

Taís Elisabete Crivellaro de Menezes

INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE ARAÇÁ (*Psidium cattleianum*) E AROEIRA DO SERTÃO (*Myracrodruon urundeuva*) NA PREVENÇÃO À CÁRIE EM MODELOS ANIMAIS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para a obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior.

ARAÇATUBA
2006

Dados Curriculares

Taís Elisabete Crivellaro de Menezes

NASCIMENTO: 17. 08. 1981- Lins / SP.

FILIAÇÃO: Plínio Norberto Zorman de Menezes.
Aparecida Elisabete Crivellaro de Menezes.

1999 / 2002: Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Lins, Universidade Metodista de Piracicaba-UNIMEP.

2003 / 2004: Curso de Especialização em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista- UNESP.

2005/ 2006: Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.

Associações: CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo.

Dedicatória

*Dedicado a Deus, Nossa
Senhora e a toda a minha
família e amigos, em
especial, ao meu avô João,
sem os quais essa conquista
não teria se tornado
realidade.*

Agradecimentos

Mais uma caminhada que chega ao final, mas essa conquista tão sonhada não teria se tornado realidade sem o apoio, a paciência, a boa-vontade, a disposição a ajudar ou “simplesmente” o “ombro” de tantos que, em algum momento ou o tempo inteiro, estiveram ao meu lado. A todas essas pessoas que foram tão importantes nesse momento tão especial de minha vida deixo aqui o “meu muito obrigada de coração”!

Em primeiro lugar agradeço a **Deus e Nossa Senhora**, *Eles* foram meu suporte, força e guia o tempo inteiro.

Agradeço, ainda, a **meus pais (Plínio Menezes e Elisabete Menezes), meu irmão (João Paulo C. de Menezes), e toda a minha família**, sempre tão especiais e presentes em minha vida.

Não poderia esquecer dos **meus amigos** de longa data e daqueles que fiz ao longo desse trajeto. Deixo a todos o meu carinho e agradecimento.

Obrigada à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP** pela oportunidade que me foi dada.

Muito obrigada a todos os **professores (Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profa. Dra. Sandra Maria Herondina C. Ávila Aguiar, Profa. Dra. Rosangela Santos Nery), funcionários** (em especial, deixo o meu abraço à **Maria e ao Mário**, sempre tão atenciosos) e **colegas do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, assim como a todos do **Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da FOA – UNESP** (deixo aqui um “obrigada de coração” ao **Sr. José Marcelo Tramarin**, sempre disposto a me ajudar).

Com estima, deixo o meu agradecimento ao meu orientador **Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior** e a minha co-orientadora **Profa. Dra. Ana Cláudia Okamoto**.

Agradeço à colaboração e atenção dispensadas para o pleno desenvolvimento deste trabalho por: **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, **Prof. Dr. Eloi Dezan Júnior**, **Profa. Evanice Menezes Marçal**, **Prof. Dr. Luis Fernando Landucci**, e também à aluna **Ellen Cristina Gaetti Jardim**.

Ao “**Grupo do Amor - Nossa Senhora de Fátima**”, da cidade de Lins, em especial à **Rosely de Souza Fernandes**, **Antônia dos Santos Luz** e **Mário Luiz Junquillo Jr.**, o meu reconhecimento, admiração e carinho.

Por fim, meu agradecimento ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ - Brasil**. O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPQ - Brasil.

A todos, o meu reconhecimento, admiração e respeito. Saibam que têm aqui uma amiga sempre que precisarem!

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	09
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.	RESULTADOS	15
4.	DISCUSSÃO	21
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
6.	ANEXOS	35

Menezes TEC. Influência do extrato de araçá (*Psidium cattleianum*) e aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*) na prevenção à cárie em modelos animais [dissertação]. Araçatuba: universidade estadual paulista; 2006.

Palavras-chave: extratos vegetais, cárie, prevenção, desafio cariogênico, *S. mutans* .

RESUMO: O presente estudo teve como objetivos avaliar a capacidade dos extratos de araçá e de aroeira do sertão em interferir com a microdureza do esmalte dental de ratos submetidos a desafio cariogênico, bem como avaliar o efeito desses extratos sobre a microbiota cariogênica implantada desses animais, e seus possíveis efeitos colaterais. Sessenta ratos do tipo *Wistar*, divididos em 4 grupos, foram submetidos a desafio cariogênico (dieta NIH-2000) e, metade deles, à cirurgia para remoção das glândulas salivares maiores. Os grupos recebiam, como solução de hidratação, água (controle), extrato de araçá (diluído em água) ou extrato de aroeira (diluída em água). Coletas da microbiota bucal dos animais foram realizadas semanalmente e, após 53 dias, os animais foram sacrificados. Os dentes dos animais foram preparados e submetidos à análise de microdureza longitudinal do esmalte, assim como os órgãos vitais de alguns animais foram removidos e submetidos à análise histopatológica. O modelo animal e as condições experimentais se mostraram adequadas para a caracterização dos efeitos dos extratos testados sobre a microdureza do esmalte e sobre a microbiota cariogênica, sendo que os dois extratos testados produziram uma redução substancial da microbiota cariogênica nos animais experimentais e o consumo dos mesmos afetou positivamente a dureza superficial do esmalte. A ingestão dos extratos não alterou significativamente os órgãos dos animais, quando comparado com os grupos controle.

Menezes TEC. Araçá extract (*Psidium cattleianum*) and aroeira extract (*Myracrodruon urundeuva*) efficacy in caries prevention using animal models [dissertation]. Aracatuba: Universidade estadual paulista; 2006.

Key-Words: plant extracts, natural medicines, dental caries, prevention, *S. mutans*

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the influence of “araçá” and “aroeira” extracts on dental enamel microhardness of rats submitted to a cariogenic challenge, and on their cariogenic microflora and determine the collateral effects of the extracts in the animals. Sixty *Wistar* rats, divided in 4 groups, were submitted to a cariogenic diet (NIH–2000 diet) and, half of them, was submitted to surgical remotion of the major salivary glands. The groups received water (control), araçá extract (solved in water) or aroeira extract (solved in water) as hydration solution. Collections of oral specimens were performed weekly and, after 53 days, the animals were sacrificed. The animals teeth were prepared and submitted to longitudinal enamel microhardness analysis, as well some vital organs of animals were removed and submitted to histopathological procedures and analysis. The animal pattern and experimental conditions were appropriated to evaluate and measure the extracts effects on the enamel microhardness and on the cariogenic microbiota. Both the extracts reduced substantially the cariogenic microbiota of the animals and the use of them affected positively the longitudinal enamel microhardness. The extracts ingestion did not affected in a significant extension the microscopic characteristics of the organs, compared with control group (water).

1. INTRODUÇÃO

Apesar da redução significativa da incidência e prevalência da cárie nos países ocidentais, nos últimos 20 anos, infelizmente alguns pacientes concentram grande parte das lesões cariosas nas comunidades em que vivem, constituindo os chamados “grupos de polarização”, os quais se mostram refratários aos métodos preventivos disponíveis [Martins et al., 2006; Narvai et al., 2006]. Esses pacientes com alto risco e/ou submetidos à atividade cariogênica intensa apresentam níveis salivares elevados de estreptococos do grupo *mutans*, os quais possuem íntima relação com o desenvolvimento da cárie e cujos níveis salivares podem ser utilizados para avaliar e quantificar o risco à cárie da população [Carvalho et al., 2006].

Sabe-se que *S. mutans* e espécies correlatas possuem características específicas que lhes conferem alto potencial cariogênico, como sua notável capacidade de adesão à superfície de esmalte [Daglia et al., 2002; Leitão et al., 2004]. A literatura traz, ainda, que a presença de sacarose pode potencializar sobremaneira a cinética de formação do biofilme dentário, possivelmente na fase de acumulação do biofilme, aumentando a produção de ácidos orgânicos e a desmineralização do esmalte dentário adjacente [Hodgson et al., 2001].

A adesão desses cocos à superfície do dente e a formação do biofilme bucal ocorre em dois estágios, sendo que o primeiro é a adesão reversível à película adquirida (interações inespecíficas) e o segundo estágio é a acumulação de *S. mutans* através de proliferação celular e produção de glucanos extracelulares (interações específicas). A interferência em algum desses mecanismos pode prevenir a formação da cárie dentária ou pelo menos retardar o processo carioso [Daglia et al., 2002].

Para que um composto com atividade antimicrobiana exerça sua atividade sobre microrganismos em biofilmes é necessário que o mesmo seja empregado em concentrações elevadas e que o composto permaneça por um período suficientemente prolongado no interior da cavidade bucal, visto que a penetração dos mesmos, no interior de biofilmes, é dificultada pela própria composição do agente químico, do biofilme, e pela menor sensibilidade que esses microrganismos, nos biofilmes, possuem em relação aos seus congêneres planctônicos [Guggenheim et al., 2004].

Além disso, a grande maioria dos colutórios e antimicrobianos disponíveis no mercado, particularmente aqueles que possuem clorexidina em sua composição, possui desvantagens sérias quando utilizados por longos períodos de tempo, como manchamento dos dentes, perda de paladar, ardor e sensação de queimação [Cardoso et al., 2005; Bruschi et al., 2006].

Desta forma, se torna relevante a avaliação da atividade antimicrobiana e antiaderente de extratos naturais, já que muitos desses compostos são largamente utilizados na medicina popular ou mesmo na dieta [Morgan et al., 2001; Filoche et al., 2005]. Nessa área, estudos vêm mostrando atividade anticariogênica de extratos naturais, destacando-se a semente de cacau [Ooshima et al., 2000(a); Ooshima et al., 2000(b); Matsumoto et al., 2004], o própolis [Leitão et al., 2004], o café [Landucci et al., 2003], assim como o uso de alguns óleos essenciais naturais, como o chá-verde, associados à clorexidina [Filoche et al., 2005].

Os resultados positivos dos extratos de araquê e aroeira do sertão obtidos em estudos “in vitro” realizados junto ao departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da FOA-UNESP [Bianco, 2004; Landucci, 2005] sugeriram que estas espécies seriam capazes de reduzir significativamente a atividade e desenvolvimento do biofilme microbiano dental, apresentando potencial anticariogênico. Dessa maneira, se torna pertinente a realização de estudos, como o uso de modelos animais, que venham a caracterizar de forma mais adequada o potencial desses extratos vegetais visando um emprego futuro dos mesmos na prevenção da cárie dental.

Assim o presente estudo tem como objetivos avaliar a capacidade dos extratos de araquê e de aroeira do sertão em interferir com a microdureza do esmalte dental de ratos submetidos a desafio cariogênico, bem como avaliar o efeito desses extratos sobre a microbiota cariogênica dos animais e os possíveis efeitos colaterais dos extratos nos animais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Nos testes para confirmar a atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* foram utilizados *Streptococcus mutans* ATCC 35688 e *Streptococcus mutans* ATCC 1910.

2.2. Extratos vegetais

As plantas foram coletadas em áreas não desmatadas e mantidas como reserva permanente em propriedades rurais da região da cidade de Araçatuba, Estado de São Paulo, bem como no próprio campus da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. O período da coleta correspondeu ao período chuvoso de 2005-2006. Foram preparados extratos vegetais de araçá (*Psidium cattleianum*) e de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*).

As folhas das espécies vegetais utilizadas foram colhidas de plantas com aspecto sadio e bom desenvolvimento, sem sinais de envelhecimento, doenças e pragas. As folhas foram submetidas, inicialmente, a secagem em locais ventilados, em temperatura ambiente (média de 27°C), seguida pela secagem em estufa à temperatura controlada de 37°C, em dessecadores de vidro, a vácuo, até que se tornassem secas e quebradiças.

A seguir, realizou-se a etapa de fragmentação, que consistiu na divisão das folhas em partículas de tamanho homogêneo, que foram, logo após, reduzidas a pó e mantidas em frascos âmbar. Posteriormente, 25 gramas de cada planta, foram adicionados a 100mL de água destilada e deixadas por 5 minutos a 100°C, por 1 hora a 55°C e por 72 horas em temperatura ambiente. Finalmente, procedeu-se o tratamento dos preparados por meio de filtração comum e o produto resultante foi transferido a frascos âmbar (100mL).

Para os testes de atividade antimicrobiana “in vitro”, o preparado ainda era submetido à filtração em membranas de éster de celulose com porosidade de 0,65 µm e esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm (Millipore).

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais

2.3.1. Determinação da máxima diluição inibitória dos extratos vegetais [NCCLS, 1995].

Foi avaliada de acordo com a metodologia de diluição da droga em caldo. Os testes foram realizados em triplicata. Os extratos vegetais foram adicionados a tubos contendo caldo infuso de cérebro e coração (BHI) acrescidos de extrato de levedura (0,5%), e inoculados com 10⁵ UFC das cepas testadas, de forma a representar 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 da

concentração original do extrato. A seguir os tubos foram incubados em condições de microaerofilia, a 37°C, por 48 horas. A máxima diluição inibitória do extrato vegetal foi concebida como sendo a maior diluição do mesmo capaz de inibir totalmente o desenvolvimento microbiano. Como controle utilizou-se o próprio caldo infuso de cérebro e coração suplementado e inoculado com as cepas teste.

2.3.2. Avaliação da microbiota bucal dos animais.

A microbiota do biofilme supragengival dos roedores e a contaminação microbiana presente na saliva dos animais foram avaliadas semanalmente, desde os procedimentos cirúrgicos até a eutanásia dos animais, para detectar as modificações que os extratos vegetais e as condições experimentais poderiam ter produzido. Amostras de saliva e biofilme microbiano, removidos com auxílio de zaragatoas, foram transferidas para solução salina, submetidos a diluições seriadas e inoculados em ágar MSBS.

As placas foram incubadas em anaerobiose, a 37° C, por 72 horas. Alguns isolados foram identificados de acordo com suas características morfocoloniais e bioquímico-fisiológicas [Gold et al., 1973]. A determinação do número de unidades formadoras de colônia de *S. mutans* na saliva e no biofilme foi realizada com auxílio de um contador de colônias digital (Comecta Digital Counter S.A.).

2.3.3. Avaliação da ação do extrato vegetal sobre a ocorrência de cárie em animais experimentais submetidos a desafio cariogênico.

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus* – variedade Wistar) machos, com peso aproximado de 180 gramas, com 60 dias de idade. Inicialmente foi realizada a análise da microbiota bucal dos ratos por meio de coletas de saliva e biofilme bucal com zaragatoas, para verificação da colonização prévia por estreptococos do grupo mutans. Os espécimes foram inoculados em ágar MSBS [Gold et al., 1973], por 48 horas em anaerobiose (90% N₂ + 10% CO₂), em dessecadores de vidro do tipo Pyrex, a 37°C.

Constatando-se ausência de colonização por esses microrganismos nos roedores empregados, procedeu-se, a seguir, a inoculação de 10⁶ UFC de *S. mutans* ATCC 1910 e ATCC 35688, seguido de administração de dieta cariogênica (dieta NIH 2000, com 56% de sacarose, Hamada et al., 1978) e água "ad libitum" por 7 dias para estabilizar a infecção e a

implantação dos microrganismos no biofilme bucal [Peres et al., 2002]. O controle da implantação das cepas de referência na microbiota bucal dos roedores foi realizado após 7 dias através de cultura em ágar MSBS, como descrito acima.

Após 11 dias do início do experimento, os ratos foram divididos em 4 grupos experimentais:

Grupo I: animais que NÃO TIVERAM suas glândulas salivares maiores removidas cirurgicamente e foram submetidos à dieta cariogênica (NIH 2000), recebendo os extratos como solução para hidratação [Yu et al., 2000];

Grupo II: semelhante ao grupo anterior, mas constituído de ratos que TIVERAM suas glândulas salivares submandibulares e sublinguais cirurgicamente removidas, como descrito por Bowen et al. [1988], enquanto o ducto da glândula parótida era submetido à ligadura cirúrgica;

Grupo III: animais que NÃO TIVERAM suas glândulas salivares maiores removidas cirurgicamente, mas foram submetidos à dieta cariogênica e receberam água como solução para hidratação;

Grupo IV: semelhante ao grupo III, mas que receberam o tratamento em suas glândulas salivares como descrito no grupo II.

Os procedimentos cirúrgicos em todos os animais, de todos os grupos, foram realizados sob anestesia geral por injeção de Tiopental (tiopental sódico), na dosagem de 50mg/Kg do animal, pela via intraperitoneal. Após 53 dias os animais foram sacrificados por injeção de excesso de tiopental sódico por via intraperitoneal e tiveram suas cabeças dissecadas e colocadas em ambiente úmido com gazes embebidas em formol a 2%.

2.3.4. Avaliação do peso corporal e dos órgãos vitais dos animais.

O peso corporal dos animais foi determinado periodicamente e, após o desafio cariogênico e sacrifício dos animais, procedeu-se à remoção de órgãos de alguns animais para análise histopatológica (Anexo I). Partes dos pulmões, baço, intestino grosso, intestino delgado, coração, fígado, rins e sistema nervoso central foram removidos, pesados e fixados em formalina tamponada (10%), por 24 horas, desidratadas e incluídas em parafina. Cortes semi-seriados com 6 µm de espessura foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina e analisados em microscopia convencional.

2.3.5. Análise da microdureza do esmalte [Shinoda, 1975].

Após o sacrifício dos animais, os incisivos dos mesmos foram removidos individualmente, enquanto os molares foram removidos em bloco. Todas as coroas dos dentes foram removidas utilizando-se instrumento de baixa rotação com discos de corte. Os dentes eram separados em frascos correspondentes a cada um dos animais e fixados com gaze embebida em formol a 2%.

Em seguida, os dentes foram embutidos em blocos de resina acrílica e, após a obtenção dos blocos com os dentes, realizou-se o ajuste dos mesmos na politriz. O desgaste foi realizado sob baixa rotação e refrigeração, até que se observava a exposição da superfície de esmalte, seguido de polimento da superfície de esmalte dos dentes com uma sequência de lixas e refrigeração a água. Entre cada polimento, os blocos foram lavados com jatos de água deionizada e submetidos ao ultra-som Branson 2210, em água deionizada durante 3 minutos. Na sequência o esmalte foi polido com papel feltro para polimento e suspensão de diamante. Posteriormente, os corpos de provas foram lavados com jato de água deionizada e submetidos ao ultra-som. Finalmente, os corpos de provas foram lavados em jatos de água deionizada, e, a seguir, conservados em ambiente úmido (gazes embebidas em formol a 2%).

Em cada incisivo, na região cervical, foram realizadas 4 edentações no esmalte, utilizando-se carga de 25 gramas e o tempo de 10 segundos, separadas por uma distância de 10 μ m em relação à superfície de esmalte e, as demais, 20 μ m entre si. Nos “blocos” de molares, escolheu-se o fundo de sulco do segundo molar, onde foram realizadas 4 edentações no esmalte, utilizando-se carga de 25 gramas e o tempo de 10 segundos, separadas por uma distância de 10 μ m em relação à superfície de esmalte e, as demais, 20 μ m entre si.

Os testes de microdureza realizados foram do tipo KNOOP e os resultados foram analisados de acordo com FEATHERSTONE.

2.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos com as contagens de colônias, assim como os referentes à microdureza do esmalte dos dentes dos animais foram analisados estatisticamente pelo

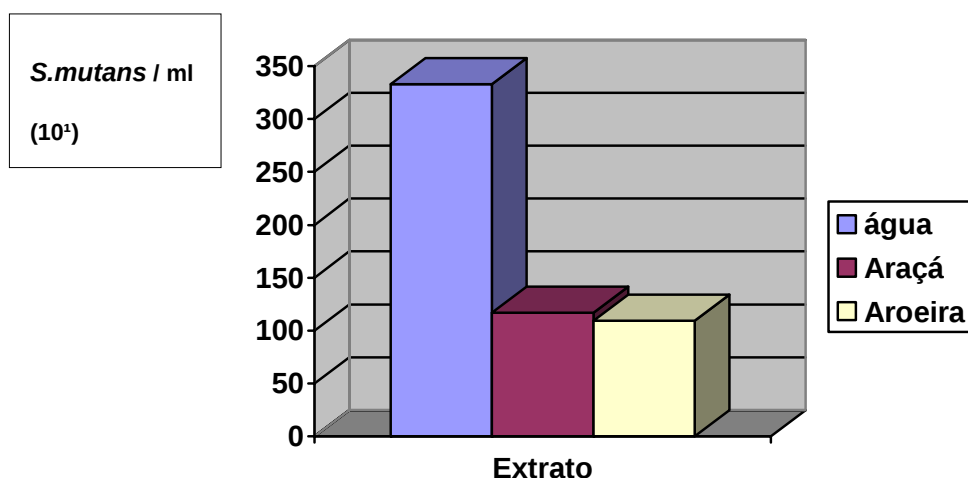
programa GMC, através de análise de variância (ANOVA) pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

As cepas de referência testadas (*Streptococcus mutans* ATCC 35688 e *Streptococcus mutans* ATCC 1910) foram inibidas pelos extratos testados na diluição 1/8, não tendo sido observada nenhuma diferença individual das cepas, tampouco na efetividade dos dois extratos testados.

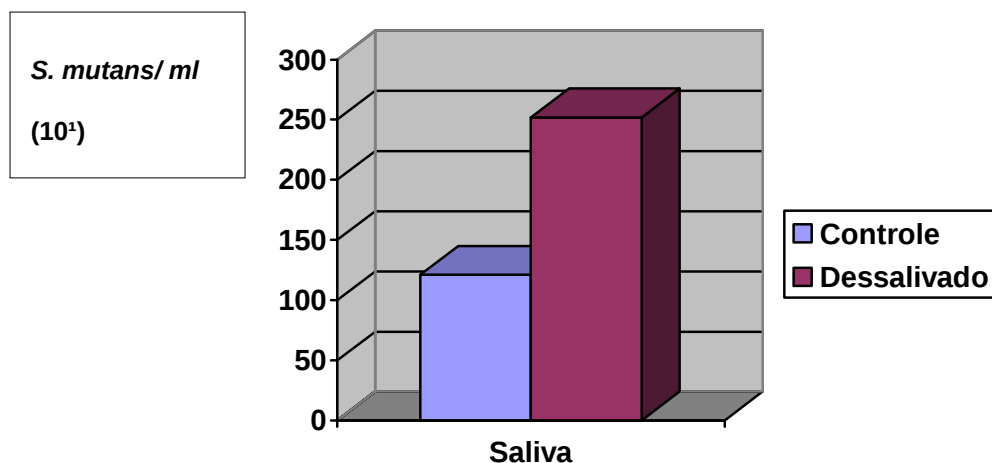
Em relação à microbiota oral dos animais experimentais, através do Gráfico 1 pôde-se observar que aqueles que receberam os extratos de araquê e de aroeira do sertão apresentaram menores contagens de colônias de *S. mutans* ao longo das coletas efetuadas ($p < 0,00001$), não havendo diferenças significativas em relação aos resultados obtidos entre os dois extratos testados.

Gráfico 1 – Colônias de *S. mutans* apresentadas pelos grupos que receberam araquê e aroeira, e pelos grupos controle.



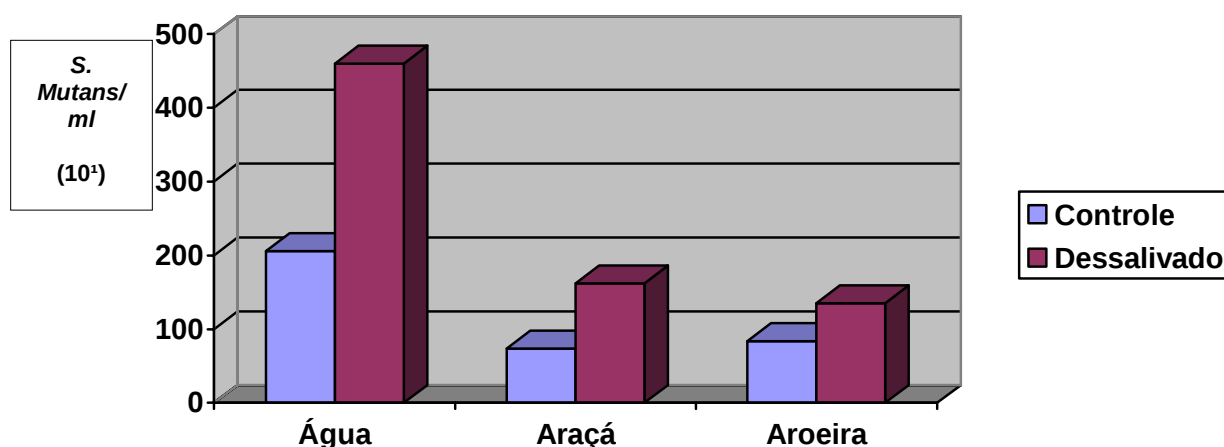
Já o Gráfico 2 deixa clara a diferença de quantidade de colônias de *S. mutans* encontradas, ao longo do estudo, entre os animais dessalivados e os que não foram submetidos à cirurgia. Fica nítida a maior contagem de colônias de *S. mutans* nos animais em que foram removidas as glândulas salivares maiores e atados os ductos principais da parótida ($p = 0,0001$).

Gráfico 2 – Colônias de *S. mutans* apresentadas pelos animais dessalivados e pelos não operados.



Pôde-se observar que os animais dessalivados apresentaram maiores contagens de colônias de *S. mutans*, em relação aos animais não operados, mesmo ao se considerar cada grupo experimental separadamente ($p = 0.0127$), sendo que os animais que receberam os extratos apresentam contagens de colônias inferiores aos grupos controle (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Colônias de *S. mutans* apresentadas por cada grupo experimental individualmente.



Os Gráficos 4 e 5 evidenciaram que os animais que receberam os extratos de araçá e

aroeira do sertão como líquido de hidratação apresentaram contagens inferiores de colônias de *S. mutans*, em relação aos grupos controle, mesmo ao se analisar os valores de cada coleta individualizados ($p= 0.0001$). Observa-se, mais uma vez, que os resultados obtidos pelos extratos testados não apresentam disparidades significativas entre si.

Gráfico 4 – Colônias de *S. mutans* apresentadas pelos grupos experimentais a cada coleta.

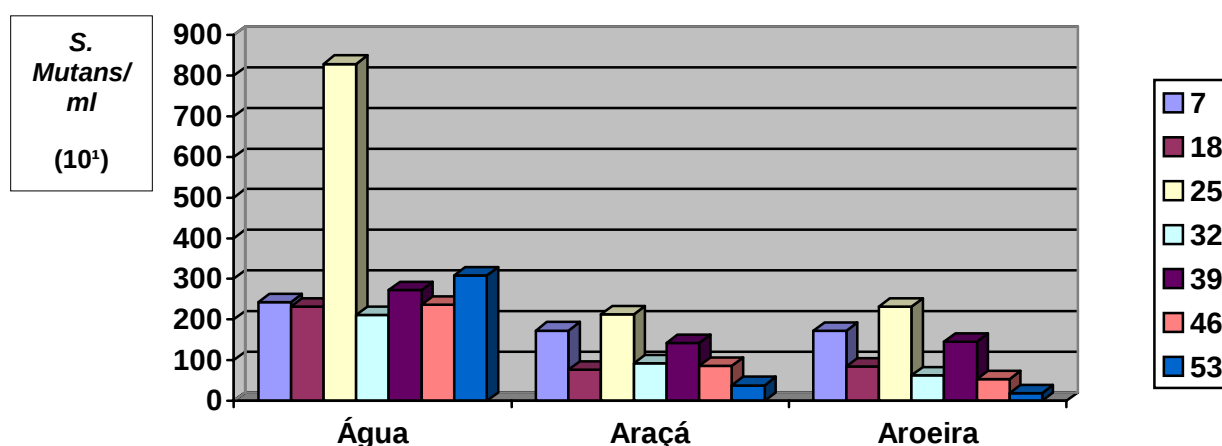
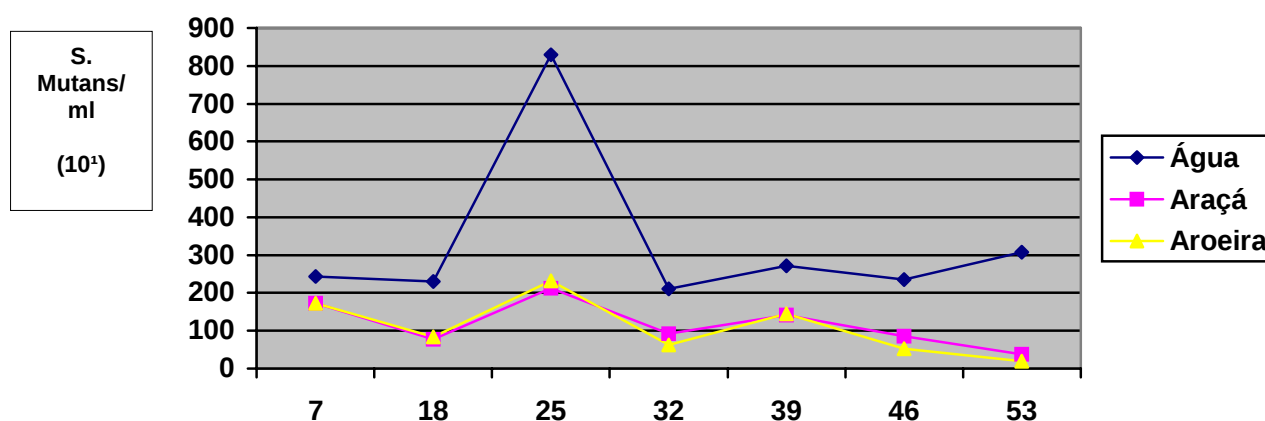


Gráfico 5 – Colônias de *S. mutans* apresentadas pelos grupos experimentais ao longo do tempo (Gráfico de linhas).



Em relação à microdureza longitudinal de esmalte dos dentes dos animais experimentais, a Tabela 1 revela que os ratos que receberam os extratos apresentaram valores superiores de porcentagem de volume mineral do esmalte, em relação aos animais

dos grupos controle ($p= 0.000315$), muito embora, não se observe diferenças significativas de valores entre os animais dessalivados e os não operados. Não se observam, ainda, diferenças significativas de valores entre incisivos e molares, assim como entre os resultados dos grupos que receberam os dois extratos testados.

Tabela 1 – Porcentagem de volume mineral do esmalte (média $\pm$ dp, n=10) dos dentes dos animais não operados e dessalivados de acordo com o extrato administrado.

Tratamento	Ratos			
	Não Operados		Dessalivados	
	incisivo	molar	incisivo	molar
Água	87,6 $\pm$ 0,6 a	87,7 $\pm$ 0,2 a	87,8 $\pm$ 0,4 a	87,8 $\pm$ 0,2 a
Araçá	93,5 $\pm$ 0,2 b	93,3 $\pm$ 0,2 b	93,2 $\pm$ 0,4 b	93,3 $\pm$ 0,1 b
Aroeira	93,4 $\pm$ 0,4 b	93,3 $\pm$ 0,1 b	93,2 $\pm$ 0,4 b	93,3 $\pm$ 0,1 b

*Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística entre si ($p<0,05$).

Quanto ao exame histopatológico dos órgãos dos animais testados, não foram observadas alterações celulares ou teciduais que pudessem indicar que os extratos foram particularmente tóxicos ou pudessem causar algum tipo de lesão tecidual, quando comparados com o grupo controle (água). Em todas as lâminas correspondentes aos órgãos examinados dos três grupos, pôde-se observar células e arquitetura normal, demonstrando que o extrato de aroeira e araçá ingeridos pelos animais durante a fase experimental, não provocaram danos teciduais nos órgãos examinados (Figuras de 1 a 6). Estes órgãos também apresentaram peso dentro da normalidade (Anexo C). Os animais de todos os grupos experimentais apresentaram um ganho de peso gradual ao longo dos 53 dias, sem significância estatística (Anexos D, E e F).

Figura 1- Características microscópicas do fígado de animal do grupo água (controle), corado por hematoxilina e eosina, com aumento de 40 vezes.

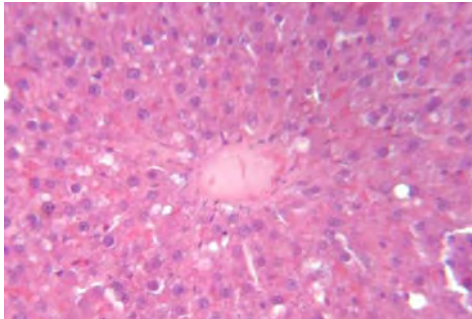


Figura 2 - Características microscópicas do fígado de animal do grupo arará, corado por hematoxilina e eosina, com aumento de 40 vezes.

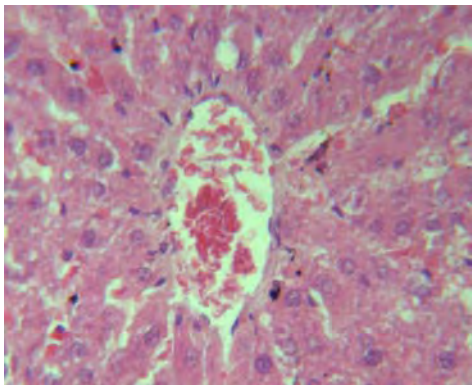


Figura 3 - Características microscópicas do fígado de animal do grupo aroeira, corado por hematoxylina e eosina, com aumento de 40 vezes.

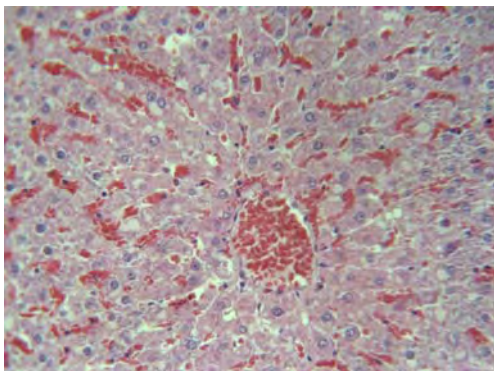


Figura 4 - Características microscópicas do rim de animal do grupo água (controle), corado por hematoxilina e eosina, com aumento de 40 vezes.

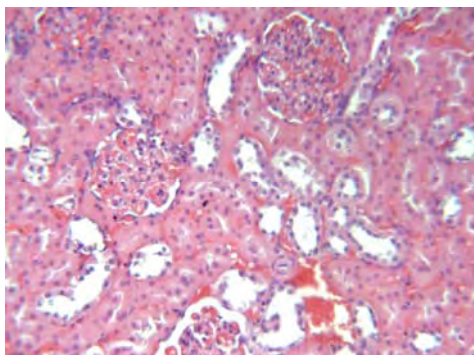


Figura 5 - Características microscópicas do rim de animal do grupo arará, corado por hematoxilina e eosina, com aumento de 40 vezes.

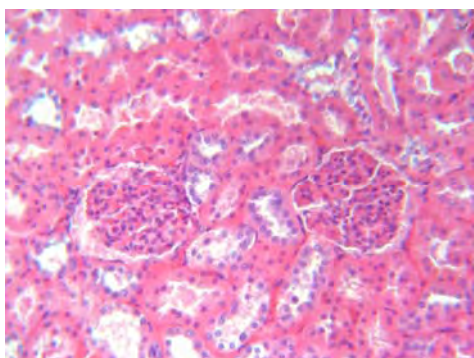
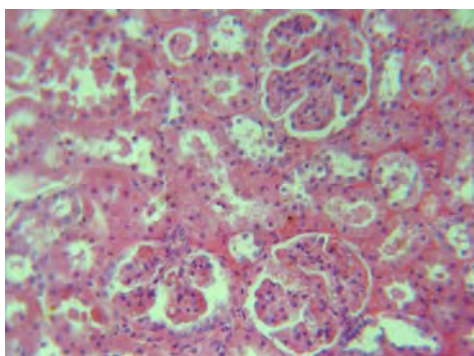


Figura 6 - Características microscópicas do rim de animal do grupo aroeira, corado por hematoxilina e eosina, com aumento de 40 vezes.



4. DISCUSSÃO

Em função da relevância dos estreptococos do grupo mutans na etiologia da cárie dental, essas espécies bacterianas tornaram-se o alvo principal das abordagens ecológicas preventivas, as quais objetivam interferir seletivamente com a participação dos diferentes grupos microbianos na população do biofilme dental e a expressão de seus fatores de virulência [Featherstone, 2000; Carvalho et al., 2006].

A descoberta de métodos e substâncias que auxiliem no controle do desenvolvimento desses biofilmes cariogênicos se torna, dessa maneira, importante para o controle e prevenção da cárie dental [Tenuta et al., 2003; Narvai et al., 2006], particularmente em função da existência dos grupos de polarização da cárie, que não respondem satisfatoriamente às medidas preventivas tradicionais [Gushi et al., 2005; Martins et al., 2006, Narvai et al., 2006].

Contudo, o uso de agentes antimicrobianos para o controle do biofilme esbarra em sérias limitações, que vão desde a maior resistência que esses microrganismos apresentam quando comparados com bactérias planctônicas [Guggenheim et al 2004; Marsh, 2004; Landry et al., 2006], dificuldade de penetração do princípio ativo no interior do biofilme [Marsh, 2004], alterações metabólicas bacterianas [Guggenheim et al 2004; Marsh, 2004], além dos efeitos colaterais dos principais agentes químicos, como clorexidina [Bruschi et al., 2006], compostos fenólicos, entre outros [Cardoso et al., 2005], além da falta de biodisponibilidade [Bruschi et al., 2006].

Assim, para que um composto com atividade antimicrobiana exerça sua atividade sobre microrganismos em biofilmes é necessário que o mesmo seja empregado em concentrações elevadas, o que poderia produzir reações adversas nos pacientes, e que o composto permaneça por um período prolongado no interior da cavidade bucal, o que levaria a uma adaptação do biofilme com a seleção de microrganismos menos sensíveis [Guggenheim et al., 2004].

Nas últimas décadas, muito interesse vem sendo dispensado ao estudo do efeito de compostos naturais, disponíveis ou não na dieta, sobre infecções endógenas humanas [Leitão et al., 2004; Takarada et al., 2004], particularmente sobre o biofilme bucal e seus impactos na ecologia microbiana [Morgan et al., 2001; Ozaki et al., 2006]. Dentre os extratos naturais que tiveram sua atividade inibitória estudada destacam-se o chá-verde

japones [Otake et al., 1991; Gaetti-Jardim Jr et al., *in press*], própolis [Leitão et al., 2004], café [Landucci et al., 2003], a goiaba [Razak et al., 2006; Prabu et al., 2006] além de mate e chá preto [Gaetti-Jardim Jr et al., *in press*].

No presente estudo, optou-se por avaliar os extratos de araçá e de aroeira do sertão diante dos resultados favoráveis obtidos em estudos “*in vitro*” realizados junto ao departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da FOA-UNESP [Bianco, 2004; Landucci, 2005], evidenciando que essas espécies eram capazes de reduzir significativamente a colonização de superfícies de vidro, bem como apresentavam notável atividade inibitória sobre cocos cariogênicos, além de outros microrganismos importantes na formação do biofilme microbiano.

Os extratos vegetais possuem uma composição muito complexa, a qual pode variar com a espécie testada, localização geográfica da planta utilizada (com suas peculiaridades edafo-botânicas), linhagem clonal da planta e até mesmo a estação do ano em que deu a coleta do espécime [Alves, 2001], o que limita a possibilidade de reproduzir os efeitos inibitórios e mesmo sobre adesão microbiana quando são comparados estudos realizados com amostras de plantas obtidas de outras localidades e estações do ano.

Assim, para permitir um mínimo de reprodutibilidade para o presente estudo e uma comparação dos resultados apresentados com a literatura pertinente, optou-se por repetir os ensaios com atividade antimicrobiana em todas as amostras de extrato. Desde que todas as amostras preparadas evidenciaram atividade inibitória comparável à descrita por Bianco [2004] e Landucci [2005], pôde-se atribuir parte dos efeitos biológicos observados nos modelos animais à composição dos extratos, as quais não tiveram sua atividade antimicrobiana afetada pelos aspectos acima citados.

No presente estudo, para os ensaios com animais experimentais, empregou-se a metodologia descrita por Keyes [1958](“a” e “b”), onde se constatou que os animais que recebiam uma dieta rica em sacarose (56 % de açúcar – dieta NIH 2000) desenvolviam lesões cáries clinicamente detectáveis, particularmente nos sulcos e fissuras dos molares, em função do ambiente favorável para a microbiota cariogênica. No presente estudo, a despeito das significativas alterações nos padrões de microdureza observada (Tabela 1), não se constatou a presença de microcavidades detectáveis, mesmo nos animais dessalivados. A despeito dessa ausência de lesões cavitadas de cárie clinicamente detectáveis, pôde-se

considerar que o desafio cariogênico descrito no presente estudo foi adequado, visto que a resposta do esmalte dental ao processo de desmineralização se inicia muito antes de uma cavidade se tornar clinicamente detectável e o presente estudo pôde observar essa “resposta” dental, como observado na tabela 1, bem como nos anexos G e I.

A utilização de modelos animais para avaliação de medidas preventivas da cárie dental ou para determinação de fatores interferentes é universalmente aceita [Keyes, 1958(a); Keyes, 1958(b); Peres et al., 2002; Ozaki et al., 2006], a despeito das limitações desse modelo de estudo, quer por aspectos de anatomia dental e do aparelho estomatognático, até por aspectos referentes à dieta e microbiota bucal.

Para padronização, mesmo que parcial, das características da microbiota cariogênica, nos ensaios realizados com os roedores, optou-se pela inoculação de duas cepas de referência de *S. mutans*, de reconhecida cariogenicidade [Leitão et al., 2004; Carvalho et al., 2006], mesmo diante da impossibilidade de se comparar o biofilme produzido por esses microrganismos no modelo murino com o observado em humanos. A despeito dessa limitação particular, Ooshima et al [1998] e Peres et al [2002] ressaltaram a importância de se inocular a cavidade oral dos animais que seriam submetidos a desafio cariogênico, como medida de padronização, como também realizado no presente estudo, sendo que, essa padronização objetiva criar os requisitos mínimos para a reprodutibilidade do experimento e comparações com dados disponíveis [Zero, 1995].

Quanto às vias de administração dos extratos vegetais, experimentos com extratos de plantas, disponibilizados na ração, demonstraram resultados inferiores aos administrados com soluções aquosas [Ooshima et al., 1998], de forma que, por esse aspecto, optou-se pela administração dos extratos testados em soluções aquosas no presente estudo. Contudo, não se pôde avaliar o consumo “*per capita*” desses extratos pelos animais e, como tais produtos apresentam palatabilidade muito diferente da água, não se pode afirmar com segurança que a quantidade de líquidos consumidos não poderia ter interferido nos resultados do presente estudo. Porém, como o consumo de água parece ter sido superior, qualquer interferência deve ter se dado no sentido de reduzir a significância das diferenças observadas entre os grupos testes (grupos I e II), que receberam os extratos, e o grupo controle, que recebeu água como solução de hidratação.

A literatura [Bowen et al., 1988; Peres et al., 2002] traz que a remoção das glândulas salivares maiores de ratos pode exacerbar o desafio cariogênico, com a subsequente formação de áreas de desmineralização e cavitação. No presente estudo, as diferenças observadas entre animais dessalivados e não operados não foram observadas nas comparações referentes à microdureza do esmalte (Tabela 1, Anexos G e I; $p = 0.000315$), mas sim na composição do biofilme, sendo que, entre os animais dessalivados, os microrganismos cariogênicos inoculados tiveram uma participação muito mais significativa na microbiota bucal ($p = 0,0001$), conforme o Gráfico 2, mesmo nos animais que receberam os extratos vegetais (Gráfico 3).

Stamford et al. [2005] salientaram a importância da saliva na prevenção à cárie através de seu efeito tampão e também pela remoção de microrganismos e restos alimentares da cavidade bucal, bem como Soriano et al [2002] verificaram a correlação entre os indicadores salivares de um indivíduo e sua experiência de cárie. Deste modo, reduções significativas do fluxo salivar e/ou alterações qualitativas na composição da saliva podem estar associadas a um maior risco à cárie (pela menor remoção de microrganismos e restos alimentares da cavidade oral), como observado em pacientes irradiados, idosos ou que fazem uso prolongado de determinados medicamentos [Castro et al., 2004; Baptista Neto e Sugaya, 2004].

Deve-se ressaltar, como o fizeram Tenuta et al [2003], que a desmineralização do esmalte dentário depende do tempo de exposição ao biofilme e está mais relacionada à composição do biofilme formado do que com os fatores salivares, o que pode ajudar a entender porque no presente estudo os efeitos da dessalivação se fizeram presentes sobre a microbiota e ainda não puderam ser estendidos à microdureza do esmalte.

Os Gráficos 1, 4 e 5 evidenciam que o uso dos extratos de araçá e de aroeira do sertão levou a uma redução significativa dos níveis de *S. mutans* na microbiota bucal dos grupos experimentais, ao longo do tempo, o que pode ter ocorrido pela atividade inibitória direta produzida pelos extratos, ou pela interferência no processo de colonização do biofilme microbiano bucal, em função dos efeitos dos extratos sobre a adesão microbiana, “in vitro”, como observado por Bianco [2004] e Landucci [2005], o que parece mais provável, visto que a alteração dos fenômenos de aderência pode ser obtida em concentrações muito inferiores às concentrações necessárias para inibir o crescimento

bacteriano planctônico e, particularmente, no biofilme [Okamoto et al., 2002]. A própria redução da produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis, como o dextrano, fenômeno já observado por Wu-Yuan et al. [1988] com as galotananinas, pode ter colaborado para a redução desses microrganismos na microbiota bucal.

Fenômenos semelhantes puderam ser observados com outros compostos como a clorexidina [Okamoto et al., 2002] e provavelmente devem estar atuando nos modelos animais estudados.

Nesse particular, Otake et al [1991], Daglia et al [1998] e Bianco [2004] sugerem que antimicrobianos naturais capazes de reduzir a formação do biofilme e com atividade anticárie parecem agir principalmente na síntese dos polissacarídeos extracelulares. Nessa mesma linha, Kashket et al [1985](a), Kashket et al [1985](b) e Otake et al [1991] verificaram que o ácido tânico, encontrado em vários tipos de plantas, mostrou-se um importante inibidor de crescimento bacteriano e da ação da enzima glicosiltransferase, além de formar um complexo estável com proteínas ricas em prolina presentes na saliva [Hagerman e Butler, 1981], as quais estão diretamente envolvidas com a adsorção de bactérias bucais à película adquirida, iniciando a adesão dos colonizadores iniciais do biofilme microbiano bucal, como *S. mutans*.

Em contraposição, Kashket et al [1985](“a” e “b”) constataram que os extratos de cacau e de café não perderam sua habilidade inibitória mesmo após a retirada do ácido tânico presente em sua composição. Esse fato demonstra a possível existência de outros componentes em extratos naturais eficazes no combate à atividade da microbiota bucal cariogênica. Em uma linha semelhante, Ooshima et al [1993] e Daglia et al [2002] sugerem que alguns extratos de plantas poderiam inibir a adesão microbiana modificando também as adesinas bacterianas, o que dificultaria o reconhecimento entre essas estruturas protéicas e aqueles receptores presentes na película adquirida, uma vez que esse processo apresenta notável especificidade [Angelini et al., 2006]. Os extratos vegetais também poderiam competir com as adesinas pela ligação aos receptores do hospedeiro, ou mesmo terem afinidade recíproca, uma vez que parte das adesinas bacterianas se comporta como lectinas (as quais possuem afinidade por receptores que contenham carboidratos na sua estrutura), de forma que glicoproteínas do extrato poderiam ter o efeito acima mencionado [Daglia et al., 2002; Matsumoto et al., 2004].

De acordo com a literatura [Ooshima et al., 1993; Hamilton-Miller, 1995; Leitão et al., 2004; Matsumoto et al., 2004; Gonçalves et al., 2005], compostos fenólicos poderiam levar à precipitação de proteínas e inibir o crescimento bacteriano em concentrações similares àsquelas encontradas em bebidas [Hamilton-Miller, 1995]. Alguns extratos vegetais também parecem capazes de inibir microrganismos bucais não relacionados com os estreptococos, como periodontopatógenos Gram negativos [Iauk et al., 2003; Bakri e Douglas, 2005; Iwaki et al., 2006]. Infelizmente, o princípio ativo ainda precisa ser caracterizado.

Já Ikigai et al [1993] evidenciaram que a epigallocatequina, um dos compostos fenólicos presentes no chá, podia levar à perfuração da membrana citoplasmática, o que explica a maior sensibilidade das bactérias Gram-negativas, como *Fusobacterium nucleatum*. Esses compostos fenólicos (polifenóis, flavonóis, epicatequina, epigallocatequina) ainda são capazes de inibir bactérias Gram-positivas [El-Gammal e Mansour, 1986].

O estudo dos efeitos desses princípios ativos sobre o metabolismo microbiano é dificultado pela falta de um conhecimento mais profundo sobre a estrutura química e atividade biológica dos mesmos [Daglia et al., 1998]. Esse fato se mostra verdadeiro até para plantas como a *Camellia sinensis* e *Coffea arabica*, já bem estudados, e que fazem parte da dieta humana [Landucci et al., 2003].

Contudo, como os colutórios geralmente permanecem por pequenos períodos de tempo na cavidade bucal em concentrações inibitórias é de relevância avaliar a cinética da atividade antimicrobiana desses extratos, visto que resíduos desses compostos podem permanecer tempo suficiente na cavidade bucal para interferir com o processo de formação do biofilme, ou interferir com a expressão da virulência microbiana em concentrações sub-inibitórias (Gaetti-Jardim Jr et al., 2004).

Muito embora Bianco [2004] relate que esses extratos não tenham interferido, aparentemente, no processo de desmineralização/remineralização do esmalte dentário, os resultados do presente estudo sugerem que o consumo dos extratos de araçá e aroeira do sertão parecem ter afetado positivamente a microdureza superficial do esmalte (Tabela 1, Anexos G e I), a qual mostrou-se mais elevada nos animais que os receberam, em todas as profundidades do esmalte avaliadas.

As diferenças entre os resultados da Tabela 1 com aqueles obtidos por Bianco podem estar ligados às diferenças metodológicas, sendo que o modelo animal utilizado no presente estudo mostrou-se mais adequado quando comparado com os ensaios “in vitro” anteriormente utilizados. Bianco sugere que a ausência de película adquirida sobre os fragmentos de esmalte poderiam ter reduzido a colonização dos mesmos pelas cepas de referência testadas, sendo que no presente ensaio, a presença do animal experimental garantiu uma colonização mais intensa da superfície de esmalte.

Deve-se ressaltar, também, que a utilização de modelos animais, mesmo com as limitações que um modelo murino pode impor, é superior a estudos realizados unicamente “in vitro”, desde que se os benefícios (ou a ausência dos mesmos) venham a ser detectados, principalmente em condições mais próximas do que ocorre com a cárie e outras patologias em humanos [Zero, 1995; Ozaki et al., 2006].

Podemos atribuir estes resultados superiores obtidos em relação à microdureza de esmalte dos dentes dos ratos que ingeriram os extratos de araçá e aroeira do sertão (Tabela 1, Anexos G e I) a diversos fatores, tais como a diminuição da população de *S. mutans* na cavidade oral desses animais (Gráficos 1, 4 e 5), através da inibição da capacidade de aderência bacteriana e da formação do biofilme, como sugerido por Matsumoto et al [2004] e Landucci [2005], ou, ainda, ser atribuído a uma possível capacidade desses extratos de reporem minerais à estrutura dental afetada pela atuação dos ácidos orgânicos bacterianos, como sugerido por Otake et al [1991] ao considerarem a possível presença de flúor e outras substâncias do gênero em alguns extratos de plantas. Outros autores sugerem, também, a possibilidade de alguns extratos vegetais com potencial anticariogênico atuarem alterando o metabolismo bacteriano, interferindo na produção dos ácidos orgânicos dos microrganismos cariogênicos [Leitão et al., 2004] e/ou alterando a ação ou produção de enzimas microbianas ligadas ao metabolismo do açúcar [Kashket et al., 1985(a); Kashket et al., 1985(b); Landucci et al., 2003; Leitão et al., 2004]. Desta forma, fica mais uma vez evidente a necessidade de uma análise dos compostos presentes em cada extrato.

Não se pode esquecer a relevância que a medicina popular apresenta para a descoberta de novas drogas, sendo que caju nativo vem sendo empregado como analgésico para odontalgias e como antiinflamatório, a aroeira teria propriedades cicatrizantes e analgésicas (além das avaliadas no presente estudo), o pequi é considerado adequado para o

tratamento de resfriados, tosse e queimaduras, enquanto a candeia teria atividade anti-esquistossomática e os ipês teriam indicação no tratamento de rouquidão e seriam diuréticos. O jacarandá caroba teria atividade anti-sifilítica e anti-reumática, enquanto o capitão do campo seria útil no tratamento e controle da estomatite aftosa e o angico poderia colaborar no tratamento da bronquite. A arnica seria usada em casos de inflamações e contusões, o picão seria eficaz no tratamento de diabetes e icterícia, já a carqueja seria usada em problemas de fígado e/ou digestivos, a calêndula teria propriedades de cicatrização externa e o capim-limão seria útil contra a osteoporose, assim como um bom calmante e digestivo [Souza e Felfili, 2006]. Entretanto nenhum estudo encontrado procurou verificar se, de fato, essas indicações estavam baseadas em princípios com comprovada eficácia terapêutica.

Os resultados obtidos com os extratos de araquê e de aroeira do sertão voltam a sugerir, agora em modelos animais, aspectos relevantes para um possível uso na prevenção à cárie, como também observado por Bianco [2004] e Landucci [2005], em estudos “*in vitro*”. Dentre essas características que poderiam vir a estimular seu emprego futuro, temos a simplicidade de extração dos princípios ativos, uma vez que água foi empregada como líquido extrator, sem prejuízo para a atividade antimicrobiana e, possivelmente, de outros aspectos biológicos, atividade mesmo em maiores diluições, rápida atividade inibitória, assim como a interferência na capacidade de aderência do microrganismo à superfície de esmalte. Esses efeitos, quando associados, poderiam explicar a significativa supressão da microbiota cariogênica observada em todos os grupos experimentais que receberam os extratos vegetais (Gráficos 1, 4 e 5).

Desta forma, diante do exposto, verifica-se a necessidade de uma caracterização aprofundada (embora muito acelerada) dos extratos de aroeira e araquê como possível fonte de compostos que venham a ser utilizados para o controle do biofilme bucal e mesmo em outras áreas, visto que os biofilmes microbianos são fonte de graves problemas infecciosos em diversos ambientes, como os hospitais. Acrescentando-se que não foram observados efeitos deletérios significativos sobre os tecidos dos animais que os consumiram. Nesse sentido, temos que frisar que a busca e caracterização de novos fármacos esbarra, em países em desenvolvimento (ou em subdesenvolvimento), no problema da biopirataria e, enquanto, em nosso país, estrangeiros e brasileiros carregados ilegalmente de espécimes

biólogos escapam através de portos e aeroportos, os pesquisadores nacionais, que publicam seus resultados como forma de disponibilizar uma informação para empregos futuros livres de pagamento de direitos de exploração, esbarram em aspectos burocráticos de todo tipo. Não nos será inesperado se dentro de algum tempo, os extratos e princípios citados acima tenham sido patenteados por algum grande laboratório internacional ou nacional.

No presente estudo se verificou que o modelo animal e as condições experimentais se mostraram adequadas para a caracterização dos efeitos dos extratos testados sobre a microdureza do esmalte e sobre a microbiota cariogênica, sendo que os dois extratos testados produziram uma redução substancial da microbiota cariogênica nos animais experimentais e o consumo dos mesmos afetou positivamente a microdureza superficial do esmalte, enquanto a dessalivação dos animais alterou significativamente os resultados da microbiota oral e o consumo prolongado dos extratos na hidratação não alterou significativamente os órgãos dos animais, quando comparado com os grupos controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves HM: A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola 2001;3:11-15.
2. Angelini M, Silveira WD, Campos TA, Cai S, Castro AFP: Caracterização biológica e molecular de linhagens de *Streptococcus crista* isoladas do biofilme dental de seres humanos através de iniciadores arbitrários- PCR (AP – PCR). Braz J Microbiol 2006;37:119-126.
3. Bakri I M, Douglas CWI: Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Arch. Oral Biol. 2005;50:645-651.
4. Baptista Neto C, Sugaya NN: Tratamento da xerostomia em pacientes irradiados na região da cabeça e do pescoço. Rev. Biociên. 2004;10:147-51.
5. Bianco, KG: Inhibitory activities of plant extracts from Brazilian savannah on mutans streptococci. 2004. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)- Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba. **‘resultados não publicados’**
6. Bowen W, Madison KM, Young DA: The effect of desalivation on coronal and root surface caries in rats. J. Dent. Res. 1988;67:21-3.

7. Bruschi ML, Panzeri H, Freitas O, Lara EHG, Gremião MPD: Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. *Rev Bras Cienc Farm* 2006;42:29-47.
8. Cardoso CL, Prado RF, Taveira LAA: Estudo macro e microscópico da resposta tecidual frente ao uso de anti-sépticos bucais e sua influência na carcinogênese. *J Appl Oral Sci* 2005;13:286-290.
9. Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP: Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch of Oral Biol* DOI: 10.1016/j.archoralbio.2006. 06.001.
10. Castro SAFN, Hartmann ACVC, Santos AC: Medicamentos associados à xerostomia e a distúrbios das funções orofaciais em idosos. *Rev Fonoaudiol Brasil* 2004;5:1-3.
11. Daglia M, Papetti A, Dacarro C, Gazzani G: Isolation of antibacterial component from roasted coffee. *J Pharm Biomed Anal* 1998;18:219-225.
12. Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzani G: Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem* 2002;50:1225-1229.
13. El-Gammal AA, Mansour RMA: Antimicrobial activity of some flavonoid compounds. *Z Mikrobiol* 1986;14:561-565.
14. Featherstone JDB: The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000;131:887-899.
15. Filoche SK, Soma K, Sissons CH: Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:221–225.
16. Gaetti-Jardim Jr. E, Landucci LF, Barioni SP, Pedrini D: Influência do preparo biomecânico sobre a microbiota anfibiônica presente no interior de canais radiculares de dentes com polpa necrótica. *Cienc Odontol Bras* 2004;7:83-91.
17. Gaetti-Jardim Jr. E, Habe HA: Inhibitory activity of plant extracts on *Fusobacterium nucleatum* and their adherence to host's cells. *Cienc Odontol Bras* **(aceito para publicação em 2006)**.

18. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J: A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973;18:1357-1364.
19. Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H: Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq Inst Biol 2005;72:353-358.
20. Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T: Application of the Zürich Biofilm Model to Problems of Cariology. Caries Res 2004;38:212-222.
21. Gushi LL, Soares MC, Forni TIB, Vieira V, Wada RS, Sousa MLR: Cárie dentária em adolescentes de 15 a 19 anos de idade no estado de São Paulo, Brasil, 2002. Cad Saúde Pública 2005;21:1383-1391.
22. Hagerman AE, Butler LG: The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. J Biol Chem 1981;256:4494-4497.
23. Hamada S, Ooshima T, Torii M, Imanishi H, Masuda N, Sobue S, Kotani S: Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese children. Microbiol Immunol 1978;22:301-314.
24. Hamilton-Miller JMT: Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). Antimicrob. Agents. Chemother 1995;39:2375-2377.
25. Hodgson RJ, Lynch RJM, Watson GK, Labarbe R, Treolar R, Allison C: A continuous culture biofilm model of cariogenic responses. J Appl Microbiol 2001;90: 440-448.
26. Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G: Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. Phytotherapy Research 2003;17:599-604.
27. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T: Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim Biophys Acta 1993;1147:132-136.
28. Iwaki K, Koya-Miyata S, Kohno K, Ushio S, Fukuda S: Antimicrobial activity of *Polygonum tinctorium* Lour: extract against oral pathogenic bacteria. J. Nat. Med 2006;60:121-125.

29. Kashket S, Paolino VJ, Lewis D, Van Houte J: Glucosyltransferase inhibition by tannin-like constituents of beverages. *J Dent Res* 1985;64:212.(a)
30. Kashket S, Paolino VJ, Lewis D, Van Houte J: In vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by commons beverages and food extracts. *Arch Oral Biol* 1985;30:821-826.(b)
31. Keyes PH: Dental caries in the molar teeth of rats- I. Distribution of lesions induced by high-carbohydrate low-fat diets. *J D Res* 1958;37:1077-1087.(a)
32. Keyes PH: Dental caries in the molar teeth of rats- II. A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously. *J D Res* 1958;37:1088-1099.(b)
33. Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR: Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Molecular Microbiology* 2006;59:142-151.
34. Landucci LF, Brandão EHS, Koga-Ito CY, Jardim Júnior EG, Jorge AOC: Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. *Ciênc Odontol Bras* 2003;6:58-64.
35. Landucci LF: Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado brasileiro sobre microrganismos bucais. 2005. 104p. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal)- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, São José dos Campos. **‘resultados não publicados’**
36. Leitão DPS, Silva Filho AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC: Comparative Evaluation of *in-Vitro* Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1834-1839.
37. Marsh P D: Dental Plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38:204-211.
38. Martins RJ, Garbin CAS, Garbin AJI, Moimaz SAS, Saliba O: Declínio da cárie em um município da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, no período de 1998 a 2004. *Cad Saúde Pública* 2006;22:1035-1041.
39. Matsumoto M, Tsuji M, Okuda J, Sasaki H, Nakano K, Osawa K, Shimura S, Ooshima T: Inhibitory effects of cacao bean husk extract on plaque formation *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Oral Sci* 2004;112:249-252.

40. Morgan TD, Beezer AE, Mitchell JC, Bunch AW: A microcalorimetric comparison of the anti-*Streptococcus mutans* efficacy of plant extracts and antimicrobial agents in oral hygiene formulations. *Journal of Applied Microbiology* 2001;90:53-58.
41. Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF: Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica* 2006;19:385-393.
42. National Commitee for Clinical Laboratory Standard. Reference agar dilution procedure for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria approved standard, M-11 A. National Commitee for Clinical Laboratory Standard, Villanova, Pa., 1995.
43. Okamoto AC, Gaetti-Jardim Jr E, Arana-Chavez VE, Ávila-Campos MJ: Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002;33:178-184.
44. Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S: Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res* 1993;27:124-129.
45. Ooshima T, Minami T, Matsumoto M, Fujiwara T, Sobue S, Hamada S: Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res* 1998;32:75-80.
46. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumoto M: Cariostatic activity of cacao mass extract. *Arch Oral Biol.* 2000;45:805-808.(a)
47. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura M, Sobue S, Matsumoto M: Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments. *Arch Oral Biol* 2000;45:639-645.(b)
48. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M: Anticaries effects of polyphenolic compounds from japanese green tea. *Caries Res* 1991;25:438-443.
49. Ozaki F, Pannuti CM, Imbronito AV, Pessotti W, Saraiva L, Freitas NM, Ferrari G, Cabral VN: Eficácia de um dentifrício fitoterápico em pacientes com gengivite estabelecida- ensaio clínico aleatório. *Braz Oral Res* 2006;20:172-177.

50. Peres RCR, Coppi LC, Franco EM, Volpato MC, Groppo FC, Rosalen PL: Cariogenicity of different types of milk: an experimental study using animal model. *Braz Dent J* 2002;13: 27-32.
51. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S: Guaijaverin-a plant flavonoid a potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol* 2006;101:487.
52. Razak FA, Othman RY, Rahim ZHA: The effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *J Oral Sci* 2006;48:71-5.
53. Soriano G, Doño R, Piovano S, Macucho M, Tognaccioli L, Garcia M: Relación entre los estúdios salivares y estado dentário em ninas. *Bol Asoc Argent Odontol Niños* 2002;31:19-23.
54. Souza CD, Felfili JM: Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras* 2006;20:135-142.
55. Stamford TCM, Pereira DMS, Alcântara LC, Couto GBL: Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes sadios. *Rev Bras Saúde Mater Infant* 2005;5:71-76.
56. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Homma K, Okuda K, Kato T: A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:61-64.
57. Tenuta LMA, Lima JEO, Cardoso CL, Tabchoury CPM, Cury JA: Efeito do acúmulo de placa e de fatores salivares na desmineralização do esmalte e composição da placa dental *in situ*. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:326-331.
58. Wu-Yuan C D, Chen C Y, Wu R T: Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. *J Dent Res* 1988;67:51-55.
59. Yu D, Pearson SK, Bowen WH, Luo D, Kohut BE, Harper DS: Caries inhibition efficacy of an antiplaque /antigingivitis dentifrice. *Am J Dent* 2000;13:14C-17C.
60. Zero DT: In situ caries models. *Adv Dent Res* 1995;9:214-30.

6. ANEXOS

Anexo A – Tabelas de contagens de colônias dos ratos não-operados.

Anexo A.1 - Primeira coleta (07 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	102	53	102	149	153	109
R2	201	29	112	92	174	264
R3	91	228	92	191	157	312
R4	82	130	254	81	41	109
R5	111	104	134	137	173	59

Anexo A.2 - Segunda coleta (18 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	151	124	35	83	103	149
R2	232	82	97	64	97	104
R3	488	86	105	56	129	188
R4	328	121	65	102	32	136
R5	283	163	86	93	68	117

Anexo A.3 - Terceira coleta (25 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	345	196	48	71	124	123
R2	302	177	108	133	83	63
R3	472	351	102	69	38	109
R4	390	143	97	39	178	132
R5	331	198	101	136	80	93

Anexo A.4 - Quarta coleta (32 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	340	109	56	57	77	98
R2	286	161	167	73	113	57
R3	400	201	148	31	43	137
R4	372	132	132	30	89	106
R5	291	196	93	48	54	109

Anexo A.5 - Quinta coleta (39 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	252	197	36	32	54	77
R2	143	129	151	60	85	41
R3	207	231	99	26	31	81
R4	202	128	96	37	66	94
R5	415	135	75	42	37	62

Anexo A.6 - Sexta coleta (46 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	81	209	32	30	44	36
R2	140	127	73	23	62	21
R3	184	236	36	12	29	57
R4	133	146	42	06	51	49
R5	214	138	48	21	38	24

Anexo A.7 - Sétima coleta (53 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	291	201	38	16	23	21
R2	203	163	31	28	47	26
R3	226	229	18	24	14	13
R4	301	217	33	12	28	20
R5	263	123	44	13	25	31

Anexo B – Tabelas de contagens de colônias dos ratos dessalivados**Anexo B.1 - Primeira coleta (07 dias após inoculação) --- (-1):**

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	10	10	70	40	104	30
R2	530	919	10	97	217	753
R3	190	411	230	139	74	120
R4	100	70	560	173	193	152
R5	70	1420	392	410	110	130

Anexo B.2 - Segunda coleta (18 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	110	120	130	10	50	20
R2	110	80	80	290	20	40
R3	100	70	10	30	20	70
R4	111	370	20	70	112	20
R5	112	1380	80	30	80	120

Anexo B.3 - Terceira coleta (25 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	1090	1170	10	60	70	178
R2	510	70	173	590	112	100
R3	1590	1590	280	450	520	740
R4	1230	1330	129	170	376	610
R5	3050	2050	940	560	109	800

Anexo B.4 - Quarta coleta (32 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	120	100	20	20	00	120
R2	30	200	20	30	20	60
R3	600	30	00	20	30	00
R4	440	100	30	120	30	30
R5	30	80	450	290	00	80

Anexo B.5 - Quinta coleta (39 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	224	104	189	249	341	132
R2	546	148	269	463	181	268
R3	555	100	67	69	281	144
R4	382	170	44	584	125	540
R5	MORTO	824	213	47	129	123

Anexo B.6 - Sexta coleta (46 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	244	151	237	234	10	60
R2	513	423	62	235	100	10
R3	258	97	63	114	74	189
R4	382	281	185	56	33	21
R5	MORTO	454	81	132	72	71

Anexo B.7 - Sétima coleta (53 dias após inoculação) --- (-1):

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	237	464	211	66	03	28
R2	675	527	08	21	20	12
R3	224	430	52	03	04	0
R4	393	291	115	21	09	16
R5	MORTO	295	03	01	05	25

Anexo C - Peso dos órgãos dos animais da amostra.**Anexo C.1 - Água :**

Órgão	R1	R2
cérebro	2,5g	2,2g
pulmões	2,7g	1,8g
rins	2,3g	2,6g
baço	0,8g	0,6g
fígado	14,3g	15,1g
coração	1,6g	1,2g

Anexo C.2 - Araçá:

Órgão	R1	R2
cérebro	2,3g	2,6g
pulmões	2,8g	3,3g
rins	3,9g	3,4g
baço	0,9g	0,8g
fígado	24,8g	23,5g
coração	1,6g	1,8g

Anexo C.3 - Aroeira:

Órgão	R1	R2
cérebro	2,2g	2,2g
pulmões	2,8g	2,5g
rins	3,4g	2,7g
baço	0,5g	0,8g
fígado	20,5g	16,4g
coração	1,4g	1,2g

Anexo D – Peso corporal dos animais não operados.

Anexo D.1 – Início:

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	401g	275g	311g	328g	325g	270g
R2	387,5g	306g	289g	306g	302g	315g
R3	410g	306g	300g	309g	328g	314,5g
R4	433g	293g	312g	406,5g	304g	332g
R5	395g	271g	321g	375g	330g	309g

Anexo D.2 – Final:

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	444g	349g	406g	408g	385g	342g
R2	416g	362g	384g	421g	377g	377g
R3	431g	393g	367g	392g	408g	402g
R4	489g	373g	395g	534g	431g	449g
R5	434g	317g	396g	469g	411g	366g

Anexo E – Peso corporal dos animais dessalivados.

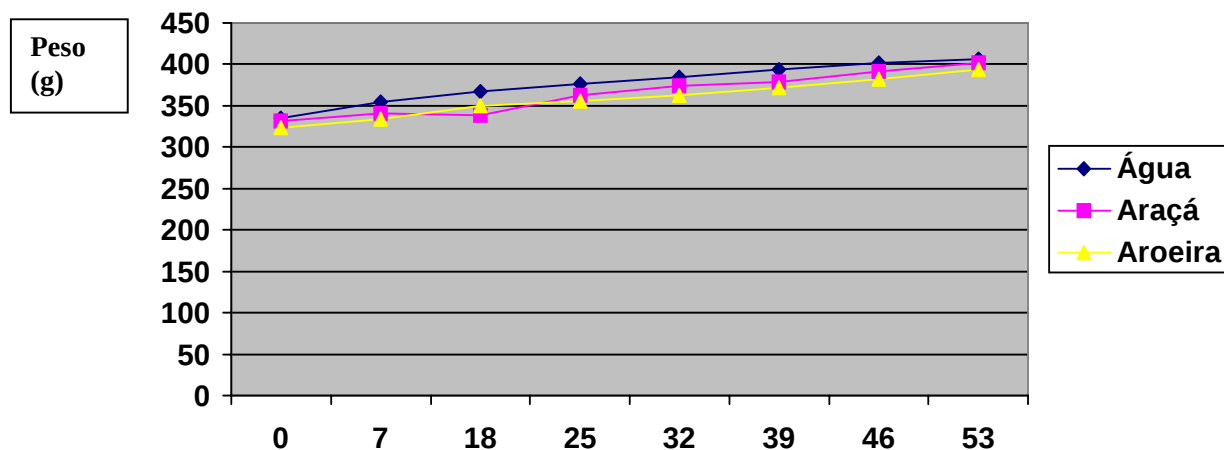
Anexo E.1 – Início:

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	379g	370g	378g	324,5g	353g	328g
R2	359g	375g	275g	348g	309g	288g
R3	365g	338g	329g	360g	353,5g	321g
R4	334g	336,5g	359,5g	317g	320g	372g
R5	362g	332g	323g	353g	338,5g	354g

Anexo E.2 – Final:

	água	água	araçá	araçá	aroeira	aroeira
R1	455,5g	425g	410g	341g	361g	361g
R2	392g	431g	317g	414g	353g	365g
R3	400,5g	417g	403g	395g	371g	360g
R4	380g	400g	409g	348g	350g	394g
R5	MORTO	416g	415g	418g	416g	388g

Anexo F – Gráfico expressando a variação de peso corporal dos animais ao longo das coletas realizadas.



Anexo G – Resultados brutos da microdureza de esmalte.

Anexo G.1 – Água Dessalivados – Incisivos.

R1	300	313	319	325	292	317	323	331
R1	307	319	323	331	304	313	321	333
R2	304	313	321	335	311	325	328	333
R2	300	311	323	337	309	321	325	335
R3	304	313	328	335	309	319	323	331
R3	307	315	319	323	307	319	323	326
R4	306	313	321	328	307	315	321	331
R4	300	317	323	331	309	319	328	333
R5		MORTO						
R5								
R6	304	311	323	328	309	313	321	331
R6	300	313	323	331	307	315	326	333
R7	299	313	326	331	309	315	325	335
R7	304	315	321	333	300	313	324	331
R8	293	307	315	323	299	306	313	323
R8	300	305	313	327	304	309	317	328
R9	297	300	307	323	307	317	321	328
R9	299	304	319	328	301	311	319	331
R10	300	309	313	321	299	309	319	326
R10	301	311	317	325	300	315	321	331

Anexo G.2 – Água Dessalivados – Molares.

R1	304	315	325	328	309	317	323	333
R1	302	311	319	326	300	311	321	328
R2	293	313	321	331	302	315	323	328
R2	300	309	317	328	299	311	319	331
R3	307	311	319	326	297	307	317	331
R3	304	313	321	328	300	309	315	323
R4	306	311	321	333	293	309	321	328
R4	302	317	323	331	304	315	325	333
R5	MORTO							
R5								
R6	304	315	323	335	302	311	321	333
R6	300	309	319	328	309	317	325	331
R7	307	315	321	333	304	319	323	335
R7	306	317	323	331	300	313	325	331
R8	302	311	323	331	302	313	321	327
R8	299	307	319	328	307	315	323	335
R9	306	315	323	339	300	313	325	335
R9	304	311	321	333	302	313	321	331
R10	307	315	321	335	304	315	321	328
R10	304	313	319	328	302	311	319	326

Anexo G.3– Araçá Dessalivados – Incisivos.

R1	347	361	370	385	347	359	368	380
R1	350	363	370	383	345	359	368	377
R2	352	359	368	378	350	361	370	378
R2	349	361	370	380	352	363	373	380
R3	347	354	366	373	339	343	354	373
R3	337	343	352	368	339	345	354	366
R4	352	361	368	378	343	356	368	378
R4	347	359	366	375	350	363	368	380
R5	345	356	368	378	347	361	373	383
R5	343	363	370	383	341	359	371	380
R6	345	359	366	378	341	359	370	378
R6	349	361	369	376	345	356	368	380
R7	347	359	368	385	352	366	373	383
R7	349	361	370	378	350	359	370	380
R8	350	363	370	380	347	363	373	380
R8	347	359	368	378	352	361	371	383
R9	352	361	375	388	339	356	368	373
R9	345	359	368	373	350	361	368	378
R10	347	356	368	378	345	352	368	375
R10	345	359	373	383	347	354	370	380

Anexo G.4 – Araçá Dessalivados – Molares.

R1	347	359	370	378	350	361	368	376
R1	345	357	366	378	347	359	370	383
R2	345	361	370	378	352	359	367	380
R2	350	359	368	375	347	356	370	373
R3	350	363	370	380	343	354	366	373
R3	352	359	368	375	347	361	373	378
R4	347	359	366	373	343	363	370	378
R4	345	361	368	375	347	356	368	380
R5	352	361	373	375	343	361	370	380
R5	347	354	366	373	341	356	368	378
R6	352	361	370	375	352	363	373	385
R6	350	359	368	375	347	359	370	380
R7	341	356	368	375	350	359	373	385
R7	347	363	370	378	343	356	366	375
R8	347	356	368	383	343	359	370	380
R8	350	359	370	378	341	354	366	375
R9	341	356	370	383	347	359	370	380
R9	345	361	368	373	352	363	373	378
R10	347	361	373	385	345	361	370	383
R10	345	363	370	380	350	359	373	385

Anexo G.5 – Aroeira Dessalivados – Incisivos

R1	341	350	359	373	345	356	363	378
R1	331	347	354	370	333	343	359	370
R2	345	354	361	378	341	350	359	368
R2	343	354	370	380	343	356	368	378
R3	345	361	366	378	343	359	366	378
R3	347	359	370	380	349	361	370	383
R4	350	359	363	378	345	354	366	375
R4	350	356	363	375	343	352	368	383
R5	352	361	368	380	343	354	363	378
R5	347	354	365	378	345	356	366	375
R6	345	356	370	378	350	361	368	383
R6	350	361	373	381	352	363	370	383
R7	347	361	370	378	352	361	373	388
R7	350	364	370	383	345	363	368	375
R8	347	361	373	381	343	359	370	385
R8	350	359	370	378	352	363	371	380
R9	350	363	370	380	347	359	370	383
R9	352	361	375	378	345	357	373	383
R10	347	359	366	385	352	363	370	388
R10	343	355	363	379	345	359	370	383

Anexo G.6 – Aroeira Dessalivados – Molares

R1	347	359	366	380	350	363	368	375
R1	347	357	370	380	352	361	370	378
R2	352	363	373	380	354	363	371	383
R2	352	361	366	373	350	359	368	375
R3	343	361	370	383	350	363	371	378
R3	347	359	368	380	352	361	370	375
R4	352	359	373	380	350	361	368	375
R4	354	363	370	383	345	357	370	378
R5	350	366	368	385	345	359	368	378
R5	347	359	368	383	352	361	370	380
R6	347	363	370	383	350	357	366	377
R6	345	359	368	375	350	361	370	385
R7	345	359	368	380	343	357	366	383
R7	347	363	368	378	341	361	366	375
R8	347	359	363	378	352	363	368	380
R8	343	356	366	375	354	361	370	383
R9	345	359	368	375	350	359	366	378
R9	341	356	368	375	352	361	370	378
R10	352	363	370	380	350	361	368	376
R10	347	361	366	383	343	357	366	375

Anexo G.7 – Água Não-Operados – Incisivos

R1	297	307	319	328	300	315	326	335
R1	300	311	319	328	304	315	321	331
R2	311	319	321	331	301	313	319	327
R2	304	315	323	328	306	313	327	331
R3	307	315	323	331	313	321	328	337
R3	288	297	311	328	277	292	325	331
R4	297	304	313	323	304	321	328	333
R4	300	309	319	331	309	317	321	333
R5	307	313	321	328	293	309	321	328
R5	309	315	323	331	305	311	319	331
R6	306	313	319	325	307	317	321	325
R6	237	246	311	323	295	306	319	331
R7	304	313	321	331	309	319	326	333
R7	309	317	325	333	311	315	323	335
R8	311	317	321	331	309	317	325	337
R8	313	317	325	333	265	299	306	315
R9	315	319	323	331	299	307	319	331
R9	309	315	321	328	300	317	321	333
R10	229	254	292	304	293	317	325	331
R10	292	313	326	331	307	315	326	333

Anexo G.8 – Água Não-Operados – Molares.

R1	297	311	326	333	307	313	321	331
R1	299	309	317	328	302	311	323	328
R2	304	315	321	328	293	307	319	323
R2	300	309	317	333	307	319	326	335
R3	309	317	323	335	302	309	319	333
R3	300	313	319	328	306	313	326	335
R4	299	315	323	331	306	317	321	335
R4	300	311	325	333	307	315	319	328
R5	293	304	311	323	302	317	321	326
R5	300	309	315	325	304	313	319	331
R6	300	315	321	333	302	313	319	325
R6	297	309	317	325	304	315	323	328
R7	304	317	323	328	304	315	319	326
R7	299	311	321	333	307	313	321	335
R8	299	313	319	328	300	311	319	328
R8	302	315	323	333	304	309	319	326
R9	297	307	317	328	304	313	319	326
R9	300	309	319	328	302	311	317	325
R10	304	313	323	333	302	311	323	328
R10	302	315	321	331	300	309	321	327

Anexo G.9 – Araçá Não-Operados – Incisivos.

R1	350	363	375	380	347	361	373	383
R1	352	361	375	383	356	361	375	383
R2	352	361	370	380	347	359	368	380
R2	350	363	375	380	350	361	373	383
R3	347	356	368	380	352	363	370	383
R3	351	367	373	381	345	353	369	378
R4	354	361	370	381	350	361	368	383
R4	347	363	373	378	352	359	370	380
R5	347	368	375	380	350	361	370	380
R5	352	363	370	378	352	365	371	383
R6	350	363	371	380	345	361	373	380
R6	352	361	370	383	349	357	369	379
R7	347	363	369	378	345	361	370	378
R7	350	363	370	383	352	361	373	380
R8	350	363	373	385	347	361	370	381
R8	352	365	371	380	350	363	373	380
R9	356	370	375	380	345	354	375	378
R9	359	366	378	380	359	361	363	373
R10	347	356	366	368	343	352	366	373
R10	350	359	361	373	347	356	370	375

Anexo G.10 – Araçá Não-Operados – Molares.

R1	347	361	366	380	352	366	370	380
R1	345	359	370	375	350	361	373	378
R2	343	366	370	383	345	361	366	375
R2	345	357	370	378	347	359	368	378
R3	345	354	368	378	347	361	373	378
R3	343	358	366	375	341	356	368	380
R4	343	359	370	378	350	359	366	377
R4	345	357	366	375	347	357	368	378
R5	354	361	366	375	350	361	373	380
R5	352	366	370	380	347	363	368	378
R6	352	361	370	380	347	361	368	380
R6	350	363	369	378	352	366	370	383
R7	352	363	370	383	347	361	370	385
R7	350	361	373	380	347	359	367	378
R8	352	363	373	383	347	359	370	380
R8	350	361	370	385	352	363	368	380
R9	343	356	370	380	347	361	373	383
R9	345	359	368	375	350	366	370	378
R10	347	359	368	380	343	354	366	375
R10	350	361	370	378	345	358	373	381

Anexo G.11 – Aroeira Não-Operados – Incisivos

R1	352	363	373	385	350	363	373	380
R1	349	361	370	378	343	361	370	383
R2	345	363	370	383	350	363	370	383
R2	350	361	368	380	347	361	375	381
R3	350	359	370	380	347	366	375	380
R3	352	361	370	383	349	361	373	381
R4	347	361	370	385	350	361	370	378
R4	350	359	373	380	352	363	375	381
R5	347	359	366	378	350	361	373	383
R5	349	361	370	381	347	363	378	380
R6	345	359	363	375	350	363	370	378
R6	350	361	369	378	347	358	366	375
R7	352	366	373	380	350	361	370	378
R7	354	363	373	380	349	357	369	377
R8	354	368	373	388	347	356	373	385
R8	350	366	371	380	352	361	370	383
R9	350	363	370	383	352	363	373	385
R9	349	359	368	375	350	357	369	378
R10	345	359	363	375	337	347	361	370
R10	350	356	363	373	337	341	356	368

Anexo G.12 – Aroeira Não-Operados – Molares

R1	347	356	368	380	347	361	368	375
R1	352	363	370	378	343	359	373	385
R2	352	366	370	385	345	361	370	383
R2	347	363	370	378	350	359	368	378
R3	352	366	370	378	345	361	370	378
R3	350	361	368	375	347	359	373	380
R4	350	361	373	378	349	359	368	380
R4	347	357	368	375	345	361	370	378
R5	347	356	368	380	343	361	368	378
R5	343	359	366	375	341	357	370	375
R6	341	359	366	375	347	361	366	378
R6	345	356	370	380	343	361	368	375
R7	350	359	368	380	352	363	373	381
R7	347	359	370	375	345	361	366	378
R8	345	359	368	375	352	361	368	380
R8	343	361	370	378	347	363	371	385
R9	350	359	368	375	347	359	366	378
R9	345	356	368	383	350	361	373	380
R10	343	357	366	378	347	361	368	385
R10	341	358	366	375	350	363	371	383

Anexo H- Valores originais da análise de variância – microbiota oral.**Anexo H.1- Valores originais gerais.**

Análise de variância: Valores originais					
Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
Entre Tempo (T)	4332223.5000	6	722037.2500	19.02	0.0000 %
Entre Extrato(E)	4503767.5000	2	2251883.7500	59.31	0.0000 %
Entre Saliva (S)	1803346.5000	1	1803346.5000	47.49	0.0001 %
Interação TxE	2676384.7500	12	223032.0625	5.87	0.0001 %
Interação SxT	3151185.5000	6	525197.5625	13.83	0.0000 %
Interação SxE	807187.7500	2	403593.8750	10.63	0.0127 %
Interaç.SxTxE	1799777.8750	12	149981.4844	3.95	0.0046 %
Resíduo	14352683.0000	378	37970.0625		
Variação total	33426556.0000	419			

Anexo H.2- Valores originais - fator extrato.

Médias amostrais calculadas: Valores originais				
Fator de variação: EXTRATO				
AGUA	:	332.92857	b	Valor crítico
ARACA	:	117.35714	a	de tukey
AROEIRA	:	109.37857	a	T = 55.17

Anexo H.3- Valores originais - fator saliva (cirurgia).

Médias amostrais calculadas: Valores originais			
Fator de variação: SALIVA			
N OP	:	121.02857	P= 0,0001%
DESSALIVADO	:	252.08095	

Anexo H.4- Médias amostrais calculadas: valores originais - saliva (cirurgia) X tempo.

Médias amostrais calculadas: Valores originais			
1. Fator de variação: SALIVA X TEMPO			
CONTROLE ÁGUA	:	206.37 b	Valor Crítico
CONTROLE ARAÇÁ	:	73.90 a	
CONTROLE AROEIRA	:	83.81 a	
DESSALIVADO ÁGUA	:	459.49 c	de Tykey
DESSALIVADO ARAÇÁ	:	161.81 ab	
DESSALIVADO AROEIRA	:	134.94 ab	
			T = 94,32

Anexo H.5- Médias amostrais calculadas: valores originais – extrato X tempo.

Médias amostrais calculadas: Valores originais			
1. Fator de variação: EXTRATO X TEMPO			
AGUA 7	:	243.05	Valor crítico
AGUA 18	:	231.05	
AGUA 25	:	829.25	
AGUA 32	:	210.90	
AGUA 39	:	271.55	
AGUA 46	:	236.10	
AGUA 53	:	308.60	
ARAÇÁ 7	:	173.25	
ARAÇÁ 18	:	76.80	
ARAÇÁ 25	:	213.30	
ARAÇÁ 32	:	91.75	de Tukey
ARAÇÁ 39	:	142.40	
ARAÇÁ 46	:	86.10	
ARAÇÁ 53	:	37.90	
AROEIRA 7	:	171.70	
AROEIRA 18	:	83.75	
AROEIRA 25	:	231.90	
AROEIRA 32	:	62.65	
AROEIRA 39	:	144.60	
AROEIRA 46	:	52.55	
AROEIRA 53	:	18.50	

Anexo I - Valores obtidos através da análise dos resultados de microdureza de esmalte.

Anexo I.1 - Média dos valores de microdureza de esmalte dos animais não operados.

Não Operados						
	Água		Araçá		Aroeira	
	incisivo	molar	incisivo	molar	incisivo	molar
1	316,0	316,0	367,4	364,6	365,9	364,1
2	318,1	316,0	365,8	363,2	365,6	365,3
3	314,0	317,9	364,8	361,9	366,1	364,6
4	316,4	317,8	365,6	362,2	365,9	363,7
5	316,5	313,3	366,6	365,3	365,4	361,7
6	306,3	315,4	365,2	365,6	362,9	361,9
7	320,3	317,3	365,2	365,4	365,8	364,2
8	315,1	315,5	366,5	366,0	367,3	364,1
9	318,0	313,9	367,0	364,0	365,3	363,6
10	305,5	316,4	360,1	363,0	356,3	363,3
	314,6	316,0	365,4	364,1	364,6	363,6
	4,9	1,5	2,0	1,5	3,1	1,1
ANOVA	a	a	b	b	b	b

Anexo I.2 - Média dos valores de microdureza de esmalte dos animais dessalivados.

Dessalivados						
	Água		Araçá		Aroeira	
	incisivo	molar	incisivo	molar	incisivo	molar
1	316,9	317,0	364,5	363,4	354,5	363,9
2	320,7	315,0	365,3	363,1	359,3	365,2
3	318,8	314,3	353,3	363,3	363,4	364,4
4	318,9	317,0	363,3	362,4	361,3	364,9
5	318,0	317,6	363,8	362,4	361,6	364,9
6	318,4	318,9	362,5	364,9	365,3	364,1
7	311,4	316,4	365,6	362,8	365,5	362,5
8	313,3	318,3	365,3	362,4	365,1	363,6
9	313,6	316,8	363,4	363,7	365,4	362,6
10	313,6	316,8	362,5	365,6	364,2	363,6
	316,3	316,8	362,9	363,4	362,5	364,0
	3,1	1,4	3,6	1,1	3,5	0,9
ANOVA	a	a	b	b	b	b

ANOVA
 p=0.02195 (tratxrato)
 p=0.0000001 (trat)
 gl=108 (6.8222)
 q=4.73
 vc=3.9 (12 médias)

Anexo I.3 – Porcentagem de volume mineral do esmalte dos dentes dos animais não operados.

Não Operados

	Água		Araçá		Aroeira	
	incisivo	molar	incisivo	molar	incisivo	molar
1	87,7	87,7	93,7	93,4	93,5	93,3
2	88,0	87,7	93,5	93,2	93,5	93,5
3	87,5	88,0	93,4	93,1	93,6	93,4
4	87,8	87,9	93,5	93,1	93,5	93,3
5	87,8	87,4	93,6	93,5	93,5	93,1
6	86,5	87,7	93,5	93,5	93,2	93,1
7	88,2	87,9	93,5	93,5	93,5	93,4
8	87,6	87,7	93,6	93,6	93,7	93,3
9	88,0	87,5	93,7	93,3	93,5	93,3
10	86,4	87,8	92,9	93,2	92,5	93,2
	87,6	87,7	93,5	93,3	93,4	93,3
	0,6	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1
ANOVA	a	a	b	b	b	b

Anexo I.4 – Porcentagem de volume mineral do esmalte dos dentes dos animais dessalivados.

Dessalivados

	Água		Araçá		Aroeira	
	incisivo	molar	incisivo	molar	incisivo	molar
1	87,8	87,9	93,4	93,3	92,2	93,3
2	88,3	87,6	93,5	93,2	92,8	93,5
3	88,1	87,5	92,1	93,2	93,3	93,4
4	88,1	87,8	93,2	93,2	93,0	93,4
5	88,0	87,9	93,3	93,1	93,1	93,4
6	88,0	88,1	93,2	93,4	93,5	93,3
7	87,2	87,8	93,5	93,2	93,5	93,2
8	87,4	88,0	93,5	93,2	93,5	93,3
9	87,4	87,8	93,3	93,3	93,5	93,2
10	87,8	87,8	93,2	93,5	93,3	93,3
	87,8	87,8	93,2	93,3	93,2	93,3
	0,4	0,2	0,4	0,1	0,4	0,1
ANOVA	a	a	b	b	b	b

ANOVA
p=0.000315
gl=108 (0.0963)

q=4.73
vc=0.46

Anexo J – Imagens.

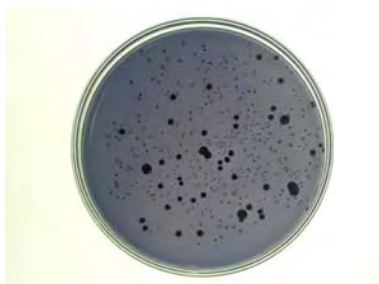
Anexo J.1 – Coleta de amostra de biofilme e saliva sendo realizada em um dos animais experimentais.



Anexo J.2 – Inoculação em ágar MSBS após diluições do material coletado da cavidade oral dos animais.



Anexo J.3 – Crescimento de *S. mutans* após o período de incubação em anaerobiose, em dessecadores de vidro, a 37° C, por 72 horas.



Anexo J.4 – Armazenamento dos blocos de resina com os dentes dos animais experimentais embutidos para a análise da microdureza longitudinal de esmalte.



Anexo J.5 – Momento da remoção das glândulas salivares submandibular e sublingual, durante a cirurgia em um dos animais que foram submetidos ao procedimento.



ANEXO J.6 – Araçá.

Anexo J.6 – Araçá.



Anexo J.7 – Aroeira.



Anexo J.8- Embutidora e Politriz (respectivamente).



Anexo J.9- Ultra-som.**Anexo J.10- Contador de colônias.****Anexo J.11- Microdurômetro.****Anexo K – Protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa):**

NÚMERO: 92/05 (ARAÇATUBA, 23 DE AGOSTO DE 2005), de acordo com o COBEA.

Anexo I – Análise histopatológica dos órgãos dos animais:

Foi realizada pela Professora Evanice Menezes Marçal, Universidade de Cuiabá-UNIC.

