dente fora rompida (Gioso, 2003).

2.1.2. Doença Periodontal

A doença periodontal tem sido descrita como uma infecção multifatorial, tendo como fatores etiológicos a placa bacteriana, a microbiota, o status imunológico, a quantidade de saliva, raça, idade, rotina de limpeza profilática e tipo de alimentação. Em humanos encontra-se definido o perfil microbiano da placa bacteriana, que é o agente etiológico primário, a qual é inicialmente constituída predominantemente por

bactérias Gram-positivas, aeróbias e sem motilidade no início da infecção, e por bactérias anaeróbias, Gram-negativas e com motilidade nos estágios mais avançados da infecção e infere-se que este perfil se repita nos cães (Harvey e Emily, 1993; Roza, 2004).

A doença periodontal é causada, tanto em humanos como em cães, pelo acúmulo de placa bacteriana nos dentes e gengiva (Harvey e Emily, 1993; Gioso e Carvalho, 2004), os produtos tóxicos do metabolismo destas bactérias (toxinas bacterianas) e a resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção (Mitchell, 2005), desencadeando então um processo inflamatório. Inicialmente este processo acomete apenas os tecidos gengivais, caracterizando a denominada gengivite, mas que, posteriormente, pode se agravar e evoluir para um processo de periodontite, que envolve alterações nos outros tecidos do periodonto e que pode acarretar perda óssea, de ligamento periodontal, em alguns casos de cemento, e até do elemento dental envolvido (Harvey e Emily, 1993).

Placa Bacteriana Dental

A placa bacteriana é um biofilme que coloniza toda a cavidade oral (Gioso, 2003), as faces dos dentes em sua estrutura amelar (esmalte) (Slee e O'Connor, 1983; Katsura et al., 2001) e os sulcos gengivais dos mesmos (Domingues et al., 1999). Essa placa associada à superfície do dente, denominada placa dental, (Wilderer e Charaklis, 1989; Lang et al., 1997), é apontada como a maior causadora do processo patológico (agente etiológico) (Tanzer et al., 1977; McPhee e Cowley, 1981). A placa tem como principais constituintes glicoproteínas salivares, sais minerais, bactérias orais, polissacarídeos extracelulares que aderem à superfície

dentária, células epiteliais descamadas, leucócitos, macrófagos e lipídeos (Harvey e Emily, 1993; Roza, 2004).

Inicialmente, uma película é formada sobre as superfícies dentais e outras regiões da boca, denominada película aderida, que é um filme orgânico derivado da saliva que, a princípio, não possui bactérias (Sans e Newman, 1997). À película adquirida inicia a formação de um biofilme, através da adesão das primeiras bactérias, que são em humanos na sua grande maioria cocos Gram-positivos aeróbios (Lang et al., 1997; Sans e Newman, 1997; Gioso, 2003), principalmente do gênero *Streptococcus*, que produzem exopolissacarídeo o que facilita a fixação destas bactérias às superfícies (Wiggs e Lobprise, 1997; Gioso, 2003; Roza, 2004), principalmente em locais onde ocorrem pequenas irregularidades, fissuras ou rugosidades (Sans e Newman, 1997). Alguns estudos buscaram identificar a microbiota da placa dental em cães e relataram baixa presença de *Streptococcus* utilizando meios de cultura não seletivos (Elliot et al., 2005; Riggio et al., 2011). Entretanto, como este gênero necessita de condições especiais para seu isolamento a partir de amostras com grande diversidade microbiana, pode ter tido seu crescimento inibido por outras bactérias (Takada et al., 2006). Assim continua desconhecida a importância dessas bactérias na composição da placa dental inicial em cães

A primeira camada de bactérias normalmente é monocelular (Fig. 2) e se apresenta irregularmente distribuída sobre a superfície dental. A partir da multiplicação microbiana, a camada passa a sair destas zonas de irregularidades na superfície do esmalte e, aumentando de volume, as placas isoladas passam a se unir, formando uma placa única (Fig. 2). Com o desenvolvimento da placa dental, apresenta-se uma nova fase, onde novas cepas microbianas, com menor

capacidade de aderência às estruturas dentais, aderem à placa já formada, caracterizando novas microcolônias e aumentando a biodiversidade da mesma (Sans e Newman, 1997). Este processo é chamado de organização da placa bacteriana, no qual as bactérias precisam de aproximadamente 24 a 48 horas para se organizarem a ponto de causarem a doença (Fig. 2) (Gioso, 2003). Nesta fase, o combate à placa bacteriana, com a sua simples desorganização, é capaz de estagnar e retroceder o processo (Slee e O'Connor, 1983).

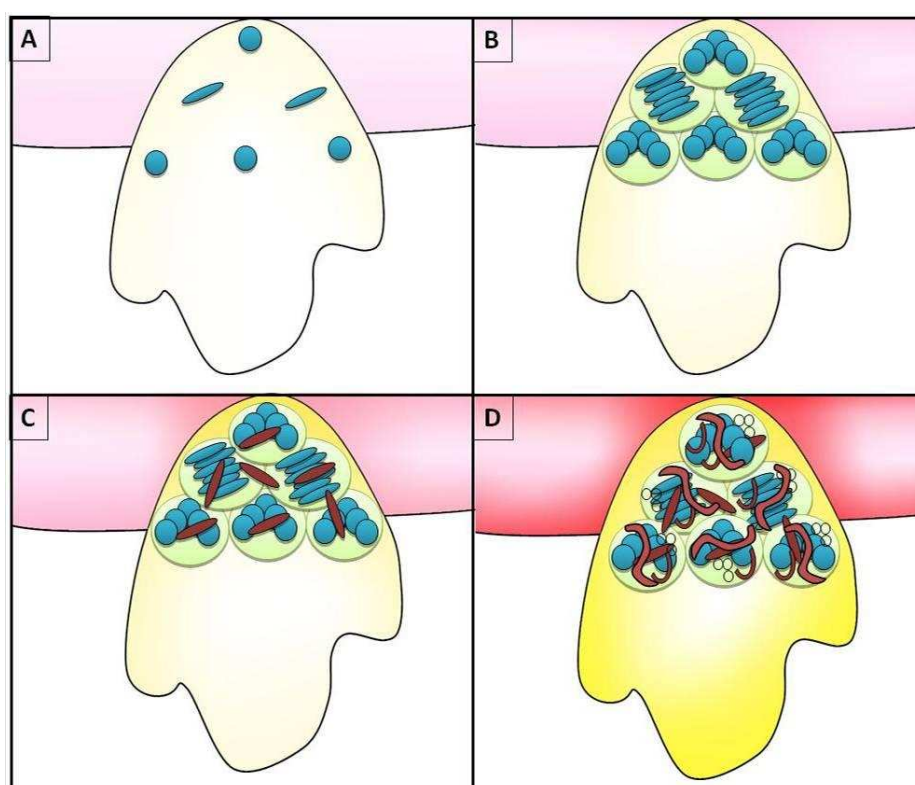


Figura 2 – organização da placa dental em cães: A) camada inicial monocelular de cocos e bastonetes Gram-positivos, distribuída irregularmente no dente; B) formação de placa única com crescimento microbiano de cocos e bastonetes Gram-positivos e produção de glicocálix; C) aumento da diversidade microbiana com adesão de bastonetes Gram-negativos; D) maturação do biofilme com presença de espiroquetas.

Fonte: Pieri et al. (2012a)

Não havendo interferência na formação da placa bacteriana, pode ocorrer um processo inflamatório, que marca o início da doença periodontal, que propicia

ambiente favorável à alteração de sua composição microbiana, passando a um biofilme com características mais agressivas, determinando fases posteriores da doença (Sans e Newman, 1997; Loesche e Grossman, 2001; Gioso, 2003).

De acordo com a localização, a placa pode ser classificada como supra ou subgengival. A placa supragengival corresponde principalmente aos agregados microbianos encontrados nas superfícies dentais (maior parte no terço gengival da coroa), contudo, pode se estender para o sulco gengival, onde ficam em contato imediato com a gengiva marginal. A placa subgengival corresponde aos agregados bacterianos encontrados totalmente dentro do sulco gengival ou bolsas periodontais (Harvey e Emily, 1993).

Bactérias da placa dental

As espécies de micro-organismos presentes na placa dental modificam-se de acordo com a evolução da doença. Na gengiva sadia, cocos Gram-positivos são cerca de dois terços das bactérias presentes, seguidos por bastonetes imóveis pequenos. As bactérias presentes são essencialmente Gram-positivas e praticamente não há representação considerável de tipos bacterianos mais virulentos. Já na fase de gengivite, os bastonetes Gram-positivos (imóveis) aumentam gradualmente, havendo também aumento na população de bactérias Gram-negativas. Este padrão de alteração se mantém até a fase de acometimento do periodonto (periodontite), quando as bactérias Gram-negativas e mais patogênicas se tornam a maioria, chegando as espiroquetas a representar quase a metade das bactérias presentes, enquanto as Gram-positivas são pouco representativas (Niezengard et al., 1997).

Em cães ainda permanecem não estabelecidas as principais bactérias envolvidas na formação e composição da placa dental inicial, porém estudos em humanos descrevem como principais bactérias dos gêneros *Streptococcus* (Harvey e Emily, 1993; Loesche e Grossman, 2001; Katsura et al., 2001; Drumond et al., 2004; Swerts et al., 2005), *Actinomyces* (Slee e O'Connor, 1983; Katsura et al., 2001) e *Lactobacilus* (Drumond et al., 2004; Roza, 2004). Esses micro-organismos colonizam inicialmente a película aderida do esmalte dental, passam a se multiplicar e agregar. A partir daí, receptores de superfície nos cocos e bastonetes Gram-positivos permitem aderência de bactérias Gram-negativas e, com o passar do tempo, passam a se apresentar com maior biodiversidade e potencial patogênico (Lang et al., 1997). Deste grupo, alguns estudos apresentam como os gêneros mais importantes em cães: *Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* (Armstrong e Hunt, 1972; Murray et al., 1992; Domingues et al., 1999; Katsura et al., 2001; Braga et al., 2005).

As bactérias envolvidas no processo patológico do periodonto, tanto em humanos como em cães, podem migrar a outras regiões do corpo pela corrente sanguínea causando bacteremia, e diversas doenças em outros locais como endocardite, nefrite (Harvey e Emily, 1993; Debowes, 1996; Gioso, 2003), hepatite (Debowes, 1996; Gioso, 2003) e miocardite (Harvey e Emily, 1993).

Fases da Doença Periodontal

Em cães, a progressão da doença periodontal pode ser dividida em fases com base na aparência clínica da gengiva, classificada de acordo com um índice que varia do grau zero, para gengiva sadia, ao quatro, quando há acometimento severo da mesma (Roza, 2004; Mitchell, 2005) e na perda de aderência do periodonto, que é medida com a inserção de uma sonda milimetrada no sulco gengival. Esta

mensuração representa o quanto o epitélio juncional já migrou em direção ao ápice do dente. O resultado em milímetros é a distância entre o fundo do sulco gengival ou bolsa periodontal até a junção amelocementária. O índice de perda de aderência é expresso pela razão entre a perda e a aderência normal total (Mitchell, 2005).

Considerado o estágio zero da doença periodonto sadio (Harvey e Emily, 1993), a gengiva apresenta-se com coloração uniforme, a placa bacteriana presente é imperceptível, e possui características pouco virulentas. Não há halitose (De Marco e Gioso, 1997). Com o aumento da placa bacteriana e sua alteração no que diz respeito à quantidade e especificidade de micro-organismos presentes, tal como sua virulência, começa a surgir então uma inflamação que marca o início da doença periodontal propriamente dita, que pode ser dividida nas fases: gengivite (estágio 1); periodontite inicial (estágio 2); periodontite moderada (estágio 3); e periodontite severa (estágio 4) (Harvey e Emily, 1993). A figura 3 apresenta os estágios de evolução da doença periodontal.

Gengivite

O estágio número um da doença periodontal (Gengivite) inicia-se com o surgimento de bactérias que, através de seus metabólitos, passam a provocar inflamação no tecido gengival, primeira defesa do órgão dental, porém sem causar danos às estruturas do periodonto de sustentação. A referida inflamação é semelhante à que ocorre em outros tecidos conjuntivos. Apresenta vasodilatação, marginalização leucocitária, migração celular, produção de prostaglandinas e enzimas destrutivas (Gioso, 2003), fazendo com que a gengiva apresente-se avermelhada (Fig. 4), edemaciada e dolorida, podendo apresentar halitose (De Marco e Gioso, 1997).

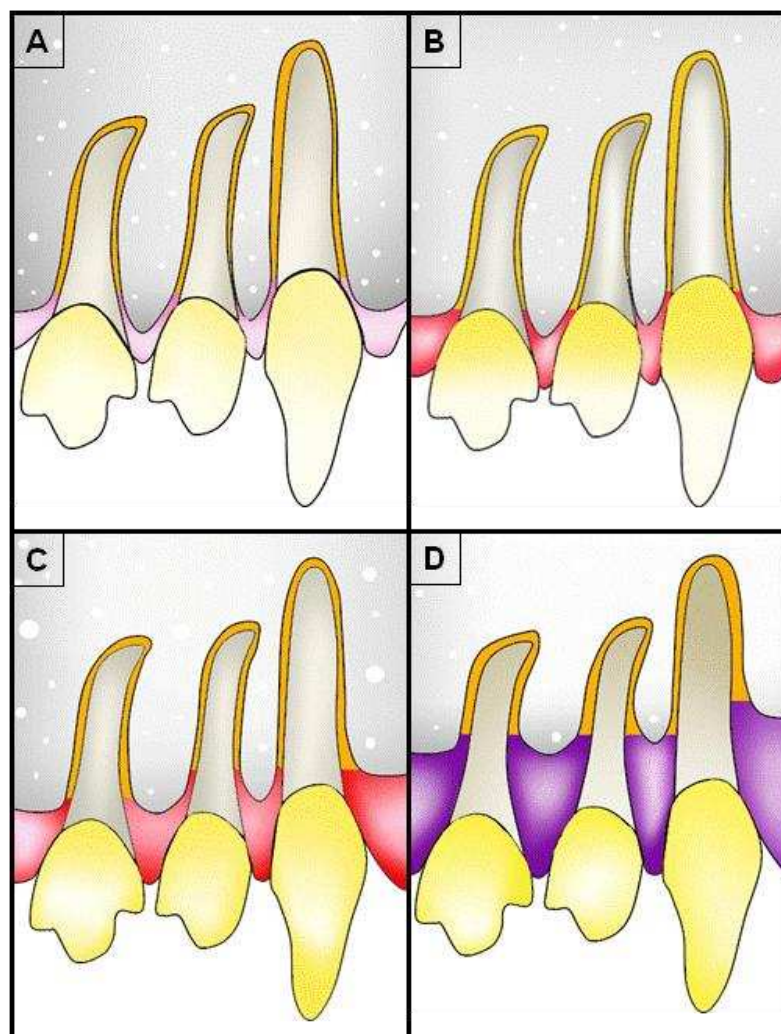


Figura 3 – Evolução da doença periodontal: A) Inicialmente com o periodonto sadio, a gengiva se apresenta rósea, sem edemaciação, o osso alveolar circunda por completo a raiz do dente; B) Na gengivite a gengiva se torna avermelhada, com leve edemaciação o osso alveolar continua ao redor de toda a raiz do dente; C) Com o desenvolvimento da periodontite leve visualiza-se a gengiva inflamada, avermelhada e há leve perda de sustentação do dente com a absorção do osso alveolar; D) Nas fases de periodontites moderada e severa há perda grave da sustentação do dente, com absorção severa do osso alveolar e a gengiva, muito inflamada pode se apresentar cianótica.

Fonte: Pieri et al. (2012a)

Nesta fase ainda há a possibilidade de involução da doença mediante o correto manejo da saúde oral do animal, com medidas como a escovação, promovendo a remoção do agente etiológico (placa bacteriana) (Gorrel e Rawlings, 1996; Gioso, 2003). Neste momento pode-se também utilizar anti-sépticos bucais em conjunto com a escovação, para obtermos aumento da eficiência da remoção

bacteriana (Clarke, 2001). A doença periodontal pode permanecer neste estado ou progredir para a perda de inserção da gengiva ao dente, ou seja, perda da aderência do epitélio juncional e conseqüentemente a formação das bolsas periodontais tornando então caracterizado o início do estágio patológico denominado periodontite inicial (Hennet, 2002).



Figura 4 – Cão da raça poodle de 2 anos apresentando gengivite; A) rubor da região marginal da gengiva;

Fonte: Pieri et al. (2012a)

Periodontite Inicial

A periodontite inicial é a consequência da ausência de tratamento da gengivite. É a fase que se inicia com a perda da inserção do epitélio juncional, sendo considerada a primeira fase irreversível da doença, e a partir deste ponto, passa a ser possível apenas estabilizá-la (De Marco e Gioso, 1997; Gioso, 2003; Roza, 2004). É a extensão do processo inflamatório em direção ao periodonto de

sustentação (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar), e leva à destruição progressiva dos tecidos relatados (Harvey e Emily, 1993; Hennessey, 2002).

A gengiva encontra-se com topografia ainda normal, podendo apresentar leve retração gengival, já muito inflamada e pode sangrar quando tocada. Já há leve inflamação no ligamento periodontal e perda óssea ainda pouco evidente (Harvey e Emily, 1993). Há halitose (De Marco e Gioso, 1997) e formação de cálculo dentário que é a mineralização da placa dental através de sais da saliva, tornando mais fácil a aderência de novos micro-organismos mais virulentos aumentando a severidade das lesões causadas aos tecidos periodontais. A quantidade de cálculo não deve ser utilizada para a classificação da doença, visto que não é o agente etiológico da doença, e sim a placa bacteriana. Grandes quantidades de cálculo não são indicativas da fase em que a doença se encontra, devendo-se então fixar o diagnóstico da doença na sondagem gengival para avaliar a perda de adesão do epitélio (Gioso, 2003; Roza, 2004).

Periodontites moderada e severa

As periodontites, moderada e severa são os estágios mais avançados da doença periodontal e diferem entre si apenas em relação ao grau das lesões (Fig. 5 e 6) (Harvey e Emily, 1993). Alguns autores não relatam a presença da periodontite moderada, considerando apenas a periodontite severa, após o processo inicial de agressão aos tecidos de sustentação do elemento dental (De Marco e Gioso, 1997). Nestas fases a microbiota da placa dental é diversa da inicial, possuindo apenas pequena quantidade de cocos Gram-positivos imóveis, e altas porcentagens de espiroquetas Gram-negativas com motilidade, praticamente ausentes em indivíduos saudáveis (Niezengard et al., 1997).

Essas fases apresentam inflamação severa com sangramento como resposta ao mínimo estímulo, grande acúmulo de placa bacteriana, mau hálito intenso (De Marco e Gioso, 1997), mobilidade dental leve (na moderada) ou grande (na severa) (Harvey e Emily, 1993), e, na maioria dos casos, há também retração gengival e grande acúmulo de cálculo dental.

As bactérias podem entrar na circulação sanguínea e causar doenças no coração, fígado, rins, articulações e outros órgãos (De Marco e Gioso, 1997; Gioso, 2003). No caso da periodontite moderada, chega a haver entre 25 e 50% de perda de periodonto de sustentação (que pode ser mascarada por hiperplasia gengival em alguns animais), trazendo a necessidade de tratamento e cuidados especiais para a manutenção do elemento dental no alvéolo. Na periodontite severa, existe perda de mais de 50% do tecido periodontal de sustentação, podendo haver exposição de furca em dentes multirradiculares e levando em muitos casos à esfoliação de dentes (Harvey e Emily, 1993).

A prevenção é considerada aspecto essencial para a manutenção dos dentes dos animais por toda sua vida, impossibilitando a formação do processo patológico periodontal (Lyon, 1991). São consideradas técnicas preventivas, através da eliminação da placa dental supra e sub-gengival, a escovação, produtos mastigáveis promotores de atrito e a utilização de substâncias antimicrobianas. Deve-se destacar a necessidade do acompanhamento da eficácia da técnica preventiva por um médico veterinário e que na maioria das vezes será necessária a intervenção do mesmo para a realização de raspagem dental visando eliminar a placa e o cálculo residuais em locais de difícil acesso nos dentes (Lima et al., 2004).



Figura 5 – Cão da raça poodle apresentando periodontite moderada. O círculo pontilhado vermelho apresenta exposição radicular com retração gengival.

Fonte: Pieri et al. (2012a)



Figura 6 – Cão da raça Poodle, 14 anos, com doença periodontal severa. Observe coroa dental com grande presença de cálculo (a), retração gengival visível (b) e gengiva hiperêmica(c).

Fonte: Pieri e Moreira (2010)

Prevenção da doença periodontal

A escovação dental que age por meio da remoção do biofilme dental através de atrito (Dupont, 1998), é considerada uma técnica com efeito superior para a redução no acúmulo de placa bacteriana sobre o elemento dental (Hennet, 2002). Preconiza-se a escovação dental dos animais, no mínimo, três vezes por semana devido ao tempo necessário para a organização da placa bacteriana (Niemic, 2008).

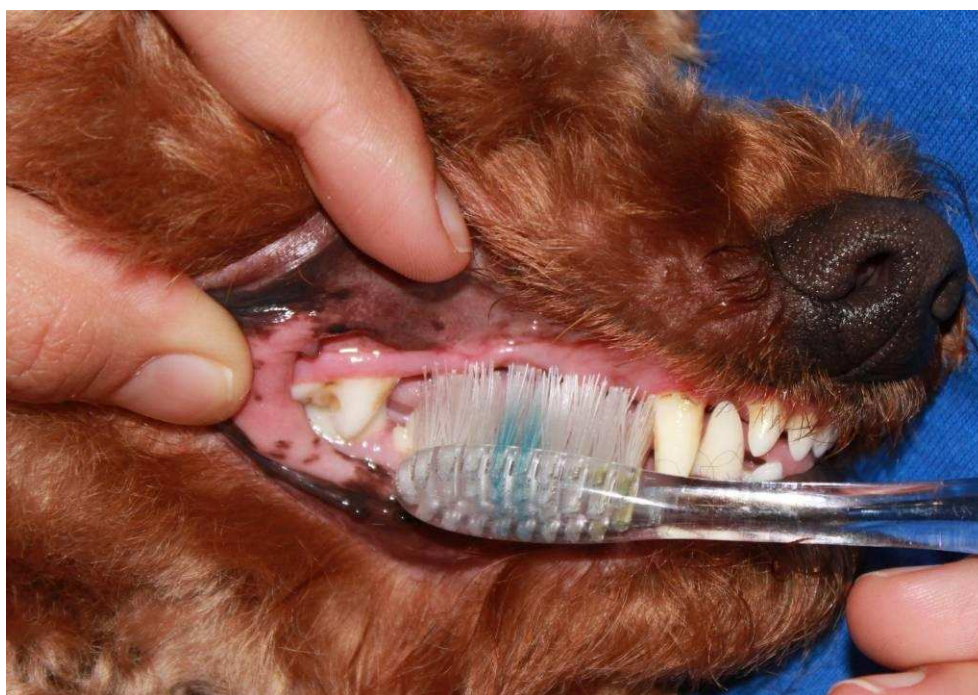


Figura 7 – Proprietário praticando escovação dental em cão da raça poodle.

Fonte: Pieri et al. (2012a)

A técnica de escovação deve ser empregada da maneira correta, pois seu uso inadequado pode aumentar a prevalência da doença periodontal, como ocorre em humanos (Jongenelis e Wiedemann, 1997). Uma das técnicas indicadas (Fig. 7) utiliza movimentos circulares sobre as faces dentais, com a escova inclinada a um ângulo de 45° da margem gengival (Niemic, 2008).

Alguns estudos têm sido conduzidos com a intenção de estabelecer novas terapias de combate ao acúmulo microbiano nas faces dentais, tanto para auxílio à

escovação quanto para utilização como agente preventivo de eleição contra a doença periodontal, nos casos da ineficiente prática da escovação, como em animais indóceis que não permitem as práticas mecânicas de manejo oral (Gioso e Carvalho, 2004; Pieri et al, 2010).

Várias formas de introdução destas terapias no manejo do animal têm sido testadas, entre elas a utilização de biscoitos e objetos mastigatórios para higiene oral (Gioso e Carvalho, 2004; Niemiec, 2008), aditivos para água de beber com ação inibitória no crescimento das bactérias (Clarke, 2006), soluções enxaguatórias bucais além de couros e biscoitos com adição de agentes antimicrobianos (Addy, 1997; Niemiec, 2008).

A aplicação tópica de um medicamento para o controle da doença é considerada a mais desejável, tendo em vista a menor incidência de efeitos colaterais quando comparada a outras vias de aplicação. Para a prevenção da doença periodontal, levando-se em consideração a maior prevalência da placa supragengival, sugere-se o uso de soluções de uso tópico oral, como os enxaguatórios bucais, suficientes para o combate às bactérias em questão, e com grande vantagem devido à sua grande facilidade de aplicação na maioria dos pacientes (Ciancio e Niezengard, 1997).

Entre as substâncias químicas que podem ser utilizados desta forma, para a redução no acúmulo de placa em faces dentais, têm sido bastante avaliadas as bisguanidas, amônias quaternárias e fenóis. Como substância que possui a maior eficácia comprovada na inibição da placa bacteriana oral, aparece a clorexidina (Hennet, 2002), que possui boa atividade anti-séptica contra todos os patógenos orais, e mais diretamente sobre os organismos da placa bacteriana (Harvey e Emily, 1993). Sua principal concentração de uso comercial é a solução alcoólica a 0,12%,

sendo também encontrada em soluções sem álcool e em forma de gel (Robinson, 1995).

Apesar da indicação de uso da clorexidina no combate à placa dental, essa substância apresenta uma série de efeitos desagradáveis quando utilizada em terapias prolongadas, como perda do paladar, pigmentação do esmalte dental, ardência e ulcerações na mucosa jugal (Zanini et al., 1995). Tais efeitos justificam a utilização desta substância apenas por poucos dias (Gioso, 2003), o que inviabiliza sua aplicação na prevenção da doença periodontal e exigiria uso prolongado do agente quimioterápico eleito para esta finalidade (Lascala e Moussalli, 1995).

O adoçante natural xilitol vem sendo utilizado em pacientes humanos em gomas de mascar, enxaguatórios bucais e cremes dentais com a finalidade de reduzir a placa bacteriana. Há também no mercado veterinário hoje, um produto a base de xilitol, que acrescido à água do animal, teria efeito redutor na formação da placa bacteriana oral (Dunayer e Gwaltney-Brant, 2006).

Recentemente, o óleo de girassol ozonizado foi testado, apresentando efeitos positivos na redução microbiana em pacientes humanos com doença periodontal (Fiorini et al., 2006) e o óleo de copaíba foi aplicado de forma tópica em cães, tendo sido obtidos resultados iguais aos da clorexidina na redução da população microbiana oral destes animais (Pieri et al., 2010). Adicionalmente alguns ensaios in vitro foram realizados para análise da atividade antimicrobiana do óleo de copaíba sobre bactérias formadoras de placa dental (Simões, 2004; Pieri, 2012b; Valdevite et al., 2007), e avaliação da inibição da aderência de *Streptococcus* sp. em capilares de vidro causada pelo mesmo fitoterápico (Pieri et al., 2010), obtendo em ambos os casos resultados positivos.

Desta forma, pesquisadores prosseguem em suas análises à procura de novos produtos para uso na prevenção da doença periodontal através da inibição da placa bacteriana, com possibilidade de uso contínuo (Pieri et al., 2010), buscando-se com especial interesse um quimioterápico que combine propriedades como atividade antimicrobiana, sem provocar resistência bacteriana, e inibição de aderência microbiana nas superfícies dentais, que sugeririam grande potencial para utilização em terapias na cavidade oral e como auxiliar na higiene oral (Sudo et al., 1976; Corner et al., 1988). Para utilização na terapêutica de animais domésticos, sugere-se a inclusão deste agente antimicrobiano e antiaderente em formulações contendo palatabilizantes à base de galinha, carne bovina, peixes, etc (De Marco e Gioso, 1997).

2.2. Copaíba

No Brasil, as árvores são conhecidas como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúva, copai (Cascon, 2004), copaibarana (Rodrigues, 1989), copaibo, copal, marimari e bálsamo dos jesuítas, e o óleo é chamado de óleo de copaíba ou bálsamo. Nos demais países da América Latina, denomina-se a árvore como “palo-de-bálsamo”, “aceite”, “cabima”, entre outros. A denominação da óleo-resina em inglês é “copaiba balsam” e do óleo volátil, “copaiba oil”. Em francês a árvore é denominada “copayer”, a óleo-resina, “baume de copayer” e o volátil, “huile de copayer” (Cascon, 2004).

Essa planta apresenta-se na classificação botânica, pertencente à família Leguminosae (Fabaceae), sub-família Caesalpinoideae, gênero *Copaifera*, (Lloyd, 1898; Brito et al., 2000; Maciel et al., 2002; Veiga Junior et al., 2005; Oliveira et al.,

2006) e, segundo o *Index Kewensis* (1996), possui 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas exclusivamente no Brasil (Veiga Junior e Pinto, 2002).



Figura 8 – Árvores de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) localizadas na cidade de Alfenas-MG, sob as coordenadas geográficas 21° 26' 33" sul e 46° 0' 55" oeste.

Fonte: Pieri et al. (2009)

Entre as espécies mais abundantes no Brasil e na América do Sul estão a *Copaifera officinalis* L. (Norte do Amazonas, Roraima, Colômbia e Venezuela), a *Copaifera guianensis* (Guianas), *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônia), *Copaifera confertiflora* (Piauí), *Copaifera langsdorffii* (Fig. 8) (Brasil, Argentina e Paraguai), *Copaifera caribaea* (Bahia) e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (Wood et al., 1940; Mors e Rizzini, 1966).

No continente Africano, na região do Congo, Camarões, Guiné e Angola, são descritas 19 espécies. Nessas regiões é comum a presença de citações de âmbar (óleo-resinas fossilizadas) provenientes de espécies de *Copaifera*. Há também uma

espécie descrita na ilha de Bornéu na Malásia, chamada *Copaífera palustris*, a qual se assemelha muito às espécies africanas (Veiga Junior e Pinto, 2002).

2.2.1. Histórico

A origem do nome parece ter vindo do tupi “cupa-yba” que significa “árvore de depósito” (Veiga Junior e Pinto, 2002; Ramos, 2006), ou que tem jazida, referindo-se ao óleo que possui em seu interior (Veiga Junior e Pinto, 2002).

O óleo de copaíba e suas propriedades medicinais eram muito conhecidos pelos índios latino-americanos (Salvador, 1975; Cardim, 1998; Veiga Junior e Pinto, 2002) que os utilizavam para curar feridas de guerreiros após batalhas (Maciel et al., 2002) e para passar no coto umbilical de recém nascidos (Maciel et al., 2002; Francisco, 2005). Supõe-se que tal conhecimento advém da observação do comportamento de alguns animais feridos, que se atritavam no tronco das árvores de copaíba, na busca da cicatrização de suas feridas (Lloyd, 1898; Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002; Francisco, 2005). Assim observou o holandês Gaspar Barléu (1974): “Vêem-se estas plantas esfoladas pelo atrito de animais, que procuram, instintivamente, este remédio da natureza”. Desta maneira desde os primeiros anos de descobrimento, com as observações de viajantes, freis jesuítas e historiadores, tal planta vem sendo indicada para diversos fins farmacológicos (Veiga Junior e Pinto, 2002).

A primeira vez que o óleo de copaíba foi citado, provavelmente ocorreu no ano de 1534, quando foi publicada em Estrasburgo, na França, uma carta enviada por Pethus Martins ao Papa Leão X, em que a droga usada pelos índios nativos era chamada copei (Lloyd, 1898). Na mesma época, foi publicada, pelo jesuíta José Acosta, “De Natura Novi Orbi”, traduzida para o francês em 1606 e que, em

português, foi denominada “História natural e moral dos índios”, que exacerbavam o bálsamo que, utilizado pelos índios, possuía excelente odor e muito maior efeito para curar feridas e outras enfermidades, prevendo inclusive o uso futuro da mesma pelos espanhóis (Acosta, 1792).

Em fins de 1560, o padre jesuíta José de Anchieta, em carta ao padre geral, comenta o poder cicatrizante potente do óleo de copaíba (Rodrigues, 1934). Em meados do século XVI, em obra publicada sob o título “História da Província de Santa Cruz, que vulgarmente chamamos de Brasil”, Pero de Magalhães Gândavo foi o primeiro a descrever a eficácia do óleo de copaíba como analgésico e cicatrizante (Gândavo, 2004). Isto resultou em um comentário mundial a respeito da copaíba, tornando o óleo, junto com o cravo, anil e tabaco, um dos quatro produtos mais exportados pelas províncias do Maranhão e Grão Pará (Alencastro, 2000; Gurgel, 2004). Em 1578, Jean Léry e posteriormente o padre Fernão Cardim, o padre Francisco Soares e Simão Travaços em 1584, 1594 e 1596, respectivamente, fizeram referência ao poder de cicatrização do óleo (Veiga Junior e Pinto, 2002). Em 1587, Gabriel Soares de Souza, na obra: “Tratado descritivo do Brasil”, registrou o uso do óleo pelos europeus e chamou nossos produtos naturais de “árvores e ervas da virtude” (Carrara Junior e Meirelles, 1996; Veiga Junior e Pinto, 2002).

A primeira descrição detalhada, explícita e ilustrada de florestas de copaíba, aconteceu no trabalho conjunto de MarcGrave e Piso em 1648, segundo Lloyd (1898), que descreveram aspectos morfológicos da planta que então recebeu como denominação o termo “copaíba”. Veiga Junior e Pinto (2002) citam que em 1760, Jacquin descreveu em detalhes a primeira *Copaifera*, a *Copaifera officinalis*, porém, como essa não tinha frutos presentes, usou o modelo de MarcGrave e Piso, erroneamente. Finalmente, dois anos mais tarde, Cad von Linnaeus descreveu de

forma correta a *Copaifera officinalis*, e então o gênero recebeu a descrição oficial de *Copaifera* L. (Lloyd, 1898).

Em 1818, o governo imperial do Brasil promulgou um ato regulando a extração das árvores que só poderiam ser derrubadas pelo governo e vendidas com 20% de lucro, para a produção de mastros vergas de navio, com o objetivo de minimizar a destruição das florestas de copaíba que estava começando a acontecer, uma vez que a extração era feita sem critério (Veiga Junior e Pinto, 2002). Em 1821, segundo Lloyd (1898), o francês Desfontaines descreveu duas novas espécies do gênero *Copaifera*: *C. guianensis* e *C. langsdorffii*. Segundo Lloyd (1898) quatro anos mais tarde, Hayne publicou uma monografia considerada confusa, que apresentava um total de oito espécies do gênero copaíba. O mesmo pesquisador, no ano seguinte, em estudo mais detalhado e expandido, apresentou 16 espécies de *Copaifera* com melhores descrições. As obras de Hayne serviram como ampla base para novos estudos, até que em 1870 foi compilada a obra “Flora Braziliensis” onde o gênero foi descrito por Benthams (1870). Segundo Veiga Junior e Pinto (2002) trabalhos mais recentes na descrição de outras novas espécies de *Copaifera* foram realizados por Harms e Ducke, que estudaram e descreveram espécies amazônicas, e cearenses em meados do século XX e o pesquisador Dwyer (1951) realizou descrição de espécies americanas durante o mesmo período.

2.2.2. Extração da óleo-resina

O óleo de Copaíba provém de canais esquizo-lizígeos (Cascon, 2004), que são secretores, localizados em todas as partes da árvore. São canais formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos). O caráter mais saliente desse aparelho está no lenho (Cascon, 2004), onde os canais longitudinais, distribuídos em faixas

concêntricas, nas camadas de crescimento demarcadas pelo parênquima terminal, reúnem-se com traçados irregulares em camadas lenhosas muitas vezes sem se comunicarem (Alencar, 1982). Há uma exudação das árvores de *Copaifera* (Maciel et al. 2002; Brito et al., 2005; Francisco, 2005; Lima et al., 2008) em condições patológicas (Brito et al., 2005), sendo então o óleo, segundo Alencar (1982), produto da desintoxicação do organismo vegetal, e que funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias.

A óleo-resina pode ser obtida através da perfuração no tronco da copaibeira (Lloyd, 1898; Veiga Junior e Pinto, 2002; Cascon, 2004; Francisco, 2005; Oliveira et al. 2005; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006; Rigamonte Azevedo et al., 2006) tendo sido utilizadas, desde os primórdios da exploração do produto, inúmeras formas de extração que provocavam danos às árvores ou até sua morte (Matta, 1913). Porém, essa técnica tem sido considerada a única prática não agressiva, e é hoje a mais utilizada, consistindo na perfuração do tronco, com um trado manual, em dois orifícios. O primeiro deve ser feito 1 metro acima da base da planta e o segundo de 1 a 1,5 metros acima do primeiro (Alencar, 1982; Veiga Junior e Pinto, 2002; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006; Rigamonte Azevedo et al., 2006). Insere-se então um cano de PVC de $\frac{3}{4}$ de polegada nos orifícios, por onde o óleo escoar, e reserva-se o óleo. Após a finalização da extração, veda-se o orifício para proteção contra fungos e cupins (Oliveira et al, 2006; Ramos, 2006; Rigamonte Azevedo et al., 2006) com o uso de argila (Ramos, 2006) ou tampa vedante de plástico (Oliveira et al., 2006) sendo ambas de fácil retirada para posteriores colheitas de óleo com maior facilidade de manipulação (Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006).

Na primeira extração, a quantidade de óleo-resina extraída varia bastante (Rigamonte Azevedo et al., 2004). A produção anual por árvore pode chegar,

segundo Grieve (1995) a 50 litros/árvore. A média de retirada de óleo, por vez para cada árvore, varia de 0,3 a 3 litros, dependendo da espécie e condições às quais está submetida, e algumas árvores podem chegar a fornecer até 30 litros em uma só retirada. Não há, porém, estudos definitivos sobre o tempo necessário para uma copaibeira recompor o óleo extraído. Sabe-se também que não é possível a extração de óleo de todas as árvores de copaíba. Entretanto, não existem estudos precisos da média de árvores efetivamente fornecedoras de óleo, o que pode variar de acordo com as características do solo, clima, espécie da *Copaifera* e época seca ou chuvosa (Rigamonte Azevedo et al., 2004).

2.2.3. Composição química da óleo-resina

Segundo Veiga Junior e Pinto (2002), o primeiro pesquisador a descrever uma fração do óleo de copaíba foi Schweitzer em 1829, que observou a cristalização de uma substância, a qual chamou de ácido copaívico, quando a óleo-resina permaneceu muito tempo em repouso. Ainda segundo este autor, a partir daí, outras substâncias foram sendo descritas, como o ácido oxycopaívico, por Fehling, em 1841, ácido metacopaívico, pelo pesquisador Strauss em 1865. Segundo Wood et al., (1940), Tschirch e Keto no início do século XX, descreveram, além das duas últimas substâncias citadas anteriormente, também o ácido paracopaívico e o homocopaívico. Destes compostos, apenas o ácido paracopaívico encontra classificação semelhante atualmente (Veiga Junior e Pinto, 2002).

O óleo de copaíba é uma substância natural (Cascon e Gilbert, 2000) composta de uma parte sólida (Rigamonte Azevedo et al., 2004), resinosa não volátil (Lloyd, 1898) formada por ácidos diterpênicos (Cascon e Gilbert, 2000; Rigamonte Azevedo et al., 2004; Veiga Junior et al. 2005; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006) r

diluída na outra parte, um óleo essencial (Cascon e Gilbert, 2000; Rigamonte Azevedo et al., 2004), composto de sesquiterpenos (Rigamonte Azevedo et al., 2004; Araújo Júnior et al., 2005; Veiga Junior et al., 2005; Oliveira, et al., 2006; Ramos, 2006). Estes podem ser divididos em sesquiterpenos oxigenados (álcoois) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Cascon e Gilbert, 2000) que, segundo Maciel et al. (2002), possuem maior atividade antiinflamatória quando comparados aos outros dois grupos presentes.

O óleo extraído pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes (Veiga Junior et al., 2005; Ramos, 2006) de acordo com variações de espécies, fatores biológicos como insetos e fungos (Ramos, 2006), ou fatores abióticos como solo, clima e pluviosidade (Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006), embora alguns estudos com o uso da *Copaifera duckei* não tenham apresentado diferença significativa na composição de óleos extraídos das mesmas árvores, em épocas sazonais diferentes (Cascon e Gilbert, 2000).

Apesar de poderem apresentar alterações nas quantidades e tipos de diterpenos e sesquiterpenos, apenas essas classes de substâncias podem estar presentes na composição do óleo puro (Veiga Junior et al., 2005).

Segundo alguns autores, existem descritos, como provenientes de algum óleo de copaíba, 72 sesquiterpenos e 27 ou 28 diterpenos, dependendo da fonte (Veiga Junior e Pinto, 2002; Rigamonte Azevedo et al., 2004; Pacheco et al., 2006), embora, segundo Veiga Junior e Pinto (2002), apenas cinco espécies de *Copaifera* tiveram sua composição descrita na literatura (*C. multijuga* Hayne, *C. langsdorffii*, *C. cearensis*, *C. officinalis* L. e *C. reticulada* Ducke), além de relatos referentes apenas ao gênero (Lima et al., 2008).

Os principais sesquiterpenos encontrados na óleo-resina da copaíba são β -cariophileno (Craveiro et al., 1981), a β -bisaboleno (Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006), α -humuleno, α e β selineno (Veiga Junior e Pinto, 2002; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006), α bisabolol, β elemeno (Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002), γ cadineno (Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002; Silva et al. 2006), α cadinol (Veiga Junior e Pinto, 2002). β -cariophileno é citado como tendo ação antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica (Veiga Junior e Pinto, 2002; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006), e β -bisaboleno, com propriedades descritas como antiinflamatórias e analgésicas (Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006) Segundo Silva et al. (2006), o óleo essencial extraído das folhas da copaibeira possui composição semelhante à da parte volátil sesquiterpênica da óleo-resina, com substâncias como β cariophileno, cadinol, Germacreno D e B e γ cadineno.

A parte resinosa da óleo-resina é composta pelos seguintes diterpenos: ácido hardwíckico, colavenol (Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002), ácido copaiférico ou copaífero (Veiga Junior e Pinto, 2002; Araújo Júnior et al., 2005), ácido copaiferólico, ácido calavênico, ácido patagônico, ácido copálico entre outros. O ácido copálico é usado como marcador do óleo da copaibeira, tendo em vista o fato de que foi o único encontrado em todos os óleos analisados por cromatografia gasosa para identificação da composição dos mesmos (Veiga Junior e Pinto, 2002).

2.2.4. Aplicações industriais do óleo de copaíba

O óleo de copaíba tem sido utilizado extensivamente, com diversas funções. Em alguns lugares do norte do Brasil, caboclos fazem uso do mesmo, como combustível na iluminação pública (Veiga Junior e Pinto, 2002).

Na indústria de perfumes, o óleo essencial de copaíba é muito utilizado (Veiga Junior e Pinto, 2002; Cascon, 2004; Pacheco et al., 2006; Ramos, 2006; Rigamonte Azevedo et al., 2006) como um excelente fixador de odores, combinando perfeitamente suas notas frescas e acres com essências portadoras de notas florais (Veiga Junior e Pinto, 2002).

Outros usos bastante difundidos do óleo da copaibeira são: secativo (Veiga Junior e Pinto, 2002) na indústria de vernizes (Cascon, 2004; Ramos, 2006; Rigamonte Azevedo et al., 2006), solventes em pinturas de porcelanas (Veiga Junior e Pinto, 2002), aditivo na confecção de borracha sintética (Tillotson, 1945), aditivos de alimentos com aprovação pelo FDA (Food and Drugs Administration) (Cascon, 2004), na indústria de cosméticos (Veiga Junior e Pinto, 2002; Cascon, 2004; Pacheco et al., 2006; Ramos, 2006) pelas suas propriedades emolientes, bactericidas e antiinflamatórias, na fabricação de cremes, sabonetes, xampus e amaciantes de cabelos (Veiga Junior e Pinto, 2002; Cascon, 2004).

A madeira extraída da copaibeira tem sido comercializada com bastante frequência (Veiga Junior e Pinto, 2002; Cascon, 2004; Freire et al., 2006) pelas suas propriedades desejáveis ao uso em marcenaria (Loureiro, 1979), carpintaria (Cascon, 2004), sendo também utilizadas pelas indústrias de construção civil e naval (Carvalho, 1994; Cascon, 2004), além da fabricação de carvão (Veiga Junior e Pinto, 2002).

Além de todas as aplicações descritas, o óleo de copaíba ainda apresenta uma gama enorme de utilizações na medicina popular, indígena e na indústria farmacêutica (Ming, 1995; Barata e Mendonça, 1997; Shanley et al., 1998; Leite et al., 2001; Rigamonte Azevedo et al., 2004).

2.2.5. Utilização medicinal do óleo de copaíba

A óleo-resina extraída da copaibeira recebe indicação da medicina tradicional, para inúmeras finalidades, das mais diferentes naturezas, e tem sido há vários anos matéria de vários estudos, visando comprová-las ou adaptá-las a novas terapias. O Food and Drug Administration (1972), órgão americano regulamentador de drogas e alimentos, aprovou o óleo de copaíba, após ser submetido a testes de sensibilização e irritação, com o uso de 25 voluntários, obtendo-se resultado negativo para ambos. As principais propriedades terapêuticas citadas são as atividades: antiinflamatória, cicatrizante, anti-séptica, antitumoral, antibacteriana, expectorante, diurética e analgésica (Goodman e Gilman, 1945; Rodrigues, 1989; Vieira, 1992; Robbers et al., 1996; Brito et al., 2000; Maciel et al., 2002; Bloise, 2003; Drumond et al., 2004; Cascon, 2004; Rigamonte Azevedo et al., 2004; Araújo Júnior et al., 2005; Brito et al., 2005; Francisco, 2005; Gonçalves et al., 2005; Veiga Junior et al., 2005; Freire et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Pacheco et al., 2006; Ramos, 2006; Silva et al., 2006).

Outras indicações também são descritas pela medicina popular e citadas na literatura, como antiviral, antidiarréico, antitetânico, antiblenorrágico, antileucorréico, cercaricida, antiulcerogênico, estimulante e afrodisíaco além de atividade no tratamento de reumatismo, psoríase, hemorragias, moléstias de pele, urticárias, pneumonia, eczema, paralisia, cefaléia, picada de cobra, sífilis e leishmaniose (Ribeiro, 1971; Brito et al. 2000; Maciel et al., 2002; Gurgel, 2004; Rigamonte Azevedo et al., 2004; Ramos, 2006; Pacheco et al., 2006). O extrato das folhas da copaibeira tem tido apontado como uma de suas funções, a atividade antioxidante, função não comprovada na óleo-resina (Rigamonte Azevedo et al., 2004; Araújo Júnior et al., 2005; Ramos, 2006).

Novas ações têm sido descobertas, como a de vasorelaxante, citotóxico e embriotóxico (Costa Lotufo et al., 2002), com o isolamento do diterpeno, ácido caurenóico, encontrado até hoje apenas na *Copaifera langsdorffii* (Veiga Junior et al., 2005) e que acumula também atividades antiinflamatória e protetora de colite induzida por ácido acético (Paiva et al., 2004; Veiga Junior et al., 2005). Além disso, pesquisas realizadas nas últimas duas décadas apontam o óleo de copaíba para o campo da odontologia, como substituto do eugenol em três formulações (Costa et al., 1996; Cascon, 2004; Ramos, 2006): A mistura com o óxido de zinco, na formulação do cimento endodôntico para obturações de canais radiculares, apresentou vantagens sobre a formulação usual, por produzir menor irritação (Ribeiro, 1989). Em composição obturadora provisória medicamentosa, em combinação com o hidróxido de cálcio, apresenta melhor capacidade antimicrobiana, em relação à formulação com o eugenol. A pasta feita com o óleo de copaíba apresentou pequeno potencial irritativo, sendo preferível ao médio potencial do eugenol, além de potencializar as propriedades do hidróxido de sódio, na compatibilidade tecidual, na indução da formação de tecido mineralizado; em cimento formado com a união de óleo de copaíba, hidróxido de sódio e óxido de zinco mostra maior eficiência nas infiltrações apicais em obturações de canais radiculares (Ramos, 2006).

Recentemente, testes têm também sido realizados em ensaios laboratoriais com a finalidade de comprovar ação antimicrobiana da copaíba sobre bactérias formadoras da placa dental (Pieri et al., 2010; Valdevite et al., 2007), tendo inclusive sido registrado um gel à base de copaíba, para esta finalidade (Simões, 2004). A utilização do óleo de copaíba sobre as bactérias formadoras de placa dental foi comprovada recentemente em estudo realizado em cães, tendo sido obtido ao final

do período experimental, redução significativa da formação da placa dental nos animais com a utilização de solução a base do fitofármaco (Pieri et al, 2010). Este mesmo trabalho também testou *in vitro* a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, sobre a bactéria *Streptococcus pyogenes*, causadora de inflamações de garganta, obtendo resultados positivos na inibição do crescimento desta bactéria.

Desta forma, identifica-se a necessidade da busca de novas alternativas para o combate da placa dental em cães, visando minimizar a prevalência da doença nesta espécie, e segundo a literatura disponível o óleo de copaíba é uma potencial fonte de compostos com atividade antimicrobiana para esta finalidade. Ainda deve-se ressaltar que os estudos com possíveis compostos provenientes deste óleo “*in vitro*” devem ser realizados com bactérias provenientes da placa dental inicial de cães, para que aliado a resultados de ensaio “*in vivo*”, atinja o objetivo de avaliar o potencial de uso em odontologia veterinária.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e seus constituintes, e avaliar o potencial de um bioproduto obtido na inibição de bactérias da placa dental de cães.

3.2. Objetivos específicos:

- Obter e identificar frações componentes do óleo de *Copaifera langsdorffii*;
- Formar uma bacterioteca com isolados obtidos da placa dental inicial de cães utilizando técnica para isolamento de *Streptococcus*.
- Avaliar o perfil de atividade antibacteriana do óleo de copaíba e suas frações sobre bactérias da placa dental de cães e outros patógenos;
- Avaliar as concentrações inibitórias mínimas do óleo de copaíba e de um composto selecionado da fração mais bioativa sobre os isolados oriundos da placa dental inicial de cães;
- Avaliar a presença de placa bacteriana em faces dentais de cães submetidos ao tratamento com um bioproduto formulado com um composto bioativo do óleo de copaíba.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos seguintes locais: Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC), Hospital Veterinário (HOV) e Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) todos pertencentes ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Também ocorreram atividades no Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA) do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas.

4.1. Extração do óleo de copaíba

A extração do óleo foi feita através da adaptação da técnica descrita por Rigamonte Azevedo et al. (2006) (Fig. 9), com a perfuração do tronco de uma copaibeira (*C. langsdorffii*), com o uso de uma moto-serra adaptada para furadeira e broca de 5/8 de polegada, em dois furos. O primeiro, um metro acima da base da árvore e o segundo, um metro acima deste. Foram inseridos então canos de PVC para facilitar o escoamento do óleo e posteriormente viabilizar um bom fechamento dos orifícios com tampas também de PVC, com a finalidade de evitar predação da árvore por parasitas e micro-organismos e facilitar posterior extração de óleo desta mesma árvore. A extração foi realizada na cidade de Alfenas-MG, sob as coordenadas geográficas 21° 26' 33" sul e 46° 0' 55" oeste.



Figura 9 – Árvore de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) perfurada e preparada para extração de óleo-resina. 1 e 2: furos, superior e inferior com cano de PVC introduzido, em orifício produzido na árvore, para facilitar o escoamento do óleo.

Fonte: Pieri et al. (2009)

4.2. Avaliação do potencial antibacteriano do óleo de *Copaifera langsdorffii*

Este teste foi realizado com a finalidade de avaliar se o óleo extraído apresentava atividade inibitória sobre bactérias de diversos gêneros, abrangendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Foram usados 27 isolados de *Escherichia coli* provenientes de leite mastítico, um isolado de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e de *Haemophilus parasuis* além de quatro cepas de referência de *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection, Manassas, Estados Unidos - ATCC-8095, ATCC-12598, ATCC-14458 e ATCC-29213), uma de *Escherichia coli* (ATCC- 11229), uma de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), uma de *Proteus mirabilis* (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Estados Unidos - CDC-305), uma de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-13883), uma de *Shigella flexneri* (National Collection

of Dairy Cultures, Karnal, India - NCDC-9989) e uma de *Citrobacter freundii* (ATCC-8090).

Adaptando a técnica de difusão em ágar cilindro em placas (Esmerino et al., 2004), Da cultura bacteriana ajustada à escala 0,5 de MacFarland, 100µL foram semeados com o auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri de 9cm descartáveis previamente preparadas com uma camada inferior de 10mL de ágar bacteriológico (Himedia, Mumbai, Índia), e outra superior com 20mL de ágar infusão cérebro e coração (ágar BHI, Himedia, Mumbai, Índia). Com o uso de ponteiras estéreis de 1 mL, foram feitos orifícios esféricos no ágar BHI distribuídos equidistantes nas placas. Os isolados de *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis* foram incubados em jarra de anaerobiose em atmosfera microaerofílica criada com o auxílio de Kit (Gas Pak Plus anaerobic system envelopes com catalizador de paládio, Becton, Dickinson and Company, Maryland, Estados Unidos).

A solução estoque foi formulada com o óleo de copaíba à concentração de 100µL/mL, pois este foi o limite de sua solubilização com estabilidade, e foi utilizado como solvente tween 80 a 100mg/mL. A solução foi inoculada em um orifício por placa contendo as bactérias teste. A inoculação obedeceu ao volume de 100µL das soluções por orifício. Foi utilizada também uma solução controle negativo com água destilada estéril e tween 80 a 100mg/mL.

Após preparadas, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h. A atividade antimicrobiana foi representada na forma de halos de inibição, que foram mensurados em milímetros para posterior comparação. Foram considerados resultados positivos quando havia halo de inibição de qualquer tamanho ao redor do orifício. Os testes foram feitos com duas repetições em triplicata.

4.3. Fracionamento do óleo de copaíba e identificação de suas frações

Foi seguida a metodologia adotada pelo laboratório Q-BiomA para o fracionamento e identificação. As frações foram obtidas através da cromatografia em coluna de troca iônica eluída com Diclorometano e Metanol, seguida de cromatografia em coluna aberta eluída com Hexano e Acetato de Etila (adsorvidas e dessorvidas), esterificadas com diazometano e analisadas através de Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução utilizando detecção em Ionização de Chama (CGAR-DIC) e Espectrometria de Massas (CGAR-EM).

Para isolamento de substâncias a partir do óleo resina de copaíba, iniciou-se com a metodologia de remoção da fração ácida a partir da amostra inicial de óleo resina por meio de cromatografia de troca iônica em coluna. Utilizou-se sílica para cromatografia 70-230 mesh, preparada com solução aquosa de KOH 10% na razão de 1g de amostra para 20g sílica (SiO_2). Para preparação, cada 100g de sílica foi homogeneizada com 100 mL de solução aquosa de KOH 10%. Após preparo, a sílica foi seca em estufa à 80°C por 24h. Uma alíquota (8 g) do óleo de copaíba foi submetida à coluna com SiO_2/KOH inicialmente eluída com diclorometano (1200 mL) para remoção da fração não-ácida, seguido de metanol (500 mL) para remoção da fração ácida. A fração metanólica foi então acidificada a diferentes valores de pH (8,0; 7,0; 5,0 e 3,0) com solução aquosa de Ácido Clorídrico 1N e extraída com diclorometano por lavagens sucessivas.

A fração inicial mais bioativa foi submetida ao refractionamento por meio de coluna cromatográfica (4 cm) em gel de sílica (70-230 mesh) numa proporção de 1g de amostra para 40g de sílica, eluída com hexano e acetato de etila em gradiente de eluição, sendo recolhidas 14 frações (250 mL).

As análises cromatográficas da fração final do óleo de copaíba foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo 5890 (Hewlett Packard, Palo Alto, Estados Unidos), coluna SE-54 com 20 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase, nas seguintes condições: gás de arraste Hidrogênio, com vazão de 2 mL/min e divisão de fluxo ("split") de 1:10. A temperatura inicial foi ajustada em 100° C, com taxa de aquecimento de 2° C/min até 160° C, quando a taxa de aquecimento passar a ser igual a 8°C/min até a temperatura final de 290° C, mantida constante por 15 min.

4.4. Isolamento e identificação de bactérias da placa dental de cães.

Obtenção de amostras

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir da placa supragengival de 10 cães Sem Raça Definida (SRD) com faixa etária entre um e dois anos, sem sinais clínicos de doença periodontal, ausência de bolsas periodontais, edemaciação ou rubor gengivais. Todos os animais eram provenientes dos canis experimentais do DVT/UFV ou atendidos no HOVET/UFV.

Isolamento

Conforme Yazaki e colaboradores (1999) com modificações, a placa dental supragengival dos 10 cães foi extraída com o auxílio de suabe estéril do 4° dente pré-molar superior, por fricção, e após coleta, os suabes foram transferidos para tubos com solução de Tris HCl pH 7,2 e pérolas de vidro, e submetidos à agitação em vórtex modelo MS1 minishaker (IKA Laboratory Equipment, Artur Nogueira, Brasil) a 2200RPM por dois minutos. Esta suspensão foi diluída em escala seriada decimal até 1:1000⁰ e todas foram inoculadas em superfície, em placa contendo

20ml de ágar Mitis Salivarius (Himedia, Mumbai, Índia), adicionado de telurito de potássio 1% com incubação a 37°C por 72 horas em microaerofilia, para apresentar condição ótima para isolamento de *Streptococcus* spp, utilizando Kit. Após incubação colônias com características morfológicas diferentes foram selecionadas e estriadas em ágar BHI com incubação, com incubação a 37°C por 24 horas para obtenção de culturas puras. Após purificação, uma colônia de cada cultura foi transferida para um tubo contendo caldo BHI (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 37°C, quando foi adicionado glicerol (20% v/v) e as culturas congeladas em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C.

Para ativação das culturas, uma alíquota de 10µL de cada estoque foi transferido em caldo BHI, com incubação a 37°C por 24 horas.

Triagem fenotípica dos isolados

Após a reativação em caldo BHI, os isolados foram submetidas às técnicas de Gram, testes da catalase, da coagulase, de tolerância à bile e salinidade de 6,5% de NaCl (Quinn et al., 2005).

Reação de cadeia de polimerase - PCR

A PCR foi realizada utilizando *primers* específicos para o fragmento de DNA cromossômico responsável pela transcrição de parte do gene que codifica para o RNA ribossômico 16S. Para a extração do DNA foram utilizados 1mL da cultura em fase exponencial de crescimento que foram submetidas à centrifugação (13,000×g por 2 min.) em microtubos, para obtenção do “pellet” de células, desprezando-se o sobrenadante em seguida. Estes foram então ressuspensos em 480µL de 20mM Tris-HCl, pH 8, 0,2mM EDTA, 1,2% Triton X-100, e incubadas com

120µL de solução de lisozima 10mg/mL e incubadas por uma hora a 37°C para a lise celular bacteriana. O DNA foi purificado utilizando o kit Genomic DNA Purification Kit™ GeneJET (Fermentas International Inc., Burlington, Canadá), seguindo as instruções do fabricante, eluido em água e armazenadas a -20°C para processamento.

Foi utilizado o par de *primers* 616V (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCA-3') e 630R (5'-AAGGAGGTGATCCARCC-3') (Sterr et al., 2009), ligando nas posições 11–26 e 1525–1541 do rDNA 16S respectivamente e produzindo um amplicon de aproximadamente 1530 bases. Os *primers* foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies Inc., Iowa, Estados Unidos. A PCR foi realizada utilizando o Kit PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos) de acordo com instruções do fabricante. O total de 50µL da reação consistiam de 25µL PCR Master Mix (2X), 1µL de primer *forward*, 1µL do primer *reverse*, ambos a concentração de 1pmol/µL, 2µL de DNA padrão (150ng) e 36µL água livre de Nuclease. O ciclo foi conduzido a 94°C por 4 min. Em seguida 35 ciclos a 94°C por 30 sec., 57°C por 1min. e 72°C por 2 min e então etapa de extensão final a 72°C por 4min. A reação foi realizada em termociclador de 96 orifícios de 0.2mL, com gradiente (Axygen Scientific, Union City, Estados Unidos). Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris-borato-EDTA) corado com 1µL de GelRed™ Nucleic Acid Stain (6X) (Biotium, Inc., Hayward, Estados Unidos) para cada 5µL de DNA e visualizado com radiação UV em transiluminador no sistema de captura L-PIX HE (Loccus Biotechnology, Cotia, SP, Brasil).

Seqüenciamento e análise de dados

Para identificação genotípica dos isolados, os fragmentos amplificados foram enviados à empresa MacroGen Incorporation (Seoul, Coréia do Sul) para sequenciamento, segundo Sanger et al. (1977).

As seqüências foram editadas com o auxílio do *software* SequencherTM versão 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Estados Unidos). Todos os isolados foram inicialmente identificados por busca em bases de dados com as seqüências do gene codificador da região 16S do rRNA obtidas e comparadas com outras arundadas do Genbank, utilizando o *software* Basic Local Alignment Software Search Tool (BLAST), disponível no National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Multiplos alinhamentos foram obtidos com o uso do *software* Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) e a partir destes uma árvore filogenética foi construída utilizando o *software* Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 4.0 Windows (www.megasoftware.net), pelo método UPGMA. Análise estatística foi realizada utilizando 2000 replicações bootstrap. Como grupo externo foi utilizada a seqüência do gene codificador da região 16S rRNA de *Sulfolobus* sp. (FJ489515.1). Diferenças de 3% ou maiores foram levadas em consideração para indicar que as seqüências eram provavelmente de espécies diferentes (Forney et al., 2004).

4.5. Avaliação de atividade antimicrobiana do óleo de copaíba e de suas frações sobre os isolados da placa dental de cães

O teste foi realizado, com 20 isolados da bacterioteca, adaptando a técnica de difusão em ágar cilindro em placas (Esmerino et al., 2004), conforme descrito

anteriormente no item 4.2. As soluções testes foram o óleo de copaíba íntegro, uma fração ácida e outra não ácida. Todas as soluções foram formuladas a 10%, solubilizadas com tween 80 a 100mg/mL. Uma solução controle negativo foi utilizada, sendo composta por água destilada estéril e tween 80 (100mg/mL). Os testes foram feitos com duas repetições em triplicata.

A comparação dos resultados da atividade das frações iniciais para seleção da mais bioativa para ser refracionada foi feita por análise de variância (ANOVA). Utilizou-se o teste paramétrico Tukey-Kramer, no pacote estatístico Prism 5 for Windows (Graphpad Software Inc, San Diego, Estados Unidos). Foram aceitos como significativos resultados com $P < 0,05$.

Após identificada a fração mais bioativa contra as bactérias alvo e o refracionamento da mesma, utilizou-se a mesma metodologia para a avaliação da sua capacidade de inibir 20 isolados bacterioteca. A partir desta fração final e conhecendo sua composição química foi selecionado um composto para realização de testes posteriores. Este foi um dos compostos majoritários da amostra.

4.6. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba e do composto selecionado sobre isolados da placa dental de cães.

Esta etapa foi realizada com 34 isolados, adaptando-se a técnica de macrodiluição em ágar descrita pelo CLSI (2008), realizou-se um teste em placas de microtitulação com as seguintes substâncias e concentrações: óleo de copaíba íntegro e o composto selecionado a concentrações de 10%, 5%, 2,5%, 1,25% e 0,625%; digluconato de clorexidina a concentrações de 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,03125% e 0,015625%;

Estas substâncias foram incorporadas ao meio de cultura ágar BHI, estéril, com o uso do solubilizante Tween 80 em volume 1:1 com as substâncias.

Cada placa de microtitulação foi preparada com 150µL de meio de cultura com princípio ativo a uma determinada concentração em metade dos orifícios e na outra metade 150 µL de controle negativo com o meio de cultura suplementado apenas com Tween 80 na mesma concentração do princípio ativo utilizado naquela placa.

A cada orifício, à exceção da última linha (deixada sem inóculo como controle de esterilidade dos meios), foi inoculado 3µL de inóculo ajustado a 3×10^7 UFC/mL e as placas foram incubadas por 24hs, a 37°C. Após a incubação, o crescimento microbiano foi evidenciado por 50µL de solução resazurina 0,01% como indicador colorimétrico de oxi-redução para caracterizar viabilidade celular (Catão et al., 2010). Onde houve multiplicação microbiana, o corante sofreu redução passando da cor azul para rosa

A menor concentração da substância teste que inibiu a proliferação microbiana foi considerada a CIM relacionada ao isolado alvo.

4.7. Avaliação da inibição da formação da placa dental em “in vivo”

Soluções

Foram utilizadas três soluções manipuladas: a primeira, controle negativo, contendo tween 80 como solubilizante, e aditivos de enxaguatórios bucais em concentrações não expostas pelo segredo de patente e água destilada; A segunda, controle positivo, foi manipulada com o controle negativo e digluconato de clorexidina para concentração final de 0,12%; e o bioproduto teste com o controle

negativo adicionado do composto selecionado a uma concentração determinada no ensaio de CIM, que segue como segredo de patente.

Animais

Foram utilizados três grupos de cães (um para cada tratamento), com 6 animais SRD cada, com idades variando entre dois e quatro anos, submetidos à limpeza dental com ultrassom odontológico (Profi II AS ceramic, Ribeirão Preto, Brasil) no dia zero experimental. Os animais foram mantidos em canis para dois animais cada, e foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. O experimento obedeceu a preceitos estabelecidos pela Comissão de ética no uso de animais da UFV, e foi aprovado pelo mesmo sob protocolo N° 18/2010.

Procedimento experimental

Adaptando a metodologia de Clarke (2001) e Pieri et al. (2010), o experimento teve duração de 15 dias. Os animais foram submetidos diariamente a duas aplicações, com intervalo de 12 horas, das respectivas soluções, em todas as faces dentais, com auxílio de gaze e pinça. Ao final do período experimental, a placa dental presente sobre as superfícies dentais vestibulares foi evidenciada utilizando-se uma coloração à base de fucsina básica a 0,5% para evidenciação bacteriana. Estas regiões foram fotografadas e as imagens foram submetidas à análise com o “software” ImageJ 1.44p (National Institute of Health, Maryland, Estados Unidos da América) para cálculo da porcentagem da área dental com presença de placa. Foram consideradas as áreas vestibulares dos dentes, canino e pré-molares superiores de cada cão. O resultado foi apresentado, em valores absolutos, entre 0

e 1, sendo 1 correspondente a 100% da área do dente com placa formada e 0 à ausência de placa nos dentes avaliados.

Os dados obtidos pelo processamento das fotografias foram submetidos à análise de variância (ANOVA) organizada em forma de um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foi utilizado para a análise estatística o teste quantitativo Tukey-Kramer, no pacote estatístico Prism 5 for Windows (Graphpad Software Inc, California, Estados Unidos). Foram aceitos como significativos resultados com $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do óleo de copaíba

Foram obtidos aproximadamente 600mL de óleo de copaíba os quais foram acondicionados em frascos âmbar para futura utilização no estudo à temperatura de 4°C. A técnica utilizada, diferente da técnica estabelecida com trado manual, foi de fácil e rápida execução, além de também não ter sido prejudicial à árvore e ter obtido quantidade de óleo dentro dos limites apontados na literatura (Rigamonte Azevedo et al., 2004). Após a extração, uma exsicata da árvore foi preparada e depositada no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa sob número de registro 34.894 (Fig. 10). Os orifícios foram mantidos com cano de PVC até o fim dos experimentos, e então selados com argila para proteção da árvore contra parasitas e predadores.



Figura 10 – Exsicata de *Copaifera langsdorffii* depositada no Herbário VIC, do departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

5.2. Avaliação do potencial antimicrobiano do óleo de *Copaifera langsdorffii*

A atividade do óleo de copaíba contra os diversos patógenos está apresentada na Figura 11. Não houve inibição bacteriana pelo controle negativo. Os resultados mostraram inibição pela solução de copaíba de três cepas de referência Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. flexneri*) além de oito isolados de *E. coli* oriundos de leite mastítico. Quanto aos micro-organismos Gram-positivos, todas as cepas de *S. aureus* foram inibidas pela solução teste. Os resultados estão apresentados por tamanho do halo de inibição o que pode representar o potencial antimicrobiano do óleo sobre cada isolado. Por exemplo, quando comparamos o halo de inibição da cepa de referência de *E. coli* com o isolado selvagem *E. coli*-isolado 8 (Fig. 11), percebe-se um halo duas vezes maior para o isolado selvagem. Segundo o CLSI (2008) o tamanho de halos em testes de disco-difusão com compostos antimicrobianos está inversamente proporcional à CIM sobre a bactéria testada, entretanto não existem na literatura métodos quantitativos da CIM do óleo de copaíba com este tipo de ensaio.

Em trabalho realizado por Santos et al. (2008) utilizando técnica de microdiluição em caldo na qual empregaram como maior concentração 0,1% do óleo, verificou-se resistência de Gram-negativas *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. mirabilis* (ATCC 25933), *E. coli* (ATCC 25922), *S. flexneri* (ATCC 12022) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) a todos os óleos de copaíba de oito espécies testados, inclusive de *C. langsdorffii*. Pacheco et al. (2006) utilizando essas mesmas condições testaram onze óleos de copaíba, sendo cinco *C. multijuga* Hayne e seis *Copaifera* sp., e não observaram inibição de *E. coli* (CCT0547) e *P. aeruginosa* (ATCC 13388). Em trabalho anterior, Packer e Luz (2007) também não identificaram inibição na multiplicação de *E. coli* (ATCC 8739) e de *P. aeruginosa* (ATCC 9027)

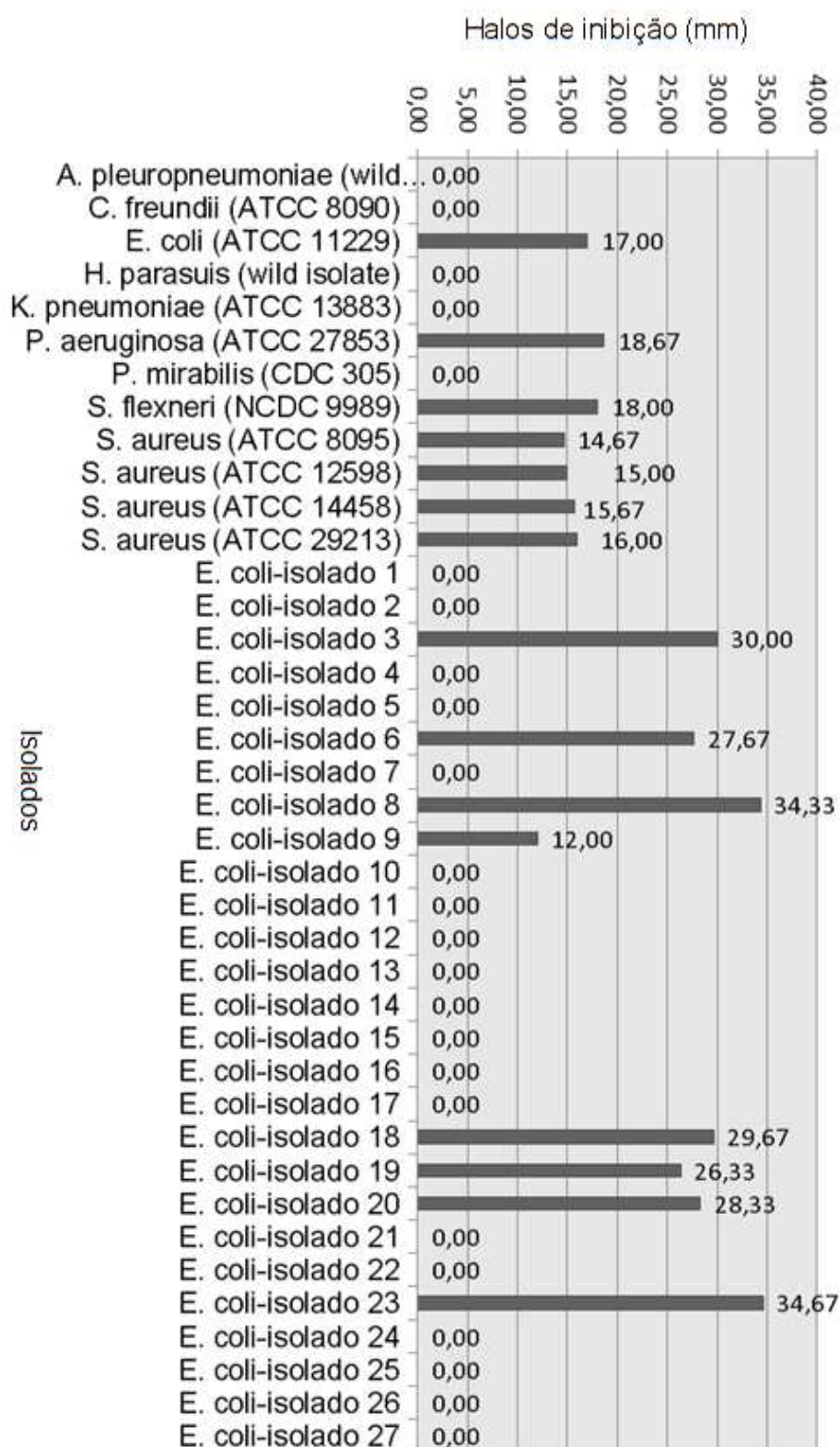


Figura 11 - Médias dos halos de inibição resultantes da ação de solução com óleo de copaíba a 10%(*Copaifera langsdorffii*) sobre diversos patógenos bacterianos.

utilizando técnica semelhante à utilizada neste trabalho. Mendonça e Onofre (2008) utilizaram a metodologia de disco-difusão e apresentaram dados com inibição pelo óleo de copaíba, de *C. multijuga* Hayne, sobre Gram-negativas, *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 9027). Os resultados apresentaram, conforme relatado na literatura, resistência de *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, entretanto apontaram inibição das cepas padrão de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. flexneri* além de oito isolados selvagens de *E. coli*. Este é o primeiro relato de inibição de cepa de *S. flexneri* por óleo de copaíba e de testes de atividade antimicrobiana do óleo contra *A. pleuropneumoniae*, *C. freundii* e *H. parasuis*, que foram resistentes ao óleo.

Sugere-se que estes resultados diferentes entre os trabalhos podem ser devido à composição diferente dos óleos, porque foram obtidos de diferentes espécies do gênero *Copaifera*, e também por outros fatores, como diferentes regiões de extração, tempo de coleta, clima e solos. Além disso, a utilização de concentrações variadas pode ter interferido nos resultados, como também a resistência intrínseca dos isolados. É importante ressaltar a diferença entre os perfis de sensibilidade dos isolados de *E. coli* de leite mastítico que apresentaram 70% dos isolados resistentes e 30% sensíveis com halos variando de 12mm a 34mm, demonstrando esta individualidade da resistência. A inibição de *E. coli* isoladas de leite mastítico por óleo de copaíba pode apontar-lo como um potencial agente para tratamento destas infecções, após mais pesquisas. No entanto, com relação à cepa de *P. aeruginosa* a hipótese de composições diferentes entre os óleos é mais provável, uma vez que a cepa testada por Santos et al. (2008) foi a mesma utilizada nesse estudo (ATCC 27853).

Variações na composição química do óleo são comuns entre espécies e até entre árvores de uma mesma espécie (Veiga Junior et al., 2005), apresentando

diferenças entre concentrações de substâncias ativas contra bactérias. No estudo de Santos et al. (2008) uma óleo-resina de *C. reticulata* extraído no estado do Acre teve atividade antimicrobiana a uma concentração 16 vezes menor do que um outro óleo da mesma espécie obtido no estado do Pará contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e 4 vezes menor contra *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os resultados do presente trabalho também apontaram a inibição de *S. aureus* (Fig. 11) e confirmaram pesquisas anteriores. Mendonça e Onofre (2009) mostraram inibição desta espécie pelo óleo de copaíba a uma concentração de 1,56%. Santos et al. (2008) também demonstraram a inibição de duas linhagens de *S. aureus* (ATCC 25923 e ATCC 33591), sendo uma resistente à meticilina, com todos os óleos testados, além da inibição de outras bactérias Gram-positivas como *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Inibição contra *S. aureus* (CCT 2740) e *B. subtilis* (CCT 2576) também foi identificada por Pacheco et al. (2006) em nove dos onze óleos de copaíba testados. Packer e Luz (2007) observaram ausência de inibição pelo óleo de copaíba contra *S. aureus*, (ATCC 6538), e estes autores sugerem que tenha ocorrido uma possível degradação dos compostos antimicrobianos presentes no óleo. Outra razão poderia ser a composição desse óleo específico, que poderia ter quantidades naturalmente menores de substâncias com atividade contra essa bactéria.

Santos et al. (2008) apontaram que o óleo de copaíba pode afetar a integridade da parede celular bacteriana, identificado por microscopia eletrônica de *S. aureus* desafiados e não desafiados com óleo de copaíba. Adicionalmente sugerimos que além desta ação do óleo sobre a parede celular, o óleo pode ainda ter outros compostos que atuem em diferentes alvos na célula bacteriana, levando em consideração a atividade inibitória do óleo testado em nosso estudo sobre

bactérias Gram-negativas, com diferenças na susceptibilidade entre as diferentes Gram-negativas e mesmo entre diferentes isolados da mesma espécie (Fig. 11). Isso poderia impedir ou dificultar o surgimento de bactérias resistentes, uma vez que o óleo poderia conter princípios diferentes agindo sinergicamente em várias estruturas e mecanismos de célula bacteriana, o que tem aumentado o interesse em pesquisas com fitoterápicos para inibição de bactérias.

Assim, o resultado obtido apontou o óleo de copaíba como uma possível fonte de compostos antimicrobianos, indicando-o para ser utilizado em etapas posteriores desta pesquisa.

5.3. Fracionamento do óleo de copaíba e identificação de suas frações

O óleo de copaíba foi dividido inicialmente em duas frações: uma denominada fração ácida, composta por ácidos diterpênicos (18,75% aproximadamente), sendo a parte resinosa do óleo; e a segunda, denominado fração não ácida, a qual era composta por sesquiterpenos (81,25% aproximadamente), representando a fração volátil do óleo. Assim, como citado pela literatura, o óleo apresentou-se exclusivamente formado por estes dois tipos de substâncias (Veiga Junior et al., 2005). Posteriormente, após o bioensaio para verificar a fração mais eficiente em inibir os isolados da placa dental canina, a fração não ácida foi refracionada. Foi obtida uma fração formada por hidrocarbonetos sesquiterpênicos, denominada fração Q-BIOMA 639, que foi submetida às técnicas de identificação de compostos e da qual foi selecionado um de seus compostos majoritários para os testes finais de atividade antimicrobiana e o ensaio “in vivo”. A identificação dos compostos da fração Q-BIOMA 639 apresentou um cromatograma com 56 analitos presentes, sendo três deles majoritários, representando aproximadamente 60% do total do

volume. Estes compostos foram nomeados aleatoriamente com códigos (LDBACUFV01 a LDBACUFV56), visto a necessidade de manutenção de sigilo para pedido de patente. Os principais sesquiterpenos encontrados usualmente na óleo-resina da *Copaifera* sp. são β -cariophileno (Craveiro et al., 1981), a β -bisaboleno (Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006), α -humuleno, α e β selineno (Veiga Junior e Pinto, 2002; Oliveira et al., 2006; Ramos, 2006), α bisabolol, β elemeno (Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002), γ cadineno (Maciel et al., 2002; Veiga Junior e Pinto, 2002; Silva et al. 2006).

5.4. Isolamento e identificação de bactérias da placa dental de cães

Um total de 183 isolados foi obtido a partir da placa dental de dez cães sem doença periodontal (Fig. 12). Os resultados da coloração de Gram, conforme o esperado apresentou 90% de cocos e bastonetes positivos representando 164 isolados. Desses 66% foram catalase negativos. Os 183 isolados tiveram os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados e sequenciados. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank (Tab. 1 e 2) e identificadas (não liberadas ao público) por comparação com sequências deste gene depositadas na mesma base de dados. Quatro isolados não foram identificados devido à similaridade com diversas bactérias de gêneros diferentes com o mesmo percentual de homologia. Dos outros 179 isolados sequenciados, 46 foram identificados em nível de espécie (Tab. 1), e para os outros 133, não se atingiu este nível de identificação (Tab. 2).

Apesar do direcionamento da técnica de isolamento para o gênero *Streptococcus* a diversidade bacteriana encontrada neste estudo apresentou um total de 14 gêneros pertencentes a três filos. Os gêneros *Aerococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* e

Streptococcus foram os representantes do filo Firmicutes (baixo-G+C, Gram-positivas), *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* foram os pertencentes ao filo Actinobacteria (alto G+C, Gram-positivas), e *Neisseria*, *Haemophilus*, *Pasteurella* os pertencentes ao filo Proteobacteria (Gram-negativas). Identificou-se também a presença de uma bactéria denominada como Bisgaard taxon 16 (Bisgaard e Mutters, 1986) em dois cães, totalizando seis isolados. Sugere-se que esta bactéria, ainda não denominada formalmente dentro da taxonomia bacteriana, faz parte da microbiota da cavidade oral de cães, visto que os poucos relatos são de amostras obtidas deste local e em nosso estudo ela foi obtida de dois cães (Bisgaard e Mutters, 1986; Elliot et al., 2005).

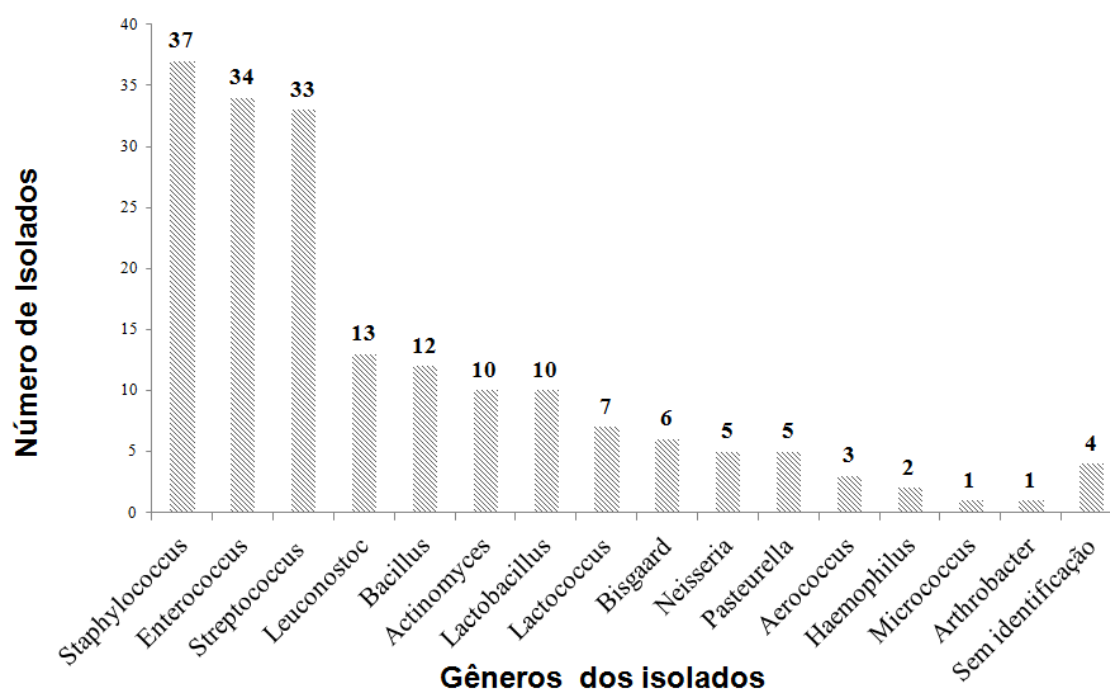


Figura 12 – Identificação em nível de gênero de 183 isolados da placa dental de cães baseada no sequenciamento de um fragmento do rDNA 16s.

Tabela 1. Isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães de um a dois anos, sem sinais clínicos de doença periodontal, identificados em nível de espécie por suas sequências de fragmento do rDNA 16S comparadas com as depositadas no GenBank

Número de Acesso no GenBank	Tamanho da sequência (pb)	Espécies por busca no BLAST	% Identidade
HQ717237	902	<i>Aerococcus viridans</i> (HQ425688.1)	99,0
HQ717240	1082	<i>Aerococcus viridans</i> (HQ425688.1)	99,0
HQ717294	1021	<i>Aerococcus viridans</i> (HQ425688.1)	98,7
HQ717310	712	<i>Bisgaard Taxon 16</i> (AY827857.1)	99,6
HQ717312	721	<i>Bisgaard Taxon 16</i> (AY827857.1)	99,4
HQ717313	656	<i>Bisgaard Taxon 16</i> (AY827857.1)	99,1
HQ717314	705	<i>Bisgaard Taxon 16</i> (AY827857.1)	99,6
HQ717347	705	<i>Bisgaard Taxon 16</i> (AY827857.1)	99,4
HQ717353	709	<i>Bisgaard Taxon 16</i> (AY827857.1)	99,3
HQ717181	1314	<i>Enterococcus faecalis</i> (GU471754.1)	99,0
HQ717350	857	<i>Enterococcus faecalis</i> (HM776210.1)	99,2
HQ717175	1312	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	99,1
HQ717176	1205	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	99,0
HQ717177	1311	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	99,3
HQ717179	1311	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	98,2
HQ717188	1314	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	98,8
HQ717189	1311	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	99,0
HQ717191	1312	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	99,2
HQ717210	1311	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ259726.1)	99,2
HQ717178	1085	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,2
HQ717180	604	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,0
HQ717183	926	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,1
HQ717184	929	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,9
HQ717185	913	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	100,0
HQ717186	1085	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,3
HQ717187	1260	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,0
HQ717190	654	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,1
HQ717193	1200	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,2
HQ717194	1093	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,0
HQ717203	1205	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,0
HQ717204	1142	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,0
HQ717205	560	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,1
HQ717209	901	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,0
HQ717217	702	<i>Enterococcus faecalis</i> (HQ293064.1)	99,0
HQ717311	1298	<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> (AY362907.1)	97,0
HQ717319	1299	<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> (AY362907.1)	97,0
HQ717335	708	<i>Lactococcus lactis</i> (AF515226.1)	99,3
HQ717344	707	<i>Lactococcus lactis</i> (AF515226.1)	99,3
HQ717297	900	<i>Lactococcus lactis</i> (DQ171715.1)	99,1

HQ717330	1004	<i>Lactococcus lactis</i> (HQ286592.1)	99,1
HQ717334	800	<i>Lactococcus lactis</i> (HQ286592.1)	99,0
HQ717343	800	<i>Lactococcus lactis</i> (HQ286592.1)	99,0
HQ717341	856	<i>Lactococcus lactis</i> (HQ647116.1)	99,4
HQ717326	1142	<i>Micrococcus luteus</i> (EU071594.1)	98,9
HQ717352	1080	<i>Streptococcus minor</i> (EU075081.1)	98,1
HQ717348	102	<i>Streptococcus minor</i> (EU075082.1)	98,3

Tabela 2. Isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães de um a dois anos, sem sinais clínicos de doença periodontal, identificados a nível de gênero por suas sequências de fragmento do rDNA 16S comparadas com as depositadas no GenBank

Número de acesso no GenBank	Tamanho da sequência (pb)	Gênero	% Identidade
HQ717195	1319	<i>Actinomyces</i> sp.	93,9
HQ717198	1314	<i>Actinomyces</i> sp.	95,0
HQ717199	1320	<i>Actinomyces</i> sp.	94,7
HQ717200	1198	<i>Actinomyces</i> sp.	94,0
HQ717201	738	<i>Actinomyces</i> sp.	94,9
HQ717202	1311	<i>Actinomyces</i> sp.	95,5
HQ717206	751	<i>Actinomyces</i> sp.	98,3
HQ717207	807	<i>Actinomyces</i> sp.	99,0
HQ717208	1047	<i>Actinomyces</i> sp.	99,3
HQ717328	1155	<i>Actinomyces</i> sp.	99,5
HQ717324	1318	<i>Arthrobacter</i> sp.	98,3
HQ717196	1312	<i>Bacillus</i> sp.	99,2
HQ717197	1313	<i>Bacillus</i> sp.	99,0
HQ717211	709	<i>Bacillus</i> sp.	99,4
HQ717212	863	<i>Bacillus</i> sp.	99,1
HQ717213	866	<i>Bacillus</i> sp.	99,1
HQ717214	1032	<i>Bacillus</i> sp.	98,3
HQ717216	803	<i>Bacillus</i> sp.	99,0
HQ717218	926	<i>Bacillus</i> sp.	99,3
HQ717219	1316	<i>Bacillus</i> sp.	97,1
HQ717220	1085	<i>Bacillus</i> sp.	98,2
HQ717258	1310	<i>Bacillus</i> sp.	98,9
HQ717289	1313	<i>Bacillus</i> sp.	97,6
HQ717215	908	<i>Enterococcus</i> sp.	99,1
HQ717227	1147	<i>Enterococcus</i> sp.	98,8
HQ717268	1262	<i>Enterococcus</i> sp.	97,1
HQ717269	1081	<i>Enterococcus</i> sp.	99,4
HQ717275	903	<i>Enterococcus</i> sp.	99,4
HQ717277	903	<i>Enterococcus</i> sp.	99,2
HQ717279	1086	<i>Enterococcus</i> sp.	99,4

HQ717280	1082	<i>Enterococcus</i> sp.	99,4
HQ717302	1310	<i>Enterococcus</i> sp.	98,7
HQ717263	1309	<i>Lactobacillus</i> sp.	98,3
HQ717264	1310	<i>Lactobacillus</i> sp.	98,9
HQ717265	1310	<i>Lactobacillus</i> sp.	98,3
HQ717266	1030	<i>Lactobacillus</i> sp.	98,9
HQ717267	1311	<i>Lactobacillus</i> sp.	97,6
HQ717270	1310	<i>Lactobacillus</i> sp.	97,9
HQ717271	1344	<i>Lactobacillus</i> sp.	96,7
HQ717274	1083	<i>Lactobacillus</i> sp.	99,2
HQ717276	1022	<i>Lactobacillus</i> sp.	99,3
HQ717278	1310	<i>Lactobacillus</i> sp.	98,5
HQ717296	1107	<i>Leuconostoc</i> sp.	98,8
HQ717307	1311	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,1
HQ717308	1116	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,1
HQ717329	1005	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,0
HQ717331	1060	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,2
HQ717332	955	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,1
HQ717333	802	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,0
HQ717336	910	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,0
HQ717337	916	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,6
HQ717338	955	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,2
HQ717339	955	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,0
HQ717340	903	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,3
HQ717342	807	<i>Leuconostoc</i> sp.	99,0
HQ717293	1311	<i>Neisseria</i> sp.	97,4
HQ717295	1303	<i>Neisseria</i> sp.	97,1
HQ717298	1300	<i>Neisseria</i> sp.	97,4
HQ717300	1300	<i>Neisseria</i> sp.	97,5
HQ717304	1087	<i>Neisseria</i> sp.	97,3
HQ717315	1300	<i>Pasteurella</i> sp.	99,4
HQ717317	1299	<i>Pasteurella</i> sp.	99,5
HQ717318	879	<i>Pasteurella</i> sp.	99,3
HQ717325	1308	<i>Pasteurella</i> sp.	99,5
HQ717327	1300	<i>Pasteurella</i> sp.	98,4
HQ717182	1316	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,4
HQ717192	113	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,1
HQ717221	908	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,7
HQ717222	1311	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,8
HQ717223	1312	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,4
HQ717224	900	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,6
HQ717231	931	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,0
HQ717232	1313	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,3
HQ717233	1080	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,1
HQ717234	1031	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,9
HQ717235	1087	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,3

HQ717236	1090	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,1
HQ717238	924	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,6
HQ717239	901	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,2
HQ717241	1093	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,0
HQ717246	966	<i>Staphylococcus</i> sp.	97,5
HQ717247	1022	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,1
HQ717259	1313	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,2
HQ717260	1313	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,6
HQ717261	1312	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,6
HQ717262	1148	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,1
HQ717283	1312	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,3
HQ717286	1312	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,5
HQ717287	1312	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,6
HQ717288	1085	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,4
HQ717291	1311	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,4
HQ717292	1202	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,2
HQ717306	1317	<i>Staphylococcus</i> sp.	96,7
HQ717309	1310	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,6
HQ717320	1081	<i>Staphylococcus</i> sp.	97,0
HQ717321	1203	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,1
HQ717322	1314	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,6
HQ717323	1314	<i>Staphylococcus</i> sp.	97,9
HQ717345	882	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,8
HQ717346	932	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,0
HQ717349	884	<i>Staphylococcus</i> sp.	98,2
HQ717351	912	<i>Staphylococcus</i> sp.	99,2
HQ717225	1311	<i>Streptococcus</i> sp.	98,5
HQ717226	1310	<i>Streptococcus</i> sp.	98,5
HQ717228	1311	<i>Streptococcus</i> sp.	98,4
HQ717229	1081	<i>Streptococcus</i> sp.	99,4
HQ717230	1310	<i>Streptococcus</i> sp.	98,4
HQ717242	1085	<i>Streptococcus</i> sp.	99,4
HQ717243	1306	<i>Streptococcus</i> sp.	98,2
HQ717244	1103	<i>Streptococcus</i> sp.	98,9
HQ717245	852	<i>Streptococcus</i> sp.	98,2
HQ717248	1026	<i>Streptococcus</i> sp.	99,0
HQ717249	1020	<i>Streptococcus</i> sp.	99,3
HQ717250	1310	<i>Streptococcus</i> sp.	98,3
HQ717251	1319	<i>Streptococcus</i> sp.	98,0
HQ717252	1050	<i>Streptococcus</i> sp.	98,5
HQ717253	912	<i>Streptococcus</i> sp.	99,2
HQ717254	1309	<i>Streptococcus</i> sp.	98,5
HQ717255	1309	<i>Streptococcus</i> sp.	98,7
HQ717256	1309	<i>Streptococcus</i> sp.	98,5
HQ717257	1309	<i>Streptococcus</i> sp.	98,4
HQ717272	720	<i>Streptococcus</i> sp.	98,1

HQ717273	1309	<i>Streptococcus</i> sp.	98,6
HQ717281	661	<i>Streptococcus</i> sp.	98,9
HQ717282	1309	<i>Streptococcus</i> sp.	99,2
HQ717284	1203	<i>Streptococcus</i> sp.	97,5
HQ717285	810	<i>Streptococcus</i> sp.	98,1
HQ717290	1204	<i>Streptococcus</i> sp.	97,0
HQ717299	904	<i>Streptococcus</i> sp.	99,1
HQ717301	964	<i>Streptococcus</i> sp.	99,1
HQ717303	1322	<i>Streptococcus</i> sp.	98,1
HQ717305	922	<i>Streptococcus</i> sp.	99,2
HQ717316	1310	<i>Streptococcus</i> sp.	97,0

O perfil bacteriano construído a partir dos isolados obtidos da placa dental de cães está apresentado em uma árvore filogenética (Fig.13). *Streptococcus* sp., 33/183 (18%), *Staphylococcus* sp. 37/183 (20,2%) e *Enterococcus* sp., 34/183 (18,6%) foram os gêneros predominantes na placa dental inicial (Fig. 12). Estes gêneros foram detectados em 9/10 (90%), 8/10 (80%) e 5/10 (50%) dos cães respectivamente, representando 105/183 (57,3%) do número total de isolados.

A técnica empregada neste estudo permitiu o isolamento de bactérias do gênero *Streptococcus*, entretanto outras bactérias também foram isoladas (Fig. 12), inclusive bastonetes e Gram-negativos, demonstrando a capacidade seletiva parcial do meio ágar Mitis Salivarius. Entre os principais gêneros isolados, *Streptococcus* foi apenas o terceiro mais representado, superado por *Staphylococcus* e *Enterococcus* (Fig. 12).

Elliot et al. (2005) identificaram os componentes da microbiota da placa dental subgingival de dez cães, tendo obtido apenas 1% de *Streptococcus* sp. com relação ao total. Além da natureza da placa ter sido diferente, eles ainda utilizaram meios de cultura diferentes do utilizado neste estudo. Riggio et al (2011), utilizando meios de cultura não seletivos, identificaram em um universo de 32 isolados obtidos de cães sem gengivite, apenas um isolado de *Streptococcus minor*, o qual também

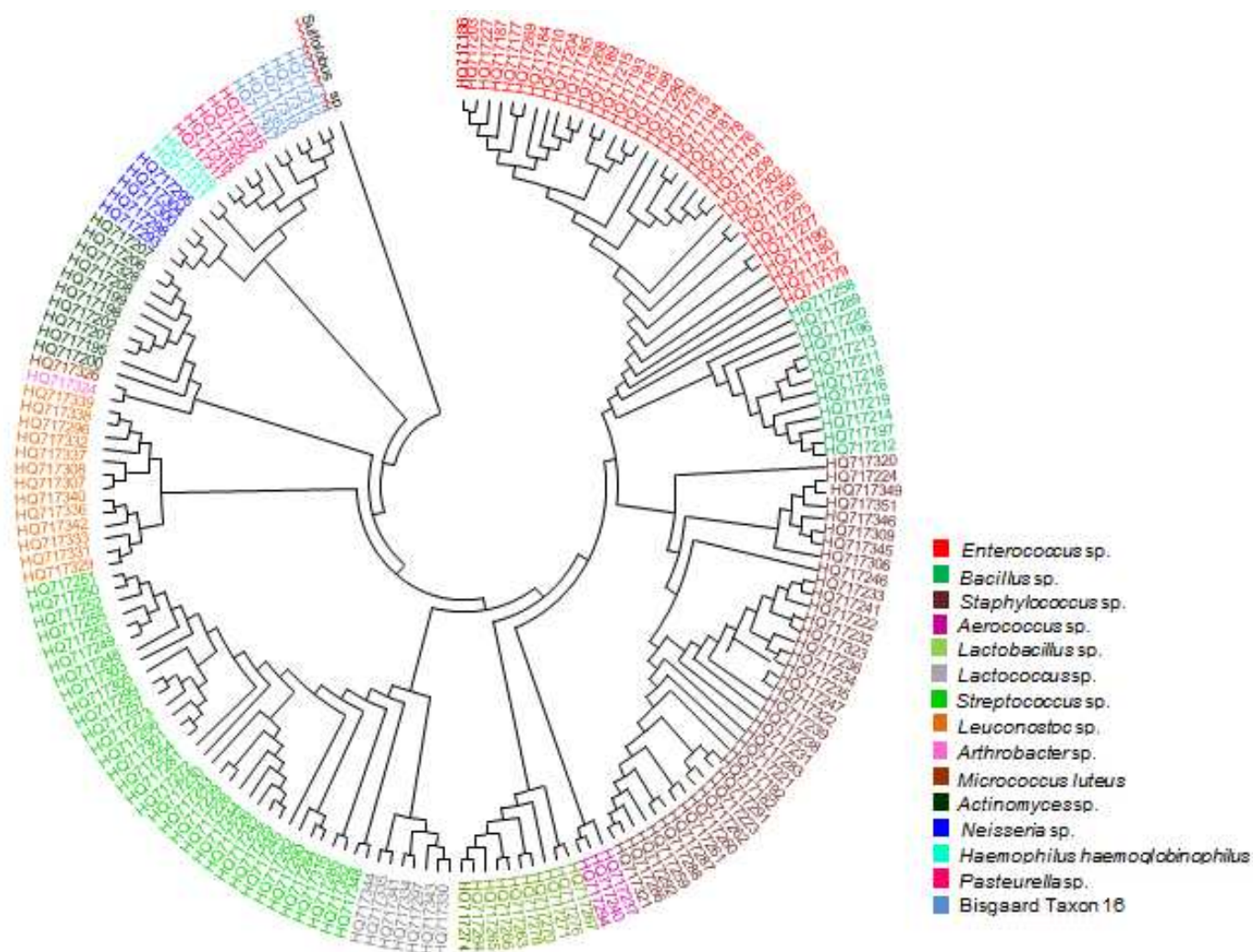


Figura 13 – Agrupamento genético de 183 isolados obtidos da placa dental inicial de 10 cães entre um e dois anos sem sinais clínicos de doença periodontal. Como grupo externo foi utilizada uma sequência de *Sulfolobus* sp depositada no GenBank.

foi identificado no presente trabalho e em outras pesquisas utilizando a placa dental de cães e gatos (Elliot et al., 2005; Vancanneyt et al., 2004; Iijima, 2009). Takada et al. (2006) utilizando o ágar mitis salivarius com suplementos conseguiram o isolamento de *Streptococcus*, obtendo taxa de recuperação de 21,2% do total dos isolados. Estes citaram ainda que o meio eliminou 89,7% do total de bactérias que cresceram em meio BHI sangue a partir da mesma amostra. As principais espécies identificadas por eles foram *S. sanguis* e *S. mitis*, evidenciando o favorecimento para crescimento de *Streptococcus* conferido pelo meio. É importante ressaltar que em nenhum destes trabalhos foi possível o isolamento de *S. mutans*, bactéria considerada a mais importante na formação da placa dental de humanos, o que corrobora o citado por Dent e Marsh (1981) de que existe uma relação entre a presença de *Streptococcus mutans* e dietas ricas em sacarose, o que não é o esperado em rações de cães. Takada et al. (2006), sugerem ainda que o diferente pH da cavidade oral de cães com relação a dos humanos possa ser um outro fator responsável pela ausência da bactéria nestes animais.

Estudos dos componentes da microbiota da placa supra-gengival de cães beagle avaliadas por hibridização DNA-DNA, resultaram na identificação de diversas espécies de *Streptococcus*, incluindo algumas relacionadas com a microbiota da placa dental em humanos tais como *S. mitis*, *S. constellatus*, *S. oralis* e *S. sanguis* (Rober et al., 2009). Estas espécies não foram isoladas neste trabalho, pois as sequências de *Streptococcus* sp. obtidas não apresentaram similaridade com as destas espécies depositadas no GenBank.

A dificuldade em identificar a bactéria em nível de espécies, especialmente para os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, pode ter ocorrido pelo fato de que espécies estreitamente relacionadas podem ter seqüências do gene

16S rDNA quase idênticas o que pode ser evidenciado quando se analisam algumas espécies de estreptococos do grupo D que compartilham mais de 99% de similaridade na sequência do 16S rDNA similaridade de sequência (Fox et al., 1992).

Bactérias dos gêneros *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Streptococcus* e *Veillonella* foram isoladas na maioria das amostras analisadas por Dent e Marsh (1981), sugerindo que os representantes desses gêneros podem ser considerados como membros característicos ou autóctones da comunidade microbiana da placa dental em animais. O presente trabalho corrobora este estudo, verificando a presença dos gêneros *Streptococcus*, *Neisseria* e *Actinomyces*, como apresentado na figura 12. Quanto aos gêneros, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Veillonella* já era esperado que não fossem isolados devido à metodologia aplicada e as necessidades nutricionais e de anaerobiose estritas destas bactérias.

A análise das sequências e revisão de literatura indicaram que 59/183 (32,2%) das bactérias isoladas de cães neste estudo não são normalmente encontrados na cavidade oral humana (Socransky e Haffajee, 2005; Paster, et al., 2001). Apenas 05/15 (33,3%) dos grupos identificados (14 gêneros e a Bisgaard taxon 16), *Actinomyces*, *Neisseria*, *Streptococcus* e *Haemophilus* e *Lactobacillus*, são considerados membros da placa supragengival dental de humanos (Paster et al., 2001; Socransky e Haffajee, 1992; Sansone et al., 1993; Liljemark e Bloomquist, 1981; Hasty et al., 1992; London e Allen, 1990).

5.5. Avaliação de atividade antimicrobiana do óleo de copaíba e de suas frações sobre os isolados da placa dental de cães

Os halos de inibição do óleo de copaíba íntegro e das frações ácida e não ácida, sobre os isolados da placa dental de cães estão apresentados na figura 14. O controle negativo com tween 80 não apresentou inibição sobre nenhum isolado. Assim como alguns estudos de atividade antimicrobiana que utilizaram o óleo de copaíba contra cepas de referência oriundas da placa dental de humanos, (Pieri et al., 2012b; Mussi, 2011; Souza et al., 2011; Pieri et al., 2010; Drumond et al., 2004; Gurgel, 2004; Simões, 2004), este estudo mostrou atividade antimicrobiana “in vitro” pela solução de copaíba sobre bactérias da placa dental de cães (Fig. 14), abrangendo um isolado dos gêneros *Aerococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp. e *Pasteurella* sp., dois isolados de *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* sp., três de *Staphylococcus* sp. e cinco de *Streptococcus* sp. Um isolado de *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Leuconostoc* sp. foram resistentes (Fig 15). Os halos de inibição apresentaram-se semelhantes para a maioria dos isolados inibidos, entre 10mm e 15mm (Fig 15). Entretanto dois isolados, um de *Lactococcus* sp. e um de *Leuconostoc* sp., apresentaram mais sensíveis, com halos maiores (Fig 15). Para o isolado de *Lactococcus* sp., os halos foram de 16mm e 20mm para o óleo íntegro e a fração não ácida respectivamente. Já para o isolado de *Leuconostoc* sp., os halos foram de 16mm para a fração ácida e de 30mm para as demais soluções testadas.

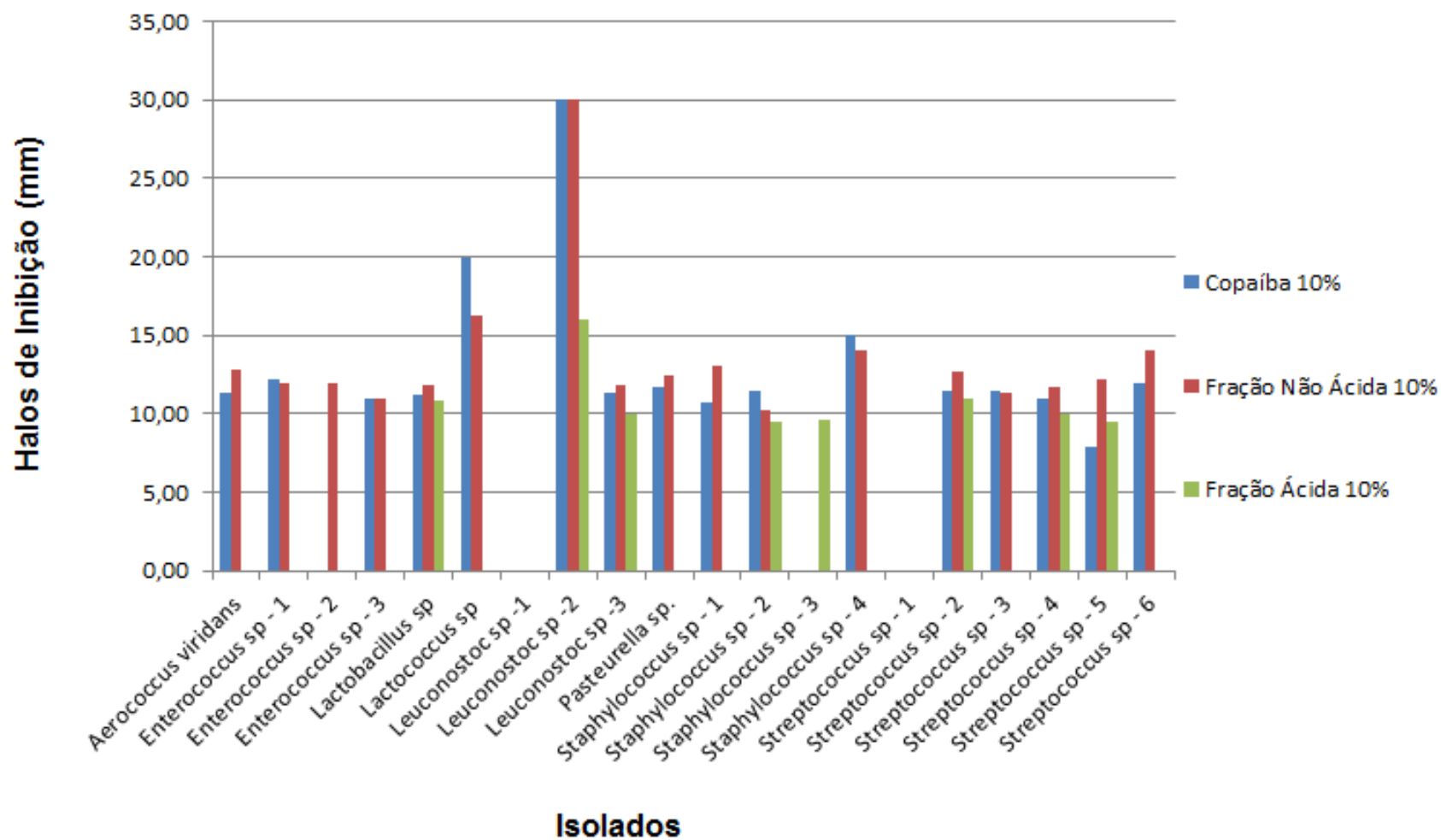


Figura 14 - Atividade antimicrobiana dos diferentes tratamentos contra diversos isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães

A fração não ácida apresentou resultados superiores à fração ácida ($P < 0,05$) e, desta maneira, foi indicada para o novo fracionamento e redução do número de componentes da amostra. Os resultados desta fração foram considerados estatisticamente iguais ($P > 0,05$) ao do óleo de copaíba integro quanto ao tamanho dos halos de inibição, porém além de inibir todos os isolados que o óleo íntegro inibiu ainda teve atividade contra o isolado de *Enterococcus* que foi resistente ao óleo (Fig. 14). Os outros três isolados que foram resistentes ao óleo também não foram inibidos pela fração não ácida. Já a fração ácida só foi capaz de inibir oito isolados (Fig. 14), com halos inferiores comparada a não ácida e ao óleo íntegro ($P < 0,05$), sendo três *Streptococcus* sp., um *Staphylococcus* sp., um *Lactobacillus* sp. e dois *Leuconostoc* sp. No estudo de Souza et al (2011) foram testados sete diterpenos e quatro sesquiterpenos contra várias cepas padrão da placa dental de humanos, obtendo inibição mais eficiente por três diterpenos, com especial menção ao ácido copálico que teve valores de MIC entre 2 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Nos resultados do presente trabalho houve inibição de apenas oito isolados pela fração diterpênica, sugerindo um diferente perfil de susceptibilidade entre as bactérias dentais de cães e humanos.

A última fração obtida, denominada QBIOMA 639, a partir da não ácida, foi testada quanto ao seu potencial antimicrobiano contra 20 isolados da placa dental de cães escolhidos aleatoriamente dentro de um grupo de isolados composto pelos três principais gêneros identificados (oito *Streptococcus* sp., seis *Staphylococcus* sp. e seis *Enterococcus* sp.) e os resultados obtidos sobre as bactérias do teste encontram-se na figura 15. Foram resistentes apenas um

isolado de *Enterococcus* sp., e um de *Streptococcus* sp. Todas as outras bactérias foram consideradas sensíveis com a metodologia usada.

Dos três compostos majoritários identificados na fração QBIOMA 639 um foi selecionado para os testes seguintes e foi denominado LDBACUFV01.

5.6. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba e do composto selecionado sobre isolados da placa dental de cães

Os resultados do ensaio de CIM, de óleo de copaíba, do composto LDBACUFV01 e de clorexidina sobre estes isolados se encontram apresentados na Tabela 3 e foram apresentados sob a forma de modificação da coloração da Resazurina como representado na figura 16. Foram analisados 33 destes isolados para o composto LDBACUFV01 e clorexidina e 32 para o óleo de copaíba, devido à ausência de crescimento de alguns isolados.

Os isolados testados apresentaram sensibilidade a todas as concentrações testadas de clorexidina (2% a 0,015625%), controle positivo. (Tab. 3) Com relação ao óleo de copaíba íntegro a sensibilidade dos isolados bacterianos foi de 75%, dos quais 62% foram sensíveis a concentrações menores ou iguais a 5% do óleo e ainda 34% do total foram sensíveis a 2,5% ou menos (Fig. 17). Pieri et al. (2012b) identificaram a CIM de um óleo de *C. officinalis* sobre *S. mutans* (ATCC 25175), com o resultado de 0,078µL/mL. Os isolados deste ensaio apresentaram CIM mais elevadas, sugerindo uma menor susceptibilidade das bactérias deste trabalho ao óleo, ou maior concentração do composto ativo no óleo usado pelos autores.

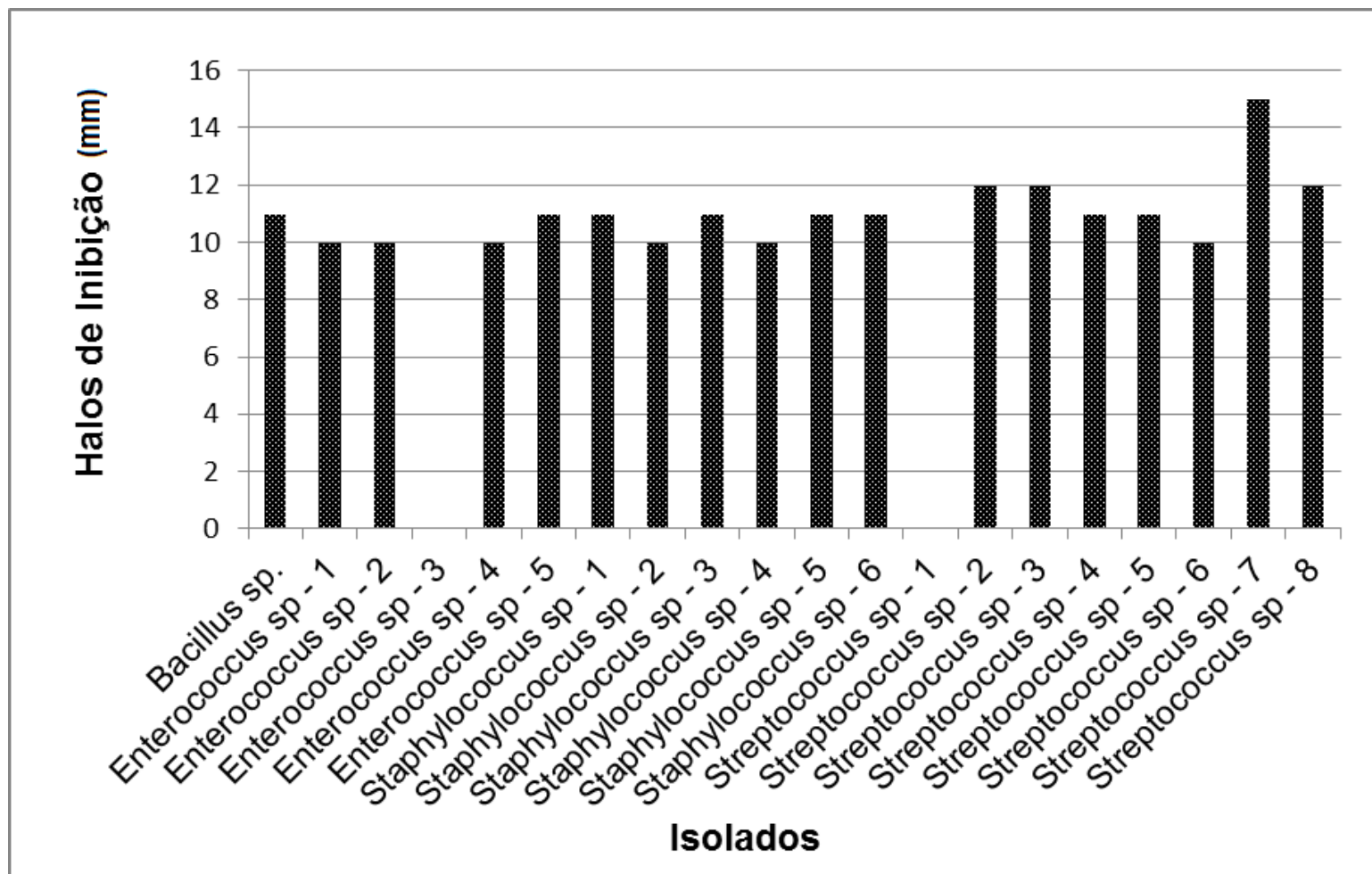


Figura 15 – Médias dos halos de inibição bacteriana de uma solução a 10% da fração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, obtida do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), denominada Q-BIOMA 639, contra 20 isolados bacterianos obtidos da placa dental de cães

Tabela 3 – Concentrações inibitórias mínimas do óleo de *Copaifera langsdorffii*, e de um de seus serquiterpenos e de clorexidina sobre isolados bacterianos oriundos da placa dental de cães

N. depósito	Gênero da bactéria	Copaíba	LDBACUFV01	Clorexidina
HQ717206	<i>Actinomyces</i> sp.	5%	2,50%	< 0,02%
HQ717208	<i>Actinomyces</i> sp.	1,25%	1,25%	< 0,02%
HQ717237	<i>Aerococcus</i> sp.	5%	2,50%	< 0,02%
HQ717211	<i>Bacillus</i> sp.	10%	5%	< 0,02%
HQ717289	<i>Bacillus</i> sp.	R	R	< 0,02%
HQ717312	Bisgaard Taxon 16	R	R	< 0,02%
HQ717176	<i>Enterococcus</i> sp.	1,25%	5%	< 0,02%
HQ717205	<i>Enterococcus</i> sp.	10%	5%	< 0,02%
HQ717227	<i>Enterococcus</i> sp.	5%	5%	< 0,02%
HQ717268	<i>Enterococcus</i> sp.	5%	1,25%	< 0,02%
HQ717302	<i>Enterococcus</i> sp.	5%	1,25%	< 0,02%
HQ717350	<i>Enterococcus</i> sp.	2,50%	2,50%	< 0,02%
HQ717319	<i>Haemophilus</i> sp.	2,50%	10%	< 0,02%
HQ717266	<i>Lactobacillus</i> sp.	5%	1,25%	< 0,02%
HQ717270	<i>Lactobacillus</i> sp.	R	5%	< 0,02%
HQ717278	<i>Lactobacillus</i> sp.	R	5%	< 0,02%
HQ717330	<i>Lactococcus</i> sp.	1,25%	0,63%	< 0,02%
HQ717335	<i>Lactococcus</i> sp.	1,25%	0,63%	< 0,02%
HQ717296	<i>Leuconostoc</i> sp.	5%	5%	< 0,02%
HQ717308	<i>Leuconostoc</i> sp.	1,25%	R	< 0,02%
HQ717331	<i>Leuconostoc</i> sp.	R	R	< 0,02%
HQ717182	<i>Staphylococcus</i> sp.	5%	2,50%	< 0,02%
HQ717223	<i>Staphylococcus</i> sp.	R	R	< 0,02%
HQ717224	<i>Staphylococcus</i> sp.	10%	R	< 0,02%
HQ717232	<i>Staphylococcus</i> sp.	R	R	< 0,02%
HQ717306	<i>Staphylococcus</i> sp.	10%	R	< 0,02%
HQ717309	<i>Staphylococcus</i> sp.	R	R	< 0,02%
HQ717228	<i>Streptococcus</i> sp.	5%	5%	< 0,02%
HQ717229	<i>Streptococcus</i> sp.	2,50%	0,63%	< 0,02%
HQ717242	<i>Streptococcus</i> sp.	NT	0,63%	< 0,02%
HQ717243	<i>Streptococcus</i> sp.	1,25%	0,63%	< 0,02%
HQ717249	<i>Streptococcus</i> sp.	1,25%	1,25%	< 0,02%
HQ717305	<i>Streptococcus</i> sp.	1,25%	1,25%	< 0,02%

*R indica resistência microbiana a todas as concentrações testadas; NT indica isolado não testado para este tratamento. Os números de depósito representam o código de busca da sequência do 16S rDNA de cada isolado no GenBank.

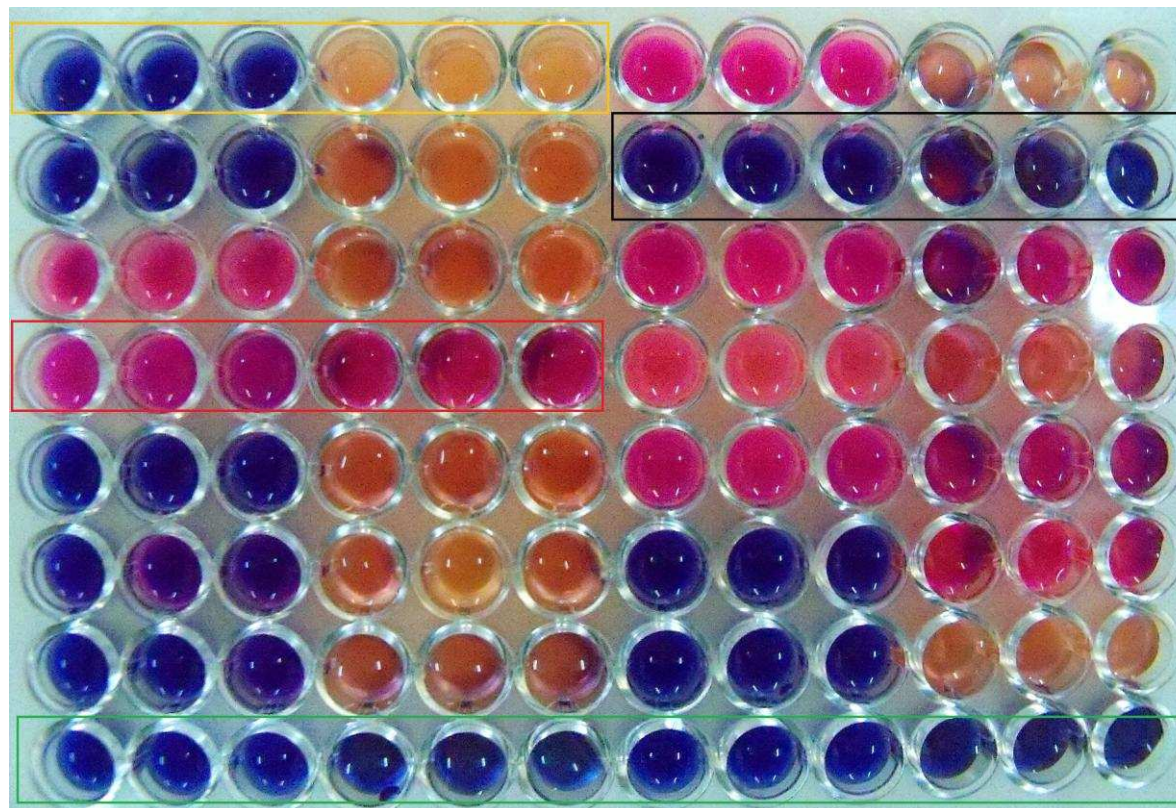


Figura 16 – Visualização das placas obtidas no teste de concentração inibitória mínima utilizando resazurina 0,01% como indicador colorimétrico. Cada isolado foi inoculado em seis orifícios, sendo os três primeiros com a substância testada e os três seguintes apenas com o meio de cultura como controle de crescimento. Destacado em amarelo o resultado positivo para inibição da bactéria, onde não há conversão do corante para rosa, e há conversão nos três orifícios do controle. Em preto destacado isolado que não obteve crescimento no meio de cultura sem antimicrobiano, tornando o resultado nulo para este isolado. Em vermelho resultado negativo para inibição da bactéria: Há conversão do corante para rosa pela bactéria nos orifícios com a substância teste. Destacado em verde o controle de esterilidade dos meios utilizados.

Dos isolados, 72% foram sensíveis ao composto LDBACUFV01 (Fig. 18), enquanto 45% a concentrações menores ou iguais a 2,5% do mesmo. Como as CIM para 85% dos isolados ficaram acima de 0,63%, optou-se pela não continuidade do teste a concentrações menores, visto que o objetivo deste experimento era confirmar a atividade do composto e selecionar uma concentração para o ensaio “in vivo”.

O gênero com a maior resistência ao composto LDBACUFV01 foi *Staphylococcus*, com apenas 17% inibidos (1/6). Como os resultados de atividade do óleo de copaíba, da fração não ácida e da fração QBIOMA 639 apontaram eficiência destas substâncias sobre o gênero *Staphylococcus*, sugere-se que a atividade antimicrobiana contra estas bactérias é conferida por outro composto constituinte, que não o LDBACUFV01. Ainda os resultados apresentados apontaram ação do referido composto sobre todos os isolados de *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp. (Tab.3) indicando-o como o ativo, ou um dos, sobre estes gêneros.

5.7. Avaliação da inibição da formação de placa dental em cães

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 19. Os resultados apontaram a área de cobertura dos dentes com placa (média±EP) de $23.3 \pm 2,6\%$ para a solução teste LDBACUFV01, de $37,5 \pm 3,7\%$ para a solução controle positivo e de $65,56 \pm 2,5\%$ de cobertura para a solução controle negativo. Os grupos teste e controle positivo com digluconato de clorexidina 0,12% foram estatisticamente inferiores ao controle negativo ($P < 0,001$), e diferentes entre si ($P < 0,05$) com vantagem na inibição da placa pelo grupo teste. Em seu estudo, Pieri et al. (2010) testaram a atividade inibitória da

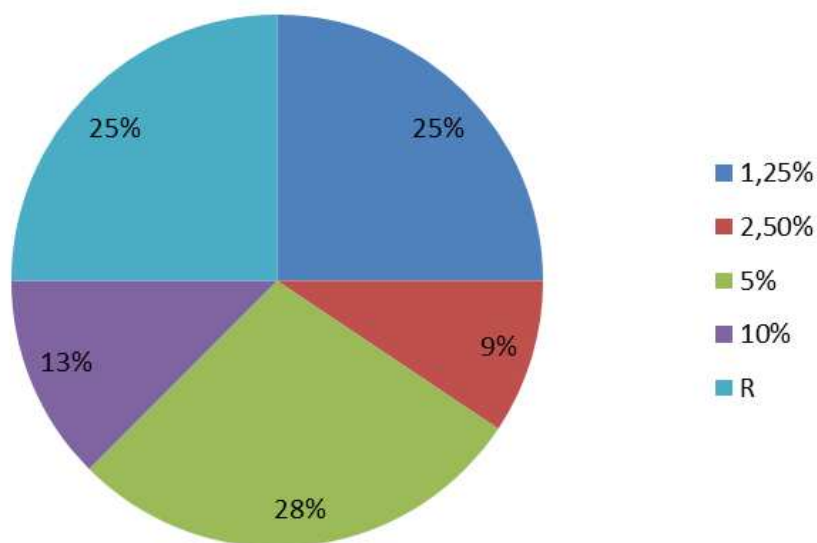


Figura 17 – Percentual do total de 32 de isolados da placa dental de cães com as Concentrações Inibitórias Mínimas estabelecidas nas diferentes concentrações do óleo de *Copaifera langsdorffii*. R representa resistência até de 10% do óleo.

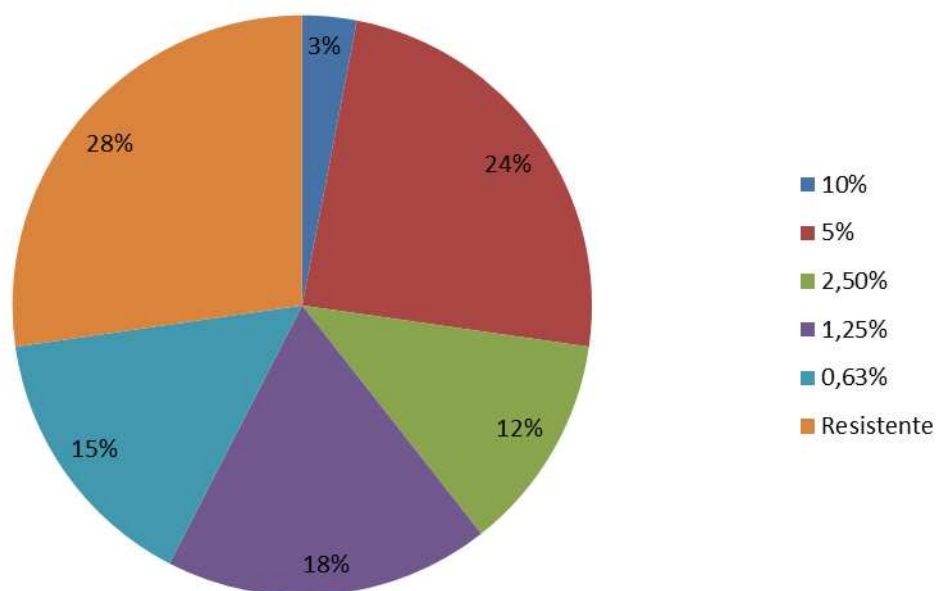


Figura 18 –. Percentual do total de 33 isolados da placa dental de cães com as Concentrações Inibitórias Mínimas estabelecidas nas diferentes concentrações do composto LDBACUFV01. R representa resistência até de 10% do composto.

formação de placa dental em cães por solução contendo óleo de copaíba (*C. officinalis*) a 10%, obtendo médias ($\pm$ EP) de $22.4 \pm 5.3\%$ e $29,2 \pm 5,4\%$, para solução com copaíba a 10% e clorexidina a 0,12% ambas superiores a de controle negativo. Embora o resultado apresentado pelo ensaio “in vitro” tenha apontado para uma superioridade da clorexidina inibindo todos os isolados (Tab. 3), no ensaio com animais, o composto LDBACUFV01 obteve resultados superiores, o que pode ter ocorrido pela interferência na capacidade adesiva das bactérias, pois todos os isolados resistentes foram classificados quanto à capacidade de se aderir em placa de microtitulação, sendo considerados seis com fraca capacidade, dois com moderada e um com forte (dados não publicados) e Pieri et al. (2010) utilizando óleo de *C. officinalis* obtiveram resultados positivos para inibição de aderência de *S. mutans*, indicando a possível ação antiaderente do óleo sobre bactérias da placa dental em humanos, o que poderia ocorrer também em cães. Outra possibilidade seria o óleo, e o bioproduto com o composto LDBACUFV08 terem a capacidade de inibir a capacidade co-agregativa das bactérias formadoras da placa dos cães, uma vez que Mussi (2011) identificou esta atividade por um óleo de *C. officinalis* sobre periodontopatógenos de humanos, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*.

Um estudo com pacientes humanos apresentou resultados negativos com relação à redução da placa dental por um gel contendo óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) (Pereira et al., 2010). Entretanto, existem diferenças entre as composições de diferentes óleos de copaíba o que poderia explicar a diferença de resultados. No presente trabalho conforme suposto a partir dos testes de ação antimicrobiana in vitro, houve inibição da formação da placa bacteriana

dental nos cães pela solução com óleo de copaíba, revelada pela redução significativa na formação bacteriana na área dos dentes analisados. Não existem relatos de testes de inibição na formação de placa bacteriana dental de cães “in vivo” com sesquiterpenos isolados do óleo, entretanto estes dados se encontram de acordo com um trabalho anterior (Pieri et al., 2010) que apontou redução de placa em cães por solução contendo óleo de copaíba íntegro.

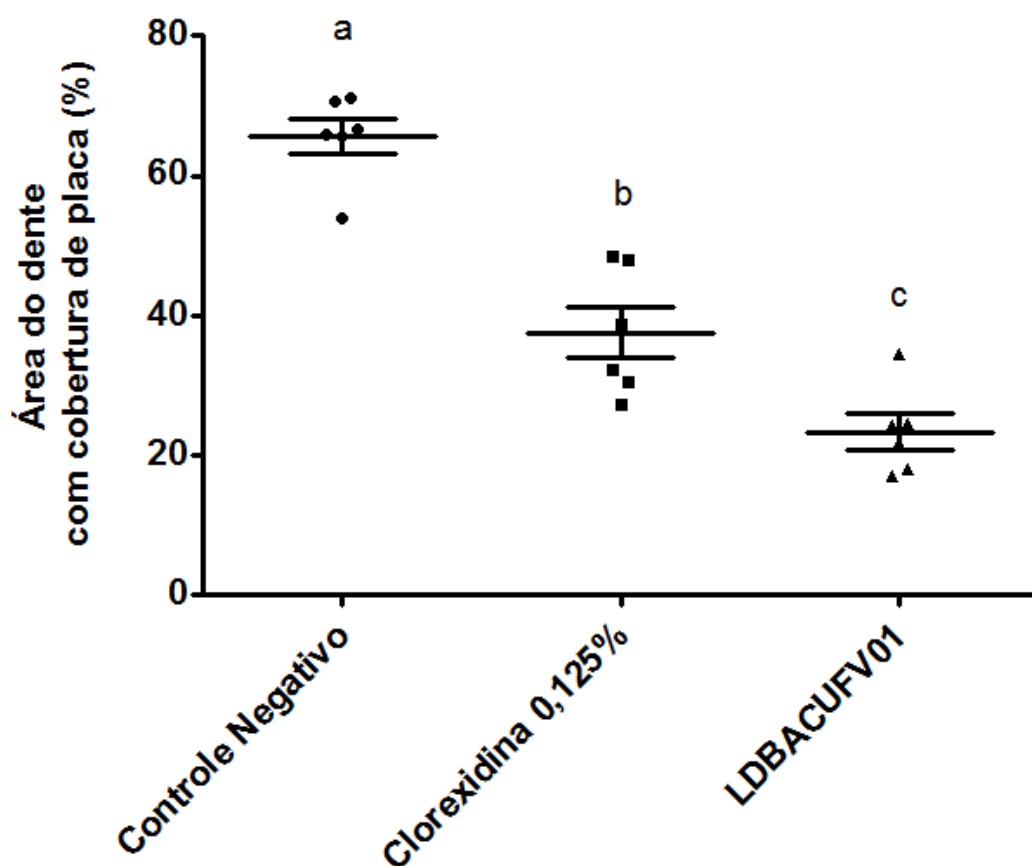


Figura 19 – Formação de placa bacteriana dental, após 15 dias de tratamento dos diferentes grupos; O resultado é expresso pelo percentual da área total da face vestibular dos dentes canino, molares e pré-molares superiores cobertos por placa bacteriana. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

Desta maneira os resultados apresentados neste trabalho demonstram a atividade do óleo de copaíba e do composto LDBACUFV01 sobre bactérias

isoladas da placa dental de cães, sendo o primeiro relato desta natureza. Esta atividade a ser explorada sob a forma do patenteamento de solução com o composto que poderá trazer vários benefícios como a redução da formação de placa dental em cães e a respectiva redução na incidência da doença periodontal. Adicionalmente, este trabalho representa: uma ampliação na escassa literatura disponível a respeito da participação do gênero *Streptococcus* na formação desta placa; ampliação na literatura disponível a respeito da atividade antimicrobiana do óleo de copaíba sobre patógenos, podendo este após novos estudos ser indicado ao tratamento de infecções causadas por estas bactérias em cães e humanos. Isto segue a tendência atual da busca por novos produtos naturais, explorando a biodiversidade da flora brasileira e substituindo medicamentos alopáticos, beneficiando a população que poderia reduzir seu gasto com medicamentos e ter acesso facilitado a estes produtos.

6. CONCLUSÕES

- O óleo de copaíba era composto de apenas diterpenos e sesquiterpenos;
- As técnicas empregadas possibilitaram isolar 15 grupos diferentes microbianos incluindo o gênero *Streptococcus* que representou 18% do total de 183 isolados da bacterioteca formada.
- O óleo de copaíba apresentou atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, incluindo bactérias Gram-positivas e negativas;
- Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram mais inibitórios sobre as bactérias da placa dental de cães e o composto selecionado entre os estas substâncias teve atividade sobre bactérias da placa dental de cães, se apresentando assim como um princípio ativo antimicrobiano do óleo.
- O bioproduto formulado apresentou atividade eficiente na redução da formação da placa dental de cães e sua solução será utilizada em pedido de patente.

7. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, J. **História Natural y Moral de las Índias: Libro tercero**. Madrid: Cervantes Virtual, 1792. Disponível em: <<http://www.cervantesvirtual.com/obra-visor/historia-natural-y-moral-de-las-indias--0/html>>
- ADDY, M. Anti-sépticos na terapia periodontal. In: Lindhe J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.332-49.
- ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosaseae, na Amazônia Central: germinação. **Acta Amaz**, v.12, n.1, p.79-82, 1982.
- ALENCASTRO, L.F. **O trato dos viventes, formação do Brasil no Atlântico sul: séculos XVI e XVII**. São Paulo: Companhia das Letras, 2000. 528 p.
- ARAÚJO JÚNIOR, F.A.; NOBRE, B.M.; ROCHA, N.O.G.; D'ALMEIDA, C.F.; HENRIQUES, B.M.V. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirur Bras**, v.20, n.1, p.93-99, 2005.
- ARMSTRONG JÚNIOR, P.J.; HUNT, D.E. In vitro evaluation of actinobolin as an antibiotic for the treatment of periodontal disease. **Appl Microbiol**, v.23, n.1, p.88-90, 1972.
- BARATA, L.E.S.; MENDONÇA, C. **Copaíba: propriedades farmacológicas, etnofarmacológicas, usos**. Rio de Janeiro: GEF, 1997. 31p.
- BARLÉU, G.; **História dos feitos recentemente praticados durante oito anos no Brasil e noutras partes sob o governo do ilustríssimo João Maurício Conde de Nassau**. Rio de Janeiro, Serviço Gráfico do Ministério da Educação, 1974. 435p. Disponível em: <<http://www.brasiliana.usp.br/bbd/handle/1918/03973800#page/435/mode/1up>>
- BENTHAN, G. Swartzieae et Caesalpinieae. In MARTIUS, C.F.P. **Flora Brasiliensis – enumeratu plantarum in Brasilia**. 1840. p.240. (v.15, p.2). Disponível no sitio: <florabrasiliensis.cria.org.br>.
- BISGAARD, M.; MUTTERS, R. Characterization of some previously unclassified *Pasteurella* spp obtained from the oral cavity of dogs and cats and description of a new species tentatively classified with the family Pasteurellaceae Pohl-1981 and provisionally called Taxon-16. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B**, v.94, n.3, p.177-184, 1986.
- BLOISE, M.I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n.5, p.46-9, set/out. 2003.

BRAGA, C.; RESENDE, C.M.F.; PESTANA, A.C.N.R.; CARMO, L.S.; COSTA, J.E.; SILVA, L.A.F.; ASSIS, L.N.; LIMA, L.A.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R. Isolamento e Identificação da microbiota periodontal de cães da raça pastor alemão. **Ciencia Rural**, v.35, n.2, p.385-390, 2005.

BRITO, M.V.H.; MOREIRA, R.J.; TAVARES, M.L.C.; CARBALLO, M.C.S.; CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A.A.S. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cir Bras**, v.20, n.3, p.243-246, 2005.

BRITO, N.M.B.; KULAY-JUNIOR, L.; SIMÕES, M.J.; LAMEIRA, O.A.; LAMARÃO, L.G.; DAMOUS, S.H.B. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.22, n.8, p.489-493, 2000.

CARDIM, F. **Do clima e terra do Brasil**. Rio de Janeiro: Livraria J. Leite, 1548. 443p.

CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica de Glickman**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1983.

CARRARA JÚNIOR, E.; MEIRELLES, H. **A indústria química e o desenvolvimento do Brasil**. São Paulo: Metalivros, 1996. 968p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Brasília: Embrapa, 1994. 641p.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CASCON, V. Copaíba: *Copaifera* spp. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd; 2004. 480p.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochem**, v.55, n.7, p.773-778, 2000.

CATÃO, R.M.R.; BARBOSA FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; SILVA, M.A.R.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **RBAC**, v.42, n.1, p.9-14, 2010.

CIANCIO S.; NIEZENGARD, R. Controle e prevenção da doença periodontal In: NIEZENGARD, R.; NEWMAN, M. **Microbiologia oral e imunologia**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.309-330.

CLARKE, D.E. Clinical and microbiological effects of oral zinc ascorbate gel in cats. **J Vet Dent**, v.18, n.4, p.177-83, 2001.

CLARKE, D.E. Drinking water additive decreases plaque and calculus accumulation in cats. **J Vet Dent**, v.23, n.2, p.79-82, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial discs and dilution susceptibility tests for bacteria isolated for animals**. 3^a ed. Pensilvania: CLSI, documento M31-A3, 2008. 99p.

CORNER, A.; DOLAN, M.M.; YANKELL, S.L.; MALAMUD, D. C31G, a new agent for oral use with potent antimicrobial and antiadherence properties. **Antimicrob Agents Chemother**. v.32, n.3, p.350-353, 1988.

COSTA, C.A.S.; HEBLIN, J.; RABELLO, F.; VILLALBA, H. Estudo preliminar de compatibilidade biológica dos cimentos de óxido de zinco e copaíba e óxido de zinco e eugenol: avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. **Rev Odontol Unesp**, v.25, n.1, p.19-26, 1996.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v.40, n.8, p.1231-234, 2002.

CRAVEIRO, A.A. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 150p.

DEBOWES, L.J.; MOSIER, D.; LOGAN, E.; HARVEY, C.E.; LOWRY, S.; RICHARDSON, D.C. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. **J Vet Dent**, v.13, n.2, p.57-60, 1996.

DE MARCO, V.; GIOSSO, M.A. Doença periodontal em cães e gatos: profilaxia e manejo dietético. **Clín Vet**, n.8, p.24-8, 1997.

DENT, V.E.; MARSH, P.D. Evidence for a basic plaque microbial community on the tooth surface in animals. **Arch Oral Biol**, v.26, n3, p171-179, 1981.

DILLON, R.A. Cavidade oral. In: KIRK, R.W. **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**. 7th ed. São Paulo: Ed. Manole, 1984. p.952-975.

DOMINGUES, L.M.; ALESSI, A.C.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; DUTRA, L.S. Microbiota saprófita associada à doença periodontal em cães. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.51, n.4, p.329-332, 1999.

DRUMOND, M.R.; CASTRO, R.D.; ALMEIDA, R.V.; PEREIRA, M.S.; PADILHA, W.W. Comparative study in vitro of the antibacterial activity from

phytotherapeutic products against cariogenic bacteria. **Pesq Bras Odontoped Clín Integr**, v.4, n.1, p.33-38, 2004.

DUNAYER, E.K.; GWALTNEY-BRANT, S.M. Acute hepatic failure and coagulopathy associated with xylitol ingestion in eight dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.229, n.7, p.1113-1117, 2006.

DUPONT, G.A. Prevention of periodontal disease. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.28, n.5, p.1129-1145, 1998.

DWYER, J.D. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae). **Brittonia**, v.7, n.3, p.143-172, 1951.

ELLIOTT, D.R.; WILSON, M.; BUCKLEY, C.M.F.; SPRATT, D.A. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **J Clin Microbiol**, v.43, n.11, p.5470-5476, 2005.

ESMERINO, L.A. PEREIRA, A.V. ADAMOWICS, T.; BORGES, D.M.; TALACIMON, E.A.; SCHELESKY, M.E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Cienc Biol Saúde**, v.10, n.1, p.53-60, 2004.

FDA. **Food Chemical Codex**, 2nd ed. Washington: FDA, 1972. p.218.

FIGUEIREDO, M.C., PARRA, S.L. **Aspectos normais da membrana periodontal e osso alveolar**. 2002. Disponível em: <<http://www.odontologia.com.br>>. Acesso em: 12 ago. 2011.

FIORINI, J.M.; CARDOSO, C.C.; MACEDO, S.B.; SILVA, S.P.; SOUZA, M.C.; PEREIRA, M. A.; SCHNEEDORF, J.M.; FIORINI, J.E. Ação do óleo ozonizado como coadjuvante na terapia da doença periodontal. **Rev Int Period Clín**, v.3, p.55-99, 2006.

FORD, R.B.; MAZZAFERRO, E.M. **Manual de procedimentos veterinários e tratamento emergencial segundo Kirk e Bistner**. 8th ed. São Paulo: Roca, 2007. 760p.

FORNEY, L.J.; ZHOU, X.; BROWN, C.J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Curr Opin Microbiol**, v.7, n.3, p.210-220, 2004.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK Jr, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **Int J Syst Bacteriol**, v.42, n.1, p.166-170, 1992.

FRANCISCO, S.G. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. **Femina**, v.33, n.2, p.89-93, 2005.

FREIRE, D.B.; BRITO-FILHO, C.R.C.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeos, pragas de colméias (Diptera: Phoridae) na Amazônia central. **Acta Amaz**, v.36, n.3, p.365-368, 2006.

GÂNDAVO, P.M. **A Primeira história do Brasil- história da província de Santa Cruz a que vulgarmente chamamos de Brasil**. Indiana: Jorge Zahar, 2004. 207p.

GIOSO, M.A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 5ª ed. São Paulo: ieditora, 2003. 202p.

GIOSO, M.A.; CARVALHO, V.G. Métodos Preventivos para a manutenção da boa saúde bucal em cães e gatos. **Clín Vet**, n.52, p.68-76, 2004.

GONÇALVES, A.L.; ALVES-FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq Inst Biol**, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara, 1945. 1461p.

GORREL, Cecília; RAWLINGS, John M. The role of dental hygiene chew in maintaining periodontal health in dogs. **J Vet Dent**, v.13, n.1, p.31-34, 1996.

GRIEVE, M. **A modern herbal**. London: Tiger book international, 1995. 221p.

GURGEL, C.B.F.M. A fitoterapia indígena do Brasil colonial (os primeiros dois séculos). In: Encontro regional de história, 11. 2004, Rio de Janeiro. Disponível em: < http://www.rj.anpuh.org/conteudo/view?ID_CONTEUDO=305>

HARVEY, C.E. Distúrbios orais, faringianos e das glândulas salivares. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1992. p.1265-1290.

HARVEY, C.E.; EMILY, P. **Small Animal Dentistry**. St. Louis: Mosby, 1993. 413p.

HARVEY, C.; SHOFER, F.S.; LASTER, L. Association of age and body weight with periodontal disease in North American dogs. **J Vet Dent**, v.11, n.3, p.94-105, 1994.

HASTY, D.L.; OFEK, I.; COURTNEY, H.S.; DOYLE, R.J. Multiple adhesins of streptococci. **Infect Immun**, v.60, n.6, p.2147-2152, 1992.

HENNET, P. Dental anatomy and physiology of small carnivores. In: CROSSLEY, D.A.; PENMANN, S. **Manual of Small Animal Dentistry**. 2nd ed. Cheltenham: British small animal veterinary association, 1995. p.93-104.

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

IJIMA, D. The Distribution of Genus *Streptococcus* in the Oral Cavities of Cats. *Int J Oral Med Sci*, v.8, n.1, p.19-23, 2009.

INDEX KEWENSIS, **supl. XX**. Oxford: Claredon Press, 1996.

JOHNSTON, N. Oral anatomy and charting. In: World Small Animal Veterinary Association Congress, 26., 2001, Vancouver. **Proceedings...**, World Small Animal Veterinary Association.

JONGENELIS, A.P.; WIEDEMANN, W. A comparison of plaque removal effectiveness of electric versus a manual toothbrush in children. **ASDC J Dent Child**, v.64, n.3, p.176-182, 1997.

KATSURA, H.; TSUKIYAMA, R.I.; SUZUKI, A.; KOBAYASHI, M. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.11, p.3009-3013, 2001.

LANG, N.; MOMBELLI, A. ATTSTROM, R. Placa e cálculo dentais. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.66-91.

LASCALA, N.T.; MOUSSALLI, N.H. **Compêndio terapêutico periodontal**. 2nd ed. São Paulo: Artes Médicas, 1994. 516p.

LEITE, A.C. **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba**. Rio Branco: UFAC, 2001. 38p.

LILJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C.G. Isolation of a protein-containing cell surface component from *Streptococcus sanguis* which affects its adherence to saliva-coated hydroxyapatite. **Infect Immun**, v.34, n.2, p.428-434, 1981.

LIMA, J.S.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Constituintes químicos do fruto de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Quím Nova**, v.31, n.5, p.1078-1080, 2008.

LIMA, T.B.; EURIDES, D.; REZENDE, R.J.; MILKEN, V.M.F.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTE, M.C.S. Escova dental e dedeira na remoção da placa bacteriana dental em cães. **Ciênc Rur**, v.34, n.7, p.155-158, 2004.

LINDHE, J.; KARRING, T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

LLOYD, J.U. **Copaifera officinalis**. Chicago: The Western Druggist, 1898. 13p.

LOESCHE, W.; GROSSMAN, N. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.4, p.727-752, 2001.

LONDON, J.; ALLEN, J. Purification and characterization of a *Bacteroides loeschei* adhesin that interacts with procaryotic and eucaryotic cells. **J Bacteriol**, v.172, n.5, p.2527-2534, 1990.

LOUREIRO, A.A.; SILVA, M.F.; ALENCAR, J.C. **Essências madeireiras da Amazônia**.v.1. Manaus: INPA, 1979. 125p.

LYON, K.F. Dental home care. **J Vet Dent**, v.8, n.2, p.26-30, 1991.

MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MATTA, A.A. **Flora medica braziliense**. Manaus: Imprensa Oficial, 1913. 318p.

MCPHEE, T.; COWLEY, G. **Essentials of periodontology and periodontics**. 3rd ed. Oxford: Blackwell scientific, 1981.

MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Braz J Pharmacogn**, v.19, n.2, p.577-581, 2009.

MING, L.C. **Levantamento de plantas medicinais na reserva extrativista "Chico Mendes" Acre**. 1995. 180f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

MITCHELL, P. **Odontologia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca; 2005. 192p.

MORS, W.; RIZZINI, CT. **Useful plants of Brazil**. San Francisco: Holden-Day Inc., 1966. 166p.

MURRAY, P.; PRAKOBPHOL, A.; LEE, T.; HOOVER, C.I.; FISHER, S.J. Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. **Infect Immun**, v.60, n.1, p.31-38, 1992.

MUSSI, M.C.M. **Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba (*Copaifera officinalis*) e de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentrações subinibitórias sobre a agregação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.

NEWMAN, M.G.; TAKEY, H.; CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica**. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 920p.

NIEMIEC, B.A. Periodontal Therapy. **Top Companion Anim Med**, v.23, n.2, p.81-90, 2008.

NIEZENGARD, R.; NEWMAN, M.G.; ZAMBOM, J.J. Doença Periodontal. In: NIEZENGARD, R.; NEWMAN G. **Microbiologia Oral e Imunologia**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.309-330.

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju-PA. **Rev Bras Plant Med**, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, U.D.; MARINS, J.F. CHIUCHETTA, S.J.R. Avaliação do ciclo celular de *Aspergillus nidulans* exposto ao extrato da planta *Copaifera officinalis* L. *Rev Saúde Bio*, v.1, n.2, p.42-47, 2005.

PACHALY, J.R. Odontoestomatologia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO DIAS, Z.S. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2006. p.1068-1091.

PACHECO, T.A.R.C.; BARATA, L.E.S.; DUARTE, M.C.T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. **Rev Bras Plantas Med**, v.8, n.esp., p.123-124, 2006.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem animal. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; SOUZA, E.T.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J Ethnopharmacol**, v.93, n.1, p.51-56, 2004.

PASTER, B.J.; OLSEN, I.; AAS, J.A.; DEWHIRST, F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontol** **2000**, v.42, n.1, p.80-87, 2006.

PEREIRA, S.L.; BARROS, P.S.L.; SALGADO, T.D.; FILHO, V.P.; COSTA, F.N. Limited benefit of *Copaifera* oil on gingivitis progression in humans. **J Contemp Dent Pract**, v.11, n.1, p.E057-064, 2010.

PICOSSE, M. **Anatomia dentária**. 4th ed. São Paulo: Sarvier, 1987. 216p.

PIERI, F.A.; DAIBERT, A.P.F.; BOURGUIGNON, E.; MOREIRA, M.A.S. Periodontal Disease in Dogs. In: Dr. Carlos C. Pérez Marín. (Org.). **A Bird's Eye View of Veterinary Medicine**. Zagreb: Intech, 2012a. p.119-140.

PIERI, F.A.; MOREIRA, M.A.S. Doença Periodontal em Cães e Prevenção. **Clín Vet**, v.89, p.42-52, 2010.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.M.; FIORINI, J.E.; MOREIRA, M.A.S.; SCHNEEDORF, J.M. Bacteriostatic effect of Copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*. **Braz Dental J**, v.23, p.36-38, 2012b.

PIERI, F.A. MUSSI, M.C.M.; FIORINI, J.E.; SCHNEEDORF, J.M. Clinical and microbiological effects of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) on dental plaque

forming bacteria in dogs. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.3, p.578-585, 2010.

POPE, E.R. Periodontal and endodontic disease. In: BOJRAB, M.J. **Disease Mechanisms in 40 Small Animal Surgery**. 3ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1993. p.187-190.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1st ed. São Paulo: Artmed, 2005. 512p.

RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. 119f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.

RIBEIRO, A. **Avaliação do potencial irritativo do óleo-resina de copaíba (substituto do eugenol) na fase exsudativa do processo inflamatório**. 1989. 77f. Tese, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1989.

RIBEIRO, L. **Medicina no Brasil colonial**. Rio de Janeiro: Sul Americana, 1971. 211p.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S. WADT, L.H.O. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Rev Árv**, v.30, n.4, p.583-591, 2006.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S. WADT, L.H.O. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. 1ª ed. Rio Branco: Embrapa, 2004. 168p.

RIGGIO, M.P.; LENNON A.; TAYLOR, D.J.; BENNETT, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Vet Microbiol**, v.150, n.3-4, p.394-400, 2011.

ROBER, M.; QUIRYNEN, M.; HAFFAJEE, A.D.; SCHEPERS, E.; TEUGHEL, W. Intra-oral microbial profiles of beagle dogs assessed by checkerboard DNA-DNA hybridization using human probes. **Vet Microbiol**, v.127, n.1-2, p.79-88, 2008.

ROBBERS, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 337p.

ROBINSON, J. Chlorhexidine Gluconate: the solution for dental problems. **J Vet Dent**, v.12, n.1, p.29-31, 1995.

RODRIGUES, L. **Anchieta e a medicina**. Belo Horizonte: Apollo, 1934. 362p.

- RODRIGUES, R.M. **A flora da Amazônia**. Belém: Editora Cejup, 1989. 463p.
- ROMAN, F.S.; CANCIO, S.; CEDIEL, R.; GARCIA, P.; SANCHES, M. Periodoncia. **Canis et felis**, v.16, p.37-8, 1995.
- ROZA, M.R. **Odontologia em pequenos animais**. 1ª ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2004. 24p.
- SALVADOR, V. **História do Brasil**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Biblioteca Nacional, 1889.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- SANS, M.; NEWMAN, M.G. Placa dental e cálculo. In: NIEZENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia Oral e Imunologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.275-292.
- SANSONE, C.; VAN HOUTE, J.; JOSHIPURA, K.; KENT, R.; MARGOLIS, H.C. The association of mutans *Streptococci* and on-mutans *streptococci* capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. **J Dent Res**, v.72, n.2, p.508-516. 1993.
- SANTOS, A.O.D.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, p.277-281. 2008.
- SHANLEY, P.; LEITE, A.; Alechandre, A.; Rigamonte Azevedo, O.C. Copaiba. In: SHANLEY, P.; MEDINA G (Eds). **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: Supercorres, 1998. 125p.
- SILVA, F.H.; OLIVEIRA, M.F.A.; BRAGA, M.; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V.S.; CARDOSO-LOPES, E.M.; TORES, L.M.B. Estudo do óleo essencial e extrato hidrometanólico de *Copaifera langsdorffii* Desf (Caesalpinaceae) do cerrado e mata atlântica. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** SBP, 2006. Disponível em: <<https://sec.sbpq.org.br/cd29ra/index2.htm>>. Acesso em: 24 fev. 2007.
- SIMÕES, C.A. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. **Método de fabricação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera Multijuga*) com atividade antibacteriana para controle de placa ou biofilme dental**. BR PI 0404266-2, 24 ago 2004.
- SLEE, A.; O'CONNOR, J. In vitro activity of octenidine dihydrochloride (WIN 41464-2) against preformed plaques of selected oral plaque forming microorganisms. **Antimicrob Agents Chemother**, v.23, n.3, p.379-384, 1983.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol**, v.63, suppl 4, p.322-331, 1992.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**, v.38, p.135-187, 2005.

SOUZA, A.B.; MARTINS, C.H.; SOUZA, M.G.; FURTADO, N.A.; HELENO, V.C.; SOUSA, J.P.; ROCHA, E.M.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytother Res**, v.25, n.2, p.215-220, 2011.

STERR, Y.; WEISS, A.; SCHMIDT, H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. **Internat J Food Microbiol**, v.136, n.1, p.75-82, 2009.

SUDO, S.Z.; Schotzko, N.K.; Folke, L.E.. Use of hydroxyapatite-coated glass beads for preclinical testing of potential antiplaque agents. **Appl Environ Microbiol**, v.32, n.3, p.428-432, 1976.

SWERTS, M.S.; COSTA, A.M.D.D.; FIORINI, J.E. Efeito da associação de clorexidina e própolis na inibição da aderência de *Streptococcus* spp. **Rev Int Period Clín**, v.2, p.10-16, 2005.

TAKADA, K.; HAYASHI, K.; SASAKI, K.; SATO, T.; HIRASAWA, M. Selectivity of Mitis Salivarius agar and a new selective medium for oral streptococci in dogs. **J Microbiol Methods**, v.66, n.3, p.460-465, 2006.

TANZER, J.M.; SLEE, J.M.; KAMAY, B.; SCHEER, E.R. In vitro evaluation of three iodine-containing compounds as antiplaque agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v.12, n.1, p.107-113, 1977.

TILLOTSON, N.E. U.S. patent **Rubber or rubberlike composition and method**. US 2379389, 26 jun 1945.

VALDEVITE L.M.; LEITÃO, D.P.; LEITE, M.F.; POLIZELLO, A.C.; FREITAS, O.; SPADARO, A. Study of the in vitro effect of copaíba oil upon virulence factors of the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. In: IUBMB Conference e Reunião Anual da SBBq, 11 e 36, 2007, Salvador. **Anais...** (CDRom).

VANCANNEYT, M. DEVRIESE, L.A.; DE GRAEL, E.M.; BAELE, M.; LEFEBVRE, K.; SNAUWAERT, C.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. HAESBROUCK, F. *Streptococcus minor* sp. nov., from faecal samples and tonsils of domestic animals. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, n.2, p.449-452, 2004.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Quim Nova**, v. 25, n.2, p.273-286, 2002.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: manual das plantas medicinais: a farmácia de Deus**. 2nd.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. 347p.

WILDERER, P.A; CHARAKLIS, W.G. Structure and function of biofilms. In: _____. **Structure and function of biofilms**. Chichester: John Wiley, 1989. p.199-214.

WIGGS, R.B.; LOBPRISE, H. **Veterinary dentistry principles and practice**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. 748p.

WOOD, G.B.; BACHE, F. **The dispensatory of the United States of America**. 22nd.ed. Londres: J.B. Lippincott Company; 1940. 369p.

YAZAKI, S.C.; KOGO-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C.; UNTERKIRCHER, C.S, IgA anti-*Streptococcus mutans* em crianças com e sem cárie dentária. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.13, n.3, 1999.

ZANINI, A.C.; BASILE, A.C.; MARTIN, M.I.; OGA, S. **Guia de Medicamentos**. São Paulo: Atheneu; 1995. 787p.