

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE ZOOTECNIA

LARISSA SOBOLEWSKI MAGASSY BAPTISTA

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE BISCOITOS ASSADOS CONTENDO
BLEND DE EXTRATOS DE ROMÃ E PRÓPOLIS NA REDUÇÃO DE
CÁLCULO DENTÁRIO, NO MICROBIOMA E NA PREFERÊNCIA DE
CÃES**

FLORIANÓPOLIS – SC

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE ZOOTECNIA

LARISSA SOBOLEWSKI MAGASSY BAPTISTA

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE BISCOITOS ASSADOS CONTENDO
BLEND DE EXTRATOS DE ROMÃ E PRÓPOLIS NA REDUÇÃO DE
CÁLCULO DENTÁRIO, NO MICROBIOMA E NA PREFERÊNCIA DE
CÃES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para
obtenção do Diploma de Graduação em Zootecnia
da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Priscila de Oliveira Moraes

FLORIANÓPOLIS – SC

2019

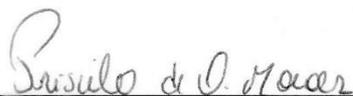
Larissa Sobolewski Magassy Baptista

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE BISCOITOS ASSADOS CONTENDO BLEND DE EXTRATOS DE ROMÃ E PRÓPOLIS NA REDUÇÃO DE CÁLCULO DENTÁRIO, NO MICROBIOMA E NA PREFERÊNCIA DE CÃES

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

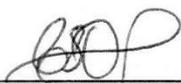
Florianópolis, 17 de junho de 2019

Banca Examinadora:

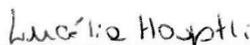


Prof.^a Dr.^a Priscila de Oliveira Moraes
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina



M.^a Caroline Fredrich Dourado Pinto
Doutoranda em Zootecnia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profa. Dra. Lucélia Hauptli
Universidade Federal de Santa Catarina

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Baptista, Larissa

Efeito da utilização de biscoitos assados contendo blend de extratos de romã e própolis na redução de cálculo dentário, no microbioma e na preferência de cães / Larissa Baptista ; orientadora, Priscila de Oliveira Moraes, 2019.
55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Bactéria. 3. Beagle. 4. Fitogênico .
5. Petisco. I. de Oliveira Moraes, Priscila. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Zootecnia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Ariadna S. M. Baptista e Ubaiar C. Baptista, que sempre estiveram do meu lado, incentivando e impulsionando na realização dos meus sonhos. Sem vocês eu não teria conseguido chegar onde eu cheguei.

Ao meu namorado Luca F. Campelli, que esteve do meu lado nos melhores e nos piores momentos, teve paciência quando nem mesmo eu tinha, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Obrigada pelo seu amor e compreensão.

Às minhas amigas, Priscila S. do Nascimento, Pamela Prestes Sezerotto, Mara Piasson agradeço pelo apoio, carinho, palavras de motivação, e por toda a ajuda.

Ao Curso de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina, seu corpo docente, e todos com quem tive convívio e que auxiliaram na minha formação profissional.

A minha orientadora, Priscila de Oliveira Moraes, agradeço pela paciência, atenção, suporte, compreensão, e principalmente pela confiança, que auxiliaram para que esse trabalho fosse feito. É um exemplo de pessoa e de profissional.

A equipe Petrock composta por Priscila de Oliveira Moraes, Lucélia Hauptli e Manoela Karolina Ribeiro Santos, por este trabalho maravilhoso. A realização deste projeto foi um grande salto tanto em minha vida profissional quanto pessoal. E demais alunos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada por toda ajuda e proatividade.

Ao professor Luciano Trevizan e equipe do Laboratório de Ensino Zootécnico – UFRGS, por me receberem de braços abertos, ajudarem e orientarem durante todo o período que estive na equipe.

Ao senhor Joan Torrent da empresa Oligo Basics pelo investimento na pesquisa.

E finalmente aos meus cães e cães do canil experimental da UFRGS por serem minha inspiração, alegria e me lembrarem todos os dias o porquê amo tanto esta profissão.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de biscoitos assados para cães contendo um blend de extratos de romã e própolis em comparação com hexametáfosfato de sódio na redução de área coberta por placa bacteriana ou cálculo dentário, no microbioma oral e na preferência. Foram realizados dois experimentos na cidade de Porto Alegre no Laboratório de Ensino Zootécnico – UFRGS com 12 cães da raça beagle, 6 machos e 6 fêmeas, com idade de 4 anos e peso entre 10-15kg. Em ambos os experimentos foram utilizados os seguintes tratamentos: biscoito controle (sem adição de aditivos), com 0,6% biscoito com hexametáfosfato de sódio e o biscoito com blend com 0,9% de extrato de romã e 0,9% de extrato de própolis. No período de 19 dias foi avaliada a redução de área coberta por cálculo dentário com ou sem escovação e o microbioma oral, antes e depois do fornecimento dos biscoitos. Um segundo experimento foi realizado para avaliar a preferência e o ranqueamento, com 2 dias de adaptação e 5 dias de avaliação. Os resultados obtidos para a redução de área coberta mostraram que cães que receberam os biscoitos com o blend apresentaram maior redução na área coberta por cálculo dentário quando comparado com o tratamento controle e o tratamento com hexametáfosfato foi intermediário ($p=0,049$). A utilização de escovação foi mais eficiente para a redução de área coberta no tratamento controle ($p=0,047$). A análise do microbioma oral mostrou que houve uma mudança no microbioma entre dias 0 e 19, sendo que no dia 0 ao início do experimento havia uma predominância de bactérias gram negativas e no 19º dia uma predominância de bactérias gram positivas. Para o teste de preferência e ranqueamento considerando a relação preferência vs tempo, temos que como primeira escolha os tratamentos blend e hexametáfosfato que não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$), entretanto diferindo-se do tratamento controle ($p=0,035$), para as demais colocações foram apresentados dados semelhantes. E o resultado do ranqueamento considerando os dados das escolhas dos cães foi: 1º lugar: blend, 2º lugar: hexametáfosfato de sódio e 3º lugar: controle. Os biscoitos com blend de extratos fitogênicos mostrou-se tão eficiente quanto o hexametáfosfato de sódio na redução de área coberta por cálculo dentário e melhorando o perfil do microbioma oral.

Palavras chave: bactéria, beagle, fitogênico, petisco, tártaro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista lateral arcada dentária canina.....	13
Figura 2 - Estrutura do dente.....	14
Figura 3 - Esquema sobre a transição do microbioma predominante de acordo com o estado de saúde oral.....	19
Figura 4 – Integração da área total e área acometida por cálculo dentário.....	28
Figura 5 - Escovas de dentes utilizadas.....	28
Figura 6 – Kits de Swabs.....	29
Figura 7 - Soluções estabilizantes.....	29
Figura 8 - Mini pet-ball adaptada.....	31
Figura 9 - Biscoito sendo disponível para cheirar.....	32
Figura 10 - Posicionamento do animal e dos brinquedos "kong's".....	32
Figura 11 - Dispersão de acordo com a presença de cálculo	34
Figura 12 – Área coberta por cálculo dentário nos dias 0 e 19.....	35
Figura 13 – Escore de acordo com Abdalla et al. (2000).	35
Figura 14 - Redução da área coberta por cálculo dentário após o final do experimento.....	36
Figura 15 - Redução da área coberta por cálculo dentário com ou sem escovação.....	36
Figura 16 - Microbioma (Filo) tratamento biscoito controle (sem aditivo).....	39
Figura 17 - Microbioma (Filo) tratamento biscoito com hexametáfosfato.....	39
Figura 18 - Microbioma (Filo) tratamento biscoito contendo blend.....	40
Figura 19 - Percentagem de bactérias gram negativas dias 0 e 19.....	40
Figura 20 - Percentagem de bactérias gram positivas dias 0 e 19.....	41
Figura 21 – Diversidade dos Filos dos microbiomas por tratamento.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica dos biscoitos.....	27
Tabela 2 - Resultado da interação da preferência dos cães em relação ao tempo médio de consumo dos biscoitos pelos cães.....	43
Tabela 3 - Ranqueamento dos tratamentos determinados pelos resultados da interação da preferência dos cães em relação ao tempo médio de consumo dos biscoitos pelos cães.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 ANATOMIA DENTÁRIA CANINA.....	13
3.2 DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES.....	15
3.2.1 Placa bacteriana.....	15
3.2.2 Consequências da placa bacteriana.....	16
3.2.3 Progressão de placa bacteriana para outras doenças periodontais...17	17
3.2.4 Microbioma canino.....	18
3.2.5 Prevenção.....	20
3.3 NUTRIÇÃO X SAÚDE ORAL.....	20
3.4 ADITIVOS UTILIZADOS PARA REDUÇÃO DA PLACA BACTERIANA.....	21
3.4.1 Hexametáfosfato de sódio.....	22
3.4.2 Extratos naturais.....	22
3.4.3 Extrato de romã (<i>Punica granatum</i>).....	22
3.4.4 Extrato de própolis.....	23
3.5 TESTE DE PREFERÊNCIA COM CÃES.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 MANEJO COM OS ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
4.2 ELABORAÇÃO DOS BISCOITOS.....	27
4.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE COBERTURA POR PLACA BACTERIANA.....	27
4.4 COLETA DE MICROBIOMA	28
4.5 TESTE DE PREFERÊNCIA E RANQUEAMENTO.....	30
4.5.1 Período de adaptação.....	30

4.5.2 Coletas.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
5.1 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE COBERTURA POR CÁLCULO DENTÁRIO.....	34
5.2 AVALIAÇÃO DE MICROBIOMA ORAL.....	38
5.3 ANÁLISE DE PREFERÊNCIA.....	42
6. CONCLUSÃO.....	45
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
8. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal consiste no mais representativo problema de saúde oral, com uma alta incidência em pequenos animais, afetando 80% dos cães acima de 2 anos de idade (REZENDE et al., 2004; NIEMIEC, 2008; ABDALLA et al. 2009; RIGGIO et al., 2011). O cálculo dentário, a gengivite e a periodontite são as afecções orais mais comuns no cão (GORREL, 2000; KYLLAR; WITTER, 2005).

A placa bacteriana é a causa primária da doença periodontal. O processo chamado periodontite, ocorre em consequência do acúmulo de placa na superfície dos dentes, resultando em inflamação gengival e destruição dos tecidos como: gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal se o acúmulo de placa for contínua, efeitos locais e sistêmicos podem ser clinicamente significantes (HARVEY, 1998). Nesta fase também ocorre bacteremia, com conseqüente comprometimento de órgãos vitais, como coração, fígado e rins, e também de articulações (CORRÊA; VENTURINI, 1996).

Na cavidade oral de cães saudáveis há 400 espécies bacterianas (GIOSO, 2007). Muitos destes microrganismos associam-se para formar biofilmes. A maioria das bactérias que estão na cavidade oral são espécies comensais, entretanto podem tornar-se patogênicas em respostas às alterações do ambiente, como exemplo falta de higiene oral (AVILA et al., 2009).

O acúmulo da placa pode ser evitado unindo dieta e higiene oral por meio de escovação, entretanto esta prática deve ser realizada desde cedo e pelo fato de demandar tempo dificilmente é feita com frequência pelos tutores. Tendo em vista tal dificuldade, outros métodos foram buscados para reduzir a formação de cálculo dentário por métodos físicos, como o uso de ossos bovinos autoclavados, petiscos comerciais, dietas específicas que utilizam aditivos quelantes de cálcio, como o hexametáfosfato sódio.

As plantas medicinais têm sido estudadas a fim de se preconizar e validar o seu uso como precursoras de fármacos com propriedades terapêuticas. Em inúmeros estudos, há relatos que a atividade antimicrobiana apresentada por diferentes extratos vegetais pode estar ligada à presença de compostos orgânicos provenientes dos metabolismos primários e/ou secundários das plantas (KANERIA et al., 2012; BARATHIKANNAN et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de biscoitos assados contendo um blend de extratos de romã e própolis em comparação a biscoitos com e sem hexametáfosfato de sódio.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar sua eficiência na redução de área coberta por cálculo dentário;
- Analisar a alteração no microbioma oral dos cães comparando início e final do experimento
- Avaliar a preferência dos cães entre todos os biscoitos fornecidos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANATOMIA DENTÁRIA CANINA

Os cães são diofiodontes, o que significa que apresentam duas dentições sucessivas, a decídua e a permanente. E são heterodontes, ou seja, apresentam dentes com formas diferentes (ROZA, 2004). Em sua dentição primária apresentam 28 dentes, sendo 6 incisivos, 2 caninos e 6 pré-molares tanto na arcada superior como na inferior (FAHRENKRUG, 2007). E na dentição secundária 42 dentes, sendo 6 incisivos, 2 caninos, 4 pré-molares e 2 molares na arcada superior e 6 incisivos, 2 caninos, 4 pré-molares e 3 molares na arcada inferior (Figura 1) (TUTT, 2006; FANHRENKRUG, 2007).

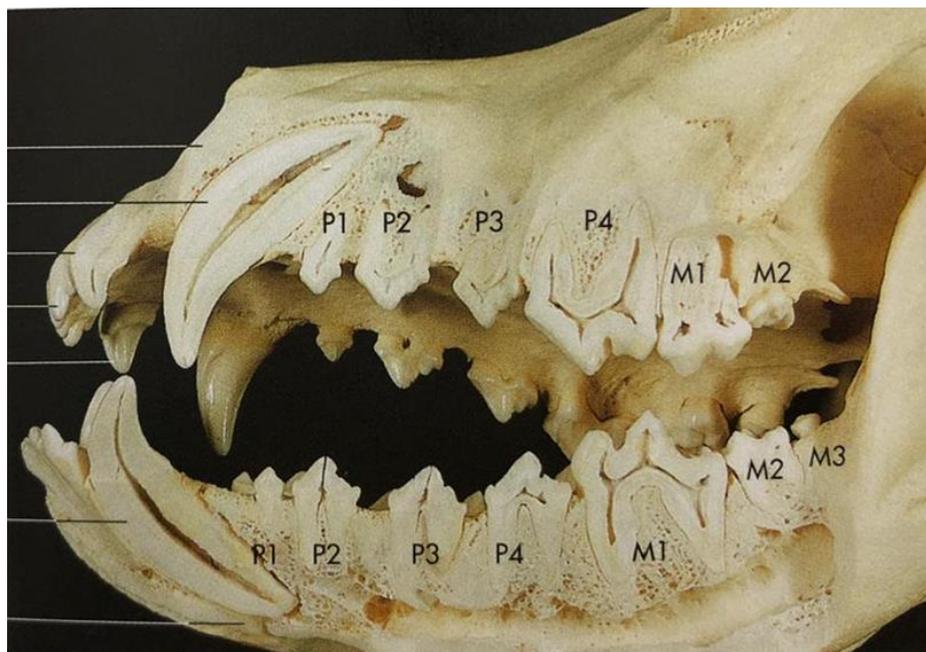


Figura 1 - Vista lateral arcada dentária canina (Fonte: KÖNIG; LIEBICH, 2016)

Os dentes estão localizados nos alvéolos dentários do osso maxilar e mandibular, formando duas arcadas dentárias, superior e inferior.

O formato da cabeça do cão interfere na posição dos dentes, e na predisposição a desenvolver enfermidades. Uma considerável diferenciação da morfologia do crânio com três tipos fundamentais: dolicocefalos (diâmetro anteroposterior da cabeça longo); braquiocefálico (cabeça achatada da frente para

trás) e mesocefálico (intermediários entre os anteriores) (WHYTE et al., 1999; SAIDLA, 2000).

As raças braquiocefálicas com frequência possuem uma quantidade menor de dentes, geralmente o P1 e M3 (superiores e inferiores) são ausentes na maioria das vezes (DYCE et al., 1996).

O dente pode ser dividido em três estruturas principais: coroa, colo e raiz. A coroa é a porção exposta do dente que se projeta acima da gengiva, a raiz é a porção que se insere no alvéolo dentário unindo dente e alvéolo e o colo compreende a região intermediária ou zona de transição entre coroa e raiz. O número de raízes será variável conforme a localização anatômica do dente na arcada dentária, podendo ser uma única raiz ou unirradicular, raiz dupla ou birradicular e raiz tripla ou trirradicular (SIMÕES, 2016). A coroa é revestida pelo esmalte, que é o tecido mais rígido e mineralizado do organismo, sendo desprovido de qualquer inervação, vascularização e capacidade regenerativa ou reparadora (GORREL, 2010).

A dentina, composta por 70% de material mineral e acelular é a principal estrutura suporte do dente (JOHNSTON, 2002). Confere formato ao dente e envolve a câmara pulpar e o canal radicular, sendo revestida pelo esmalte na região da coroa e pelo cemento na raiz (SIMÕES, 2016). A câmara pulpar e o canal radicular são preenchidos pela polpa dentaria, que é um tecido conjuntivo frouxo repleto de vasos sanguíneos e linfáticos, feixes nervosos e células especializadas (Figura 2) (BAIA et al., 2017).

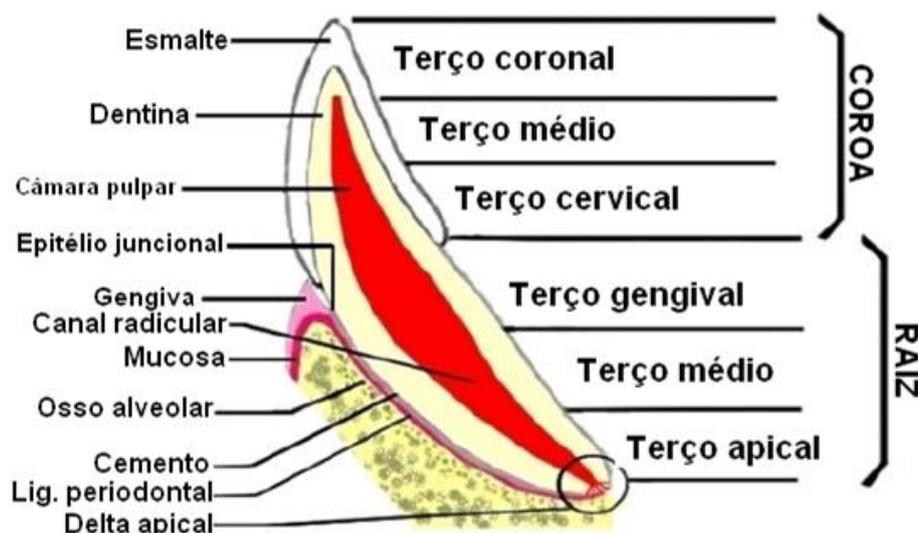


Figura 2 - Estrutura do dente (Fonte: Adaptado de Hills – Gioso)

3.2 DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES

A doença periodontal é induzida pela presença de biofilme bacteriano na superfície do dente, contudo sua etiologia é multifatorial e, depende da ocorrência de diversos fatores predisponentes e perpetuadores (ROZA, 2004; CARDOSO, 2012; FERNANDES et al., 2012; SEMEDO-LEMSADDEK et al., 2016; BAIA et al., 2017; ADEPU et al., 2018). A doença pode ser caracterizada como de caráter inflamatório crônico, na qual parte ou todas as estruturas do periodonto são afetadas (CARDOSO, 2012; FERNANDES et al., 2012; CAMPBELL et al., 2016; SILVA et al., 2016). Acomete os tecidos que recobrem parcialmente, protegem e sustentam os dentes, estes incluem a gengiva, o osso alveolar, o cemento e o ligamento periodontal (Santos et al, 2012).

No universo das doenças da cavidade oral, a doença periodontal consiste no mais representativo problema, com uma alta incidência em pequenos animais, afetando 80% dos cães acima de 2 anos de idade (REZENDE et al., 2004; NIEMIEC 2008; ABDALLA et al. 2009; RIGGIO et al., 2011). O cálculo dentário, a gengivite e a periodontite são as afecções orais mais comuns no cão (GORREL, 2000; KYLLAR; WITTER, 2005).

A severidade da doença tem influência de fatores que podem ser intrínsecos e extrínsecos ao animal. Os fatores intrínsecos seriam a espécie, raça, genética, idade, comportamento de roer, resposta imunológica e oclusão (KLEIN, 2000). Os fatores extrínsecos podem ser considerados a dieta, consistência da comida, presença de bactérias patogênicas, ausência de bactérias benéficas e patologias orais concomitantes (CLELAND, 2000; TELHADO et al. 2004).

A genética e a raça também estão relacionadas à maior ocorrência da afecção, sendo mais acometidas as raças de pequeno porte (DEBOWES, 2014; MARSHALL et al., 2014; Stella et al., 2018). Ao considerarmos a localização dos dentes, geralmente, os menos afetados pela doença são os caninos e os mais acometidos são os incisivos, o quarto pré-molar e o primeiro molar (MARSHALL et al., 2014).

3.2.1 Placa bacteriana

A placa bacteriana ou biofilme bacteriano é um material de consistência

pegajosa e amarelada que se forma sobre o esmalte dentário, é uma estrutura complexa resultante da colonização e do crescimento bacteriano sob a superfície oral, dentes e tecidos moles adjacentes (CARDOSO, 2012; HÁ, 2013). A composição desse biofilme é formada por uma matriz orgânica de agregado de bactérias e seus subprodutos, glicoproteínas salivares, partículas de alimentos, substâncias inorgânicas e células epiteliais e inflamatórias (ADEPU et al, 2018).

Esta pode não ser visível à inspeção oral, mas poderão ser evidenciadas através da utilização de soluções reveladoras de placa (REZENDE et al. 2004). Após a erupção, os dentes ficam envolvidos no fluido biológico da cavidade oral, que contém mais de 400 espécies de bactérias. A formação da placa é dividida em três fases: I) Formação da película primária; II) Aderência; III) Colonização e maturação (ETTINGER; FELDMAN, 2010).

A placa inicialmente se estabelece na superfície do esmalte do dente e sem remoção mecânica periódica, tal como com a mastigação apropriada ou escovação dos dentes, torna-se mais espessa e através de minerais presentes na saliva, ou nos fluidos gengivais, além de materiais alimentares, mineralizam a placa formando o cálculo dentário. O pH alcalino da saliva do cão ($\cong 7,59$) faz com que o ambiente favoreça a mineralização e formação do cálculo (MARX et al., 2016).

3.2.2 Consequências da placa

A placa bacteriana é a causa primária da doença periodontal. Existem vários fatores que contribuem para o acúmulo de placa, tais como, apinhamento dentário, má-oclusão dentária, alimentação com dieta úmida e ausência de hábitos de higiene oral. Fatores que diminuem a resistência do sistema imunitário, tais como doenças metabólicas, distúrbios nutricionais e situações de imunodeficiência podem contribuir para a formação de placa (HARVEY, 1998; TATAKIS; KUMAR, 2005).

O processo chamado periodontite, ocorre em consequência do acúmulo de placa na superfície dos dentes, resultando em inflamação gengival e destruição dos tecidos, sendo eles: gengiva, osso alveolar, ligamento periodontal e cimento; se o acúmulo de placa for contínuo, efeitos locais e sistêmicos podem ser clinicamente significantes (HARVEY, 1998). Nesta fase também ocorre bacteremia, formação de complexos imunes, com consequente comprometimento de órgãos vitais, como coração, fígado e rins, e também de articulações (CORRÊA; VENTURINI, 1996).

Além de causar o mau hálito, sinal este que os proprietários de cães mais observam, podem causa sialorréia (salivação excessiva), mobilidade dentária, gengivite severa, retração gengival, exposição da raiz, hemorragia gengival branda e moderada, bolsas periodontais, secreção nasal e fístulas oronasais (SANTOS et al, 2012). Devido ao comprometimento da arcada dentária do animal, pode ainda, ocorrer a redução da capacidade de consumo de alimentos, o que afeta o peso do animal, além de predispor o animal a doenças sistêmicas graves (PINTO et al, 2008).

3.2.3 Progressão de placa para outras doenças periodontais

Cerca de uma semana após o desenvolvimento do biofilme, o primeiro sinal clínico da doença periodontal, a inflamação da gengiva (gengivite), poderá ser observado e, caso a lesão persista, a doença progride e se agrava, causando sinais clínicos locais e sistêmicos (ROZA, 2004; SEMEDO-LEMSADDEK et al., 2016; PATEL et al., 2016; SIMÕES, 2016). A doença pode ser dividida em duas fases: a gengivite que é a fase inicial e reversível da doença, e a periodontite que é a fase posterior e irreversível, caracterizada como a inflamação das estruturas do periodonto, e resulta na destruição progressiva dessas estruturas (NIEMIEC, 2008; Stella et al., 2018).

A gengivite pode ser reconhecida pela presença de halitose, eritema, edema, sangramento e aprofundamento do sulco gengival (bolsa periodontal); esse quadro é reversível quando se remove o biofilme (ROZA, 2004; NIEMIEC, 2008; DEBOWES, 2014). Contudo, se não for removido o biofilme bacteriano, à medida que a gengivite progride para a periodontite, ocorre intensificação das alterações inflamatórias orais, em que há perda de inserção do dente pelo aumento da bolsa periodontal e pela perda óssea, resultando em recessão gengival e deposição contínua de biofilme, o que pode ser sucedido pela perda do dente (ROZA, 2004; NIEMIEC, 2008; CARDOSO, 2012). Também são sinais da periodontite a exposição de furcas, a halitose intensa, o sangramento gengival espontâneo ou por leve abrasão, as alterações de comportamento e alimentares por dor e desconforto periodontal, entre outros (DEBOWES, 2014).

Tanto os tumores orais como a hiperplasia gengival são condições que alteram o ambiente do dente e da gengiva, contribuindo para a doença periodontal pela formação de bolsas ou pseudobolsas (KLEIN 2000).

Para avaliar o estágio da doença periodontal de cães, Logan e Boyce (1994) desenvolveram uma metodologia no qual se utiliza o Índice de Placa Bacteriana e o Índice de Cálculo Dentário. No índice de placa bacteriana utiliza-se a coloração dos dentes com o agente eosina aquosa a 2% que rapidamente adere a área acometida por placa bacteriana organizada e estima a espessura baseando-se na intensidade da coloração que varia de rosa a vermelho. Para o índice de cálculo dentário, que é de estrutura rígida e superfície rugosa, o dente é dividido verticalmente em terços medial, vestibular e distal e recebe um escore numérico baseado na percentagem do dente coberto pelo cálculo que é avaliado pela coloração do dente que varia de amarelo claro a marrom escuro. Abdalla et al. (2009) adaptou a metodologia de Logan e Boyce (1994) para ser utilizada de forma computadorizada, com fotografias digitais e softwares para marcações e cálculo da área coberta por placa bacteriana e cálculo dentário.

3.2.4 Microbioma canino

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

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

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

O microbioma nativa constitui-se essencialmente por bactérias, cocos e bacilos, Gram-positivos, sem motilidade, e alguns aeróbicos facultativos. Com a ocorrência da gengivite há um aumento do número de bactérias, com aparecimento de bacilos Gram-negativos com capacidade de mobilidade (aproximadamente 50%), e algumas

espécies anaeróbias, como pode ser observado o esquema na Figura 3 (ETTINGER; FELDMAN, 2010).

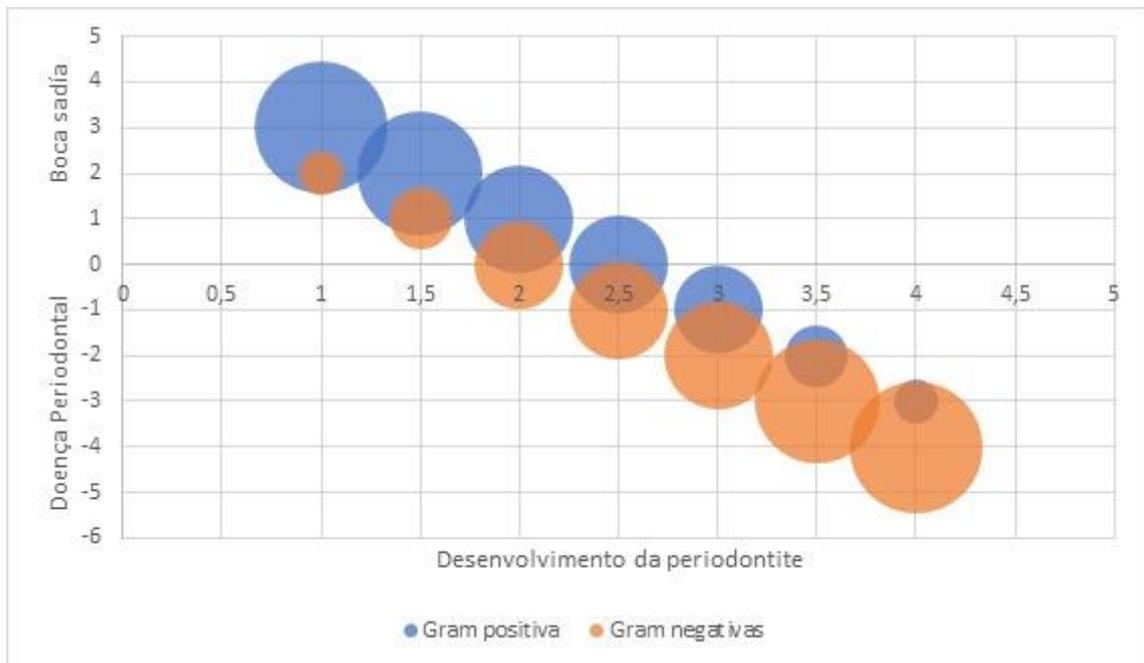


Figura 3 - Esquema sobre a transição do microbioma predominante de acordo com o estado de saúde oral

Na doença periodontal instalada a contagem de bacilos gram-negativos conta com aproximadamente 74% do microbioma (GARCIA; DIAS, 2008). O elevado número de espiroquetas é encontrado na maior parte das bolsas periodontais, e os organismos anaeróbios constituem 90% das espécies bacterianas na doença periodontal crônica (BROOK, 2008).

Espécies como *P. cangingivalis*, *P. gingivicanos*, *P. crevioricanis*, *P. circumdentaria*, *P. macacae*, *P. catoniae*, *P. gulae*, *F. nucleatum* e *F. canifelinum* são descritas na literatura como parte do microbioma periodontal de cães e gatos, podendo estar associadas à periodontite nestes animais. As espécies *P. macacae* e *P. gulae* possuem maior relevância clínica na periodontite canina (ALLAKER et al., 1997; ELLIOT et al., 2005; HARDHAM et al., 2005).

As espiroquetas têm sido registradas na placa bacteriana dos cães sobretudo em bolsas periodontais com profundidade superior a 5mm (RIVIERE et al, 1996). As espécies registradas mais prevalentes foram *Pseudomonas sp.* (30,9%) e *P. cangingivalis* (16,1%) (RIGGIO et al. 2011). Estas bactérias tem um papel importante

na destruição dos tecidos que caracterizam a periodontite (REZENDE et al. 2004; ETTINGER; FELDMAN 2010).

3.2.5 Prevenção

Uma das maneiras de se evitar o acúmulo de placa bacteriana é a realização de escovação periódica. Como os animais precisam ser condicionados a tais procedimentos desde novos e como o tempo disponível para tal prática torna-se cada vez menor nas famílias que possuem animais de companhia, a maioria dos proprietários prefere utilizar snacks ou tiras de couros na prevenção da formação do cálculo dentário (PAIVA et al, 2007).

Nos últimos anos houve uma acentuada expansão da oferta de produtos destinados a facilitar os cuidados dentários domésticos para os proprietários e a ser mais toleráveis para os animais de estimação, dentre estes produtos temos: brinquedos mastigáveis, petiscos mastigáveis, ossos autoclavados, e escovas e pastas de dentes para cães (GIOSO, 2003). Os biscoitos anticálcus podem ser usados como coadjuvantes na prevenção da doença periodontal (GIOSO, 1994). A estratégia padrão para evitar o cálculo é a raspagem mecânica para limpar os dentes. Isso foi basicamente alcançado modificando-se a textura e o tamanho do grânulo da ração, porém apenas atinge os dentes utilizados no ato da mastigação sendo eles: os pré-molares superiores e inferiores, primeiro molar superior e inferior e segundo molar inferior. Uma nova abordagem utiliza fontes minerais nutricionais que podem proporcionar benefícios dentários como a diminuição da formação da placa bacteriana (COX et al., 2003).

3.3 NUTRIÇÃO X SAÚDE ORAL

As estratégias nutricionais com maior frequência na literatura para prevenir ou retardar o surgimento da doença periodontal são a textura e a forma do alimento, os exercícios de mastigação e os alimentos ou os brinquedos tratados com produtos químicos.

A dieta de ração seca é considerada a melhor para manter a saúde oral, quando comparada ao alimento úmido ou à comida caseira, devido à ação mecânica da ração,

que pode auxiliar a remoção do biofilme bacteriano e, conseqüentemente, reduzir a ocorrência da afecção (FERNANDES et al., 2012).

A influência na saúde oral está relacionada principalmente com alteração na textura e o tamanho do grânulo da ração, porém, exerce efeito apenas nos dentes utilizados para mastigar. Uma nova abordagem utiliza a inclusão de fontes minerais nutricionais nos alimentos de maneira que possam proporcionar benefícios em todas as superfícies dentárias. Os fosfatos formam complexos solúveis com o cálcio presente na saliva, ajudando a prevenir a mineralização da placa em cálculo. Dessa forma, agem em toda a cavidade oral, inclusive nas superfícies não envolvidas na mastigação (STOOKEY et al., 1995; STOOKEY et al., 1996).

3.4 ADITIVOS UTILIZADOS PARA REDUÇÃO DA PLACA BACTERIANA

Segundo IN 30/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, consideram-se aditivos: substâncias, microrganismos ou produtos formulados e adicionados intencionalmente aos alimentos, que não são utilizados normalmente como ingredientes, tenham ou não valor nutritivo e que melhorem as características dos produtos destinados à alimentação animal, melhorando o desempenho dos animais sadios e atendendo às necessidades nutricionais.

Fontes nutricionais de fosfatos podem ser manipuladas durante a fabricação de rações para acentuar as propriedades físicas sem alterar as fórmulas de base ou o tamanho do grânulo. Os cristais de polifosfatos ajudam a prevenir a mineralização da placa, pois formam uma barreira física em sua superfície, onde permanecem até que o organismo os absorva como nutrientes fosforosos proporcionando, assim, benefício dentário prolongado. Os polifosfatos, ao serem liberados da ração, podem proporcionar benefícios às superfícies não envolvidas na mastigação e, também, às de contato como as gengivas. Cães alimentados com ração revestida de polifosfatos desenvolveram 55% menos cálculo dentário que animais alimentados com ração não revestida (COX et. al., 2003).

3.4.1 Hexametáfosfato de sódio

O hexametáfosfato de sódio é um agente quelante do íon cálcio da saliva. Quando adicionado ao alimento e com a mastigação, o hexametáfosfato de sódio é incorporado na placa bacteriana e forma complexos solúveis com o cálcio que se difundem com a saliva, prevenindo a acumulação de cálculo dentário. O hexametáfosfato é convertido em ortofosfato por meio de ácidos de estômago, sendo assimilado de forma semelhante a outros fosfatos da dieta (STOOKEY et al., 1996).

3.4.2 Extratos naturais

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

3.4.3 Extrato de romã (*Punica granatum*)

Punica granatum L., conhecida popularmente como romanzeira, romeira e granado, é amplamente distribuída por todo Brasil sendo originária da Ásia (Braga, 1961). A planta possui vários compostos que sugerem uma ampla gama de aplicações clínicas para a prevenção e tratamento de doenças. Extratos do fruto e casca possuem atividade antioxidante (KAUR et al., 2006). Além disso, apresenta atividades antibacterianas, anticonvulsivantes, anti-inflamatórias, antifúngicas, imunomoduladoras, cardioprotetoras, antimutagênicos, antiespasmódico e antidiabéticas (SINGH et al., 2009).

Dentre os fitoconstituintes presentes na planta, destacam-se flavonóides (apigenina e narigenina), antocianinas, taninos (ácidos gálico e elágico), alcalóides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados (ácido púnico) e o ácido ursólico (LANSKY; NEWMANN, 2007).

Estudos demonstram que as variadas atividades biológicas descritas para a *P. granatum* estão estritamente relacionadas à sua composição química. As principais partes utilizadas da planta são as folhas e cascas dos frutos. Pesquisas de isolamento e caracterização vem sendo realizadas para elucidar os compostos presentes nos extratos de romã, dentre eles os principais são os polifenóis englobando taninos, flavonóides, alcalóides, ácidos orgânicos, dentre outros (WANG et al., 2010).

Segundo Pereira et al. (2006) a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da romã atua frente a linhagens comuns ao biofilme supragengival humano: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

O gel dentário com extrato alcoólico de romã mostrou grande eficácia na redução da placa bacteriana, o que demonstra seu potencial na terapêutica da doença periodontal em cães, corroborando os estudos de Disilvestro et al. (2009).

3.4.4 Extrato de própolis

A própolis é uma substância resinosa ou algumas vezes cerosa, coletada por abelhas melíferas de diferentes exsudatos vegetais. Tem sido utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade devido ao seu largo espectro de atividade biológica como antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antifúngico e, até mesmo, anticancerígeno (KUJUMGIEV et al., 1999; BANSKOTE et al., 2000; SFORCIN et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001).

A composição da própolis varia de acordo com o local de coleta e da espécie vegetal utilizada pelas abelhas na sua confecção. Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas. Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostra de própolis de origens diversas, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis,

dihidroflavonóis, etc.), terpenos, B-esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (GREENAWAY et al., 1991; AGA et al., 1994; BASKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1996, 2001).

Várias substâncias químicas têm sido isoladas da própolis, sendo os flavonóides considerado o composto biologicamente ativo (KOO et al 2002). Tem sido relatada atuação antimicrobiana expressiva do extrato de própolis contra bactérias gram-negativas (FERREIRA et al., 1996; WOISKY et al, 1994), e especificamente contra bactérias colonizadoras do biofilme, (GEBARA et al., 1996), além do efeito inibitório sobre a síntese de glucano (KOO et al, 2000) somado ao fato de sua capacidade de inibir o desenvolvimento da cárie em animais (IKENO et al., 1991; KOO et al., 1999).

3.5 TESTE DE PREFERÊNCIA COM CÃES

O consumo de alimentos é usado para testar métodos na indústria afim de avaliar a aceitabilidade e palatabilidade dos produtos (ALDRICH; KOPPEL, 2015). Estes incluem o teste de comedouro único, o teste de dois comedouros e teste operativo. Alguns pesquisadores também utilizam o tradicional teste de escolha forçada de dois comedouros e o modificam para atender seus objetivos e necessidades (FRAGUA et al., 2015; HEWSON-HUGHES et al., 2013; VERBRUGGHE et al., 2007).

No entanto, nenhum fornece uma indicação do motivo pelo qual uma escolha é preferida. Além disso, o teste operante depende de treinamento especializado para o técnico e para o cão. Poucos testes fornecem uma indicação de gostar. Para os animais de companhia, os métodos que dependem de sua motivação para resolver um quebra-cabeça talvez podem fornecer pistas sobre o gosto. Os testes existentes são fáceis de operar, mas têm limitações causadas pela natureza dos testes de escolha limitada que podem potencialmente alterar e/ou cobrir a verdadeira aceitabilidade ou palatabilidade dos alimentos (ALDRICH; KOPPEL, 2015).

O método padrão da indústria é o teste de escolha de dois comedouros, também conhecido como teste de comedouros divididos, normalmente usado com cães de canil. Neste modelo, os animais recebem simultaneamente dois alimentos

para escolher. Aquele que é consumido completamente ou o que for mais consumido quando o teste termina indica qual é preferido pelos animais (SMITH et al., 1984).

No entanto, o cão tem apenas duas opções e é limitado a escolher uma, o que pode não refletir verdadeiramente sua preferência. Outro método de teste conhecido como protocolo de avaliação de palatabilidade cognitiva (PAPC) foi estudado e comparado com o método de dois comedouros por Araujo et al. (2004).

Para este método, três objetos são dados aos cães ao mesmo tempo e o cão escolhe um dos três. Um dos objetos não contém comida como recompensa enquanto os outros dois sim, os cães recebem a comida para associar com o objeto que eles escolherem. O resultado mostrou que este método foi mais consistente do que o método de dois comedouros. Além disso, quando os indivíduos eram alimentados antes dos testes, a capacidade de detectar as preferências foi reduzida no teste de dois comedouros. Mesmo que os resultados indicaram que a palatabilidade cognitiva é o método mais preciso do que o método de dois comedouros, mais uma vez, os cães foram forçados a fazer uma escolha entre as três amostras, mesmo que não tivessem uma preferência (RASHOTTE et al., 1984).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC) sob o nº2151011018.

Foram realizados dois experimentos na cidade de Porto Alegre no Laboratório de Ensino Zootécnico – UFRGS com 12 cães da raça beagle, machos e fêmeas, com idade de 4 anos e peso entre 10-15kg. Em ambos os experimentos foram testados biscoitos assados caninos com ou sem aditivos os tratamentos foram: controle (sem adição de aditivos), com 0,6% hexametáfosfato de sódio e o blend com 0,9% de extrato de romã e 0,9% de extrato de própolis. No período de 19 dias foi avaliada a redução de área coberta por cálculo dentário, com ou sem escovação, e o microbioma oral, antes e depois do fornecimento dos biscoitos. Um segundo experimento foi realizado para avaliar a preferência dos cães em relação aos biscoitos e o ranqueamento, com 2 dias de adaptação e 5 dias de avaliação.

4.1 MANEJO COM OS ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 3 tratamentos, com 4 animais por tratamento sendo 2 machos e duas fêmeas. Os tratamentos foram:

- a. Tratamento controle: biscoitos assados sem adição de aditivos;
- b. Tratamento com hexametáfosfato: biscoitos assados com adição de hexametáfosfato de sódio em 0,6%;
- c. Tratamento blend: biscoitos assados com extratos de romã + própolis 1,8% (0,9% cada extrato);

Durante o estudo, os cães foram alimentados com uma dieta de manutenção duas vezes por dia às 8 da manhã e 17 da tarde em quantidades para manter o peso corporal. O escore de condição corporal dos cães no início do experimento foi de 5 à 6, com base na escala de escore corporal de 9 pontos (LAFLAMME, 2007). A água ficou disponível ao acesso dos cães durante todo período experimental.

4.2 ELABORAÇÃO DOS BISCOITOS

Os biscoitos foram elaborados na Usina de alimentos da CAL da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os mesmos foram fabricados semanalmente, embalados e enviados para o município de Porto Alegre – RS. Os ingredientes utilizados na elaboração básica dos biscoitos foram: farinha de trigo branca, farinha de trigo integral, farinha de arroz integral, leite em pó, sal, melado, gordura vegetal e bissulfito de sódio.

Para o cálculo de recomendação de ingestão de biscoitos diárias foram utilizados os dados da análise bromatológica do Laboratório CBO (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição bromatológica dos biscoitos assados

Componente	Quantidade (%)
Energia metabolizável	4,206 kcal/kg
Proteína bruta	11,69
Extrato etéreo	5,30
Fibra bruta	1,00
Matéria mineral	1,65
Umidade	6,11

Fonte: Próprio autor

Com estes valores foi calculado a energia metabolizável utilizando a metodologia de NRC (2006) para cães adultos em manutenção. Os cálculos realizados levaram em consideração não ultrapassar mais que 10% de inclusão de biscoitos na dieta total.

A análise de textura dos biscoitos foi realizada no Laboratório de análise sensorial em equipamento texturômetro (TA.XT.plus, Stable Micro Systems, Inglaterra), os resultados obtidos para a força de quebra foram: 12,745 kgf/kg; 12,737kgf/kg; 12,480kgf/kg para tratamentos blend, hexametáfosfato de sódio e controle respectivamente.

4.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA COBERTA POR CÁLCULO DENTÁRIO

Para a avaliação de área coberta foram tiradas fotos da arcada dentária dos cães (lado direito e lado esquerdo) a cada 3 dias, sendo eles: Dia 0 (antes de iniciar o consumo dos biscoitos), dias 3, 7, 11, 15 e 19 durante consumo dos biscoitos. Estas

fotos posteriormente foram avaliadas no software Image-Pro Plus, onde foram integradas as áreas: integração da total seguido pela integração da área acometida por cálculo dentário de cada um dos cães individualmente (Figura 4). A partir desses resultados foi calculado os escores de acordo com Abdalla et al. (2009).

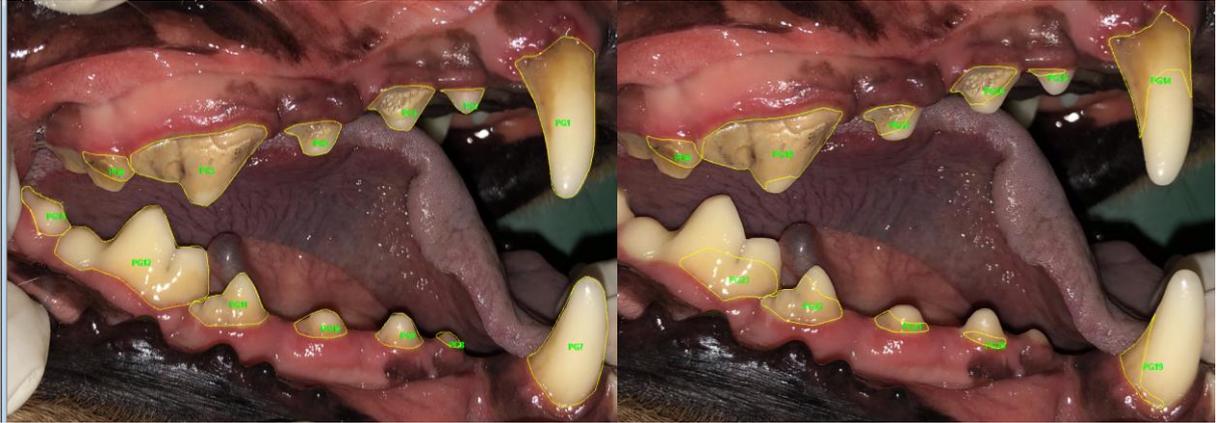


Figura 4 - Integração da área total e área acometida por cálculo dentário (Fonte: Próprio autor)

A partir do 9º dia iniciou-se a escovação de apenas um lado da arcada dentária dos cães para avaliar facilidade de retirada de tártaro utilizando uma escova de dentes humana infantil (extra macia) disponível no comércio (Figura 5).



Figura 5 - Escovas de dentes utilizadas (Fonte: próprio autor)

4.4 COLETA DE MICROBIOMA ORAL

Foram realizadas duas coletas de microbioma oral dos cães, a primeira no dia 0 antes de iniciar o consumo dos biscoitos e ao final do experimento no 19º dia.

Os kits para coleta foram enviados pela empresa Neoprosecta Microbiome. O kit continha 12 swabs (Figura 6) e 12 soluções estabilizantes (Figura 7), que depois foram reenviadas para a empresa.



Figura 6 - Kits dos swabs (Fonte: próprio autor)

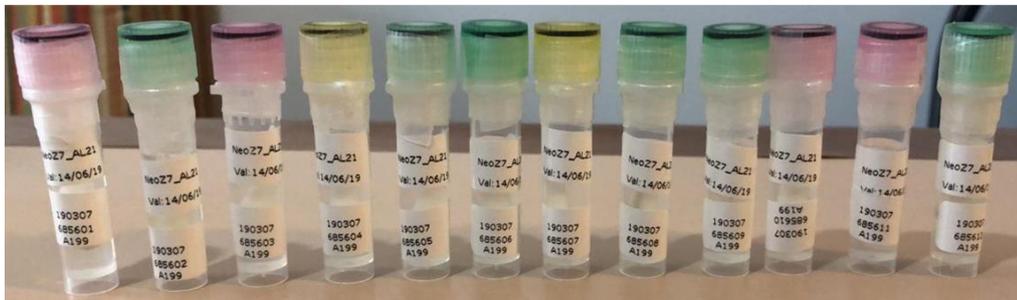


Figura 7 - Soluções estabilizantes (Fonte: próprio autor)

A coleta foi realizada em doze cães da raça Beagle de forma individual pela técnica de swab, sendo o mesmo passado nos dentes, gengiva, bochechas e língua de ambos os lados da boca, depois a ponta do swab era quebrada dentro de um eppendorf com a solução estabilizante, fechado e lacrado.

4.5 TESTE DE PREFERÊNCIA E RANQUEAMENTO

O método de classificação de preferência foi proposto sob a teoria da preferência dos cães pelo aroma/sabor que proporcionaria a motivação para extrair comida de um brinquedo, a fim de obter a comida que preferissem. Procedimentos semelhantes de extração de alimentos, também chamados de “teste de Kong”, foram utilizados em outros estudos (PLUECKHAHN et al., 2016).

O teste foi realizado e adaptado de acordo com a metodologia descrita por Li et al. (2017). Os biscoitos permaneceram armazenados em sacos frizantes transparentes durante 19 dias antes do início do teste.

4.5.1 Período de adaptação

A adaptação dos cães em relação aos biscoitos foi realizada por um período de 2 dias, sendo que todos os cães tiveram os biscoitos dos três tratamentos oferecidos todos simultaneamente já dentro dos brinquedos.

Foram utilizadas duas áreas físicas das instalações separadas (uma para machos e outra para fêmeas) sendo que a ordem de entradas foram: primeiro os machos em ordem aleatória e posteriormente as fêmeas em ordem aleatória para todo o teste.

O brinquedo utilizado era da marca mini pet-ball (Figura 8) facilmente encontrado no comércio. O mesmo foi adaptado para o teste, tendo sua abertura expandida e adicionada uma outra metade com abertura expandida. Todos os brinquedos utilizados eram exatamente iguais e de mesma cor.



Figura 8 - Mini pet-ball adaptada(Fonte: próprio autor)

A cada nova entrada de um cão na área física, todos os brinquedos eram previamente limpos utilizando solução de etanol e posicionados na linha de largada. Durante todo o período de experimento todos os testes realizados foram filmados para posteriormente serem avaliados.

4.5.2 Coletas

Os testes foram feitos duas vezes ao dia, sendo a primeira ao início da manhã antes dos cães serem alimentados (7:30) e a segunda no período da tarde (14:30). Primeiro todos os machos eram recolhidos, colocados para realizar o teste e depois soltos, e depois as fêmeas eram recolhidas e seguem o mesmo esquema.

A ordem de entrada dos animais e sequencia dos brinquedos era sempre aleatória, para evitar uma lateralidade do animal. Antes de iniciar o teste eram dados todos os biscoitos em ordem aleatória para o animal cheirar e lamber (Figura 9).



Figura 9 - Biscoito sendo disponível para cheirar (Fonte: próprio autor)

Os brinquedos eram posicionados dentro da baia e posteriormente o animal era conduzido até o local (Figura 10). O cão ficava do lado oposto aos brinquedos, assim que o animal era solto o cronômetro era iniciado. No momento que o animal retirava e comia totalmente o biscoito o número do brinquedo era identificado e tempo anotado e assim até o último biscoito ser extraído de dentro do brinquedo. Se o mesmo não demonstrasse interesse pelo teste, se esperava um tempo de 2 minutos para retirá-lo.



Figura 10 - Posicionamento do animal e dos brinquedos "kong's" (Fonte próprio autor)

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 3 biscoitos assados diferentes (tratamentos) com 4 repetições (cães). As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância e as médias foram submetidas ao teste de Fischer a 5% de significância utilizando-se o programa Statistical Analysis System – SAS (2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DA ÁREA COBERTA POR CÁLCULO DENTÁRIO

Na figura 11, pode-se observar que houve uma redução da área de cobertura por cálculo dentário de todos os cães que consumiram os biscoitos, independente dos tratamentos. Além disso, é possível visualizar que os dentes dos animais apresentaram percentagens diferentes de área coberta por cálculo dentário, reduzindo quando comparado no início e ao final do experimento.

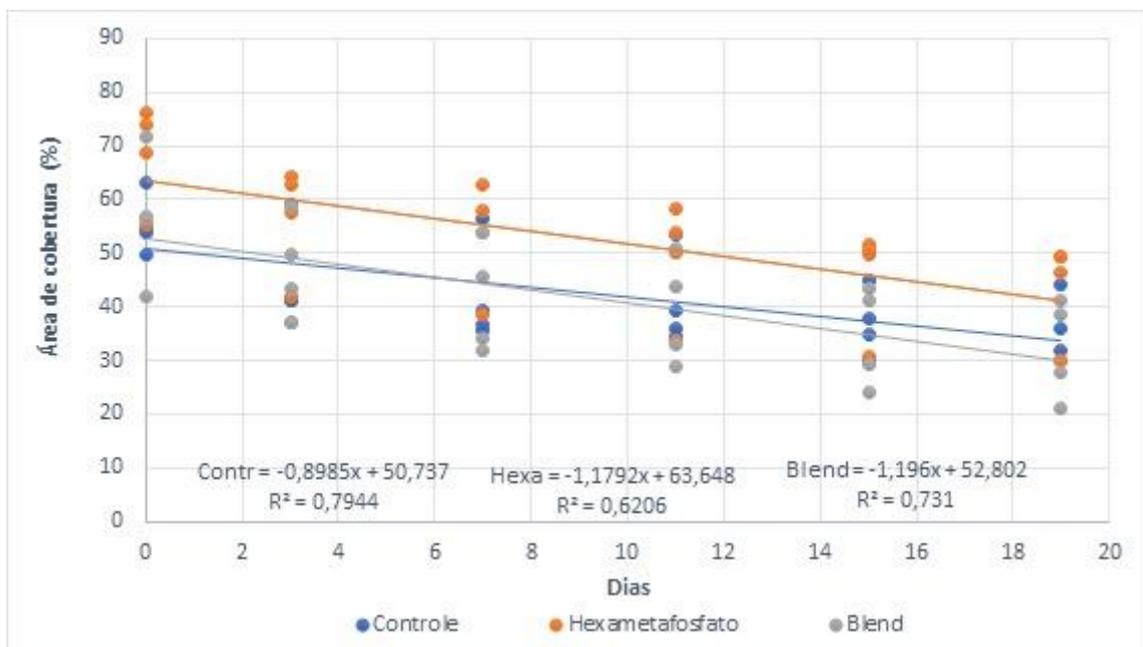


Figura 11 - Dispersão de acordo com a presença

Na figura 12 observa-se a área coberta por cálculo dentário do dente no início (dia 0) e no final do experimento (dia 19). Não houve interação entre os fatores, no entanto, foi possível observar que independentemente do tratamento houve redução da área coberta aos 19 dias ($p=0,001$). Além disso, independentemente do período avaliado, o tratamento com hexametáfosfato apresentou maiores percentuais de área coberta, quando comparado com os demais ($p<0,05$). O escore apresentou comportamento semelhante, como pode ser observado na figura 13.

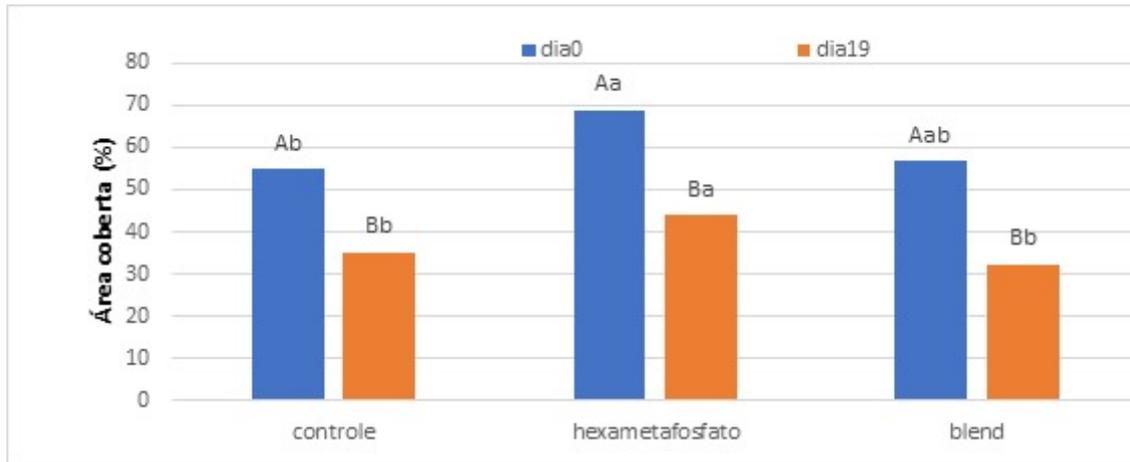


Figura 12 – Área coberta por cálculo dentário nos dias 0 e 19. Médias com letras maiúsculas diferem-se para os dias dentro do mesmo tratamento. Médias com letras minúsculas diferem-se entre os tratamentos dentro do mesmo período pelo teste de Fischer ($p < 0,05$)

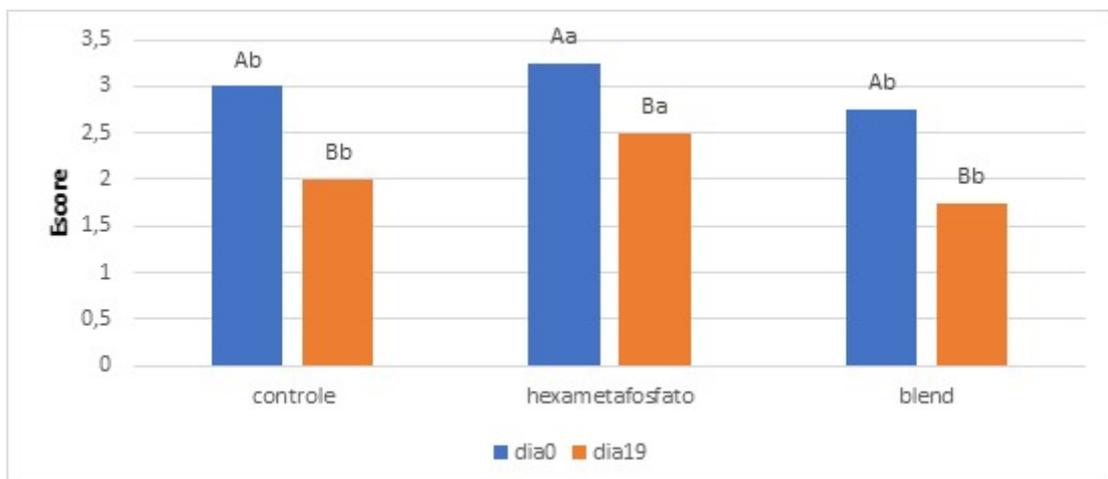


Figura 13 - Escore de acordo com Abdalla et al. (2000). Médias com letras maiúsculas diferem-se para os dias dentro do mesmo tratamento. Médias com letras minúsculas diferem-se entre os tratamentos dentro do mesmo período pelo teste de Fischer ($p < 0,05$)

Na figura 14, observa-se que houve diferença para o percentual de redução da área coberta por cálculo dentário ao final do período experimental. Os cães que receberam os biscoitos com o blend apresentaram maior redução na área coberta quando comparado com o tratamento controle, o tratamento com hexametáfosfato foi intermediário ($p = 0,049$).

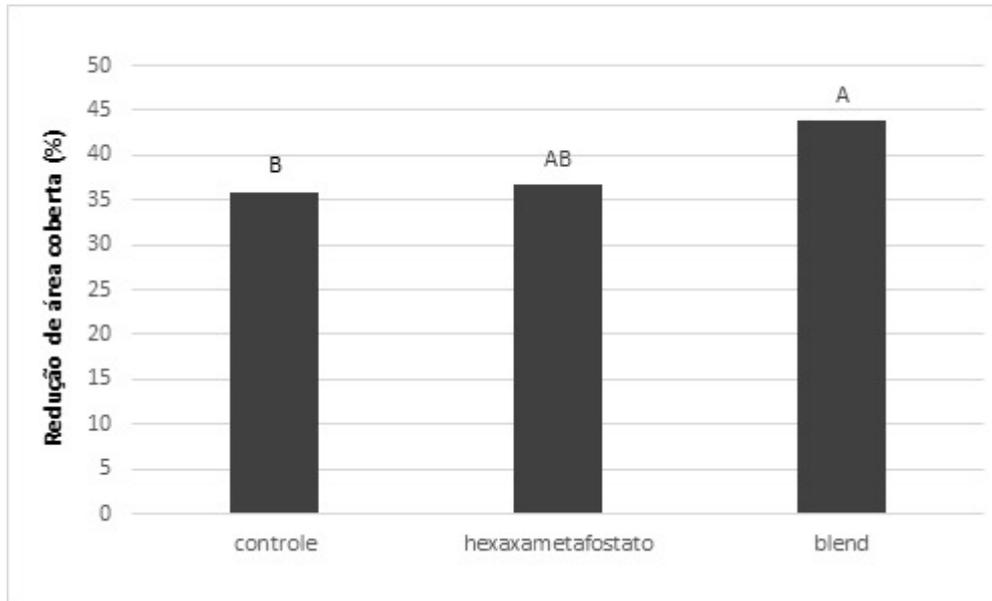


Figura 14 - Redução da área coberta após o final do experimento. Médias com letras maiúsculas diferem-se entre os tratamentos pelo teste de Fischer ($p=0,049$)

Na figura 15 observa-se uma interação entre lado escovado e o lado não escovado com relação ao tratamento. Quando houve escovação o percentual de redução de área de cálculo dentário não diferiu entre os tratamentos. No entanto, o lado escovado apresentou maior redução no tratamento com blend quando comparado ao controle, o tratamento com hexametáfostato foi intermediário.

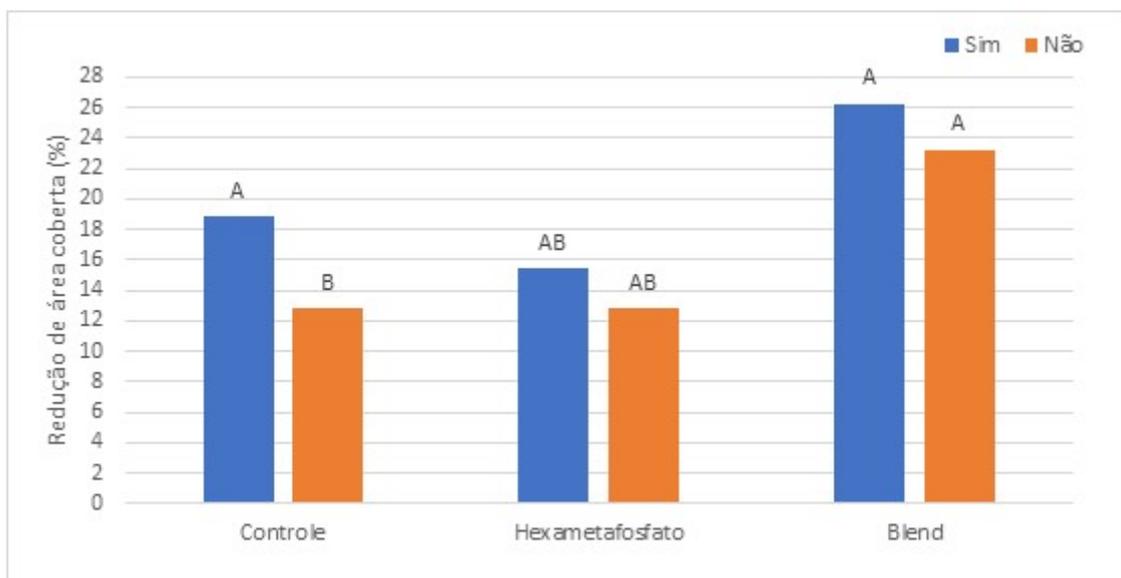


Figura 15 – Redução da área coberta com ou sem escovação. Médias com letras maiúsculas diferem-se entre os tratamentos pelo teste de Fischer ($p=0,047$)

A redução da área coberta por cálculo dentário nos dentes de cães que receberam o biscoito sem aditivo pode-se atribuir aos fatores como textura e ação mecânica do biscoito durante a mastigação, estes fatores também podem ser considerados para os demais tratamentos. Lembrando que todos os tratamentos apresentaram texturas semelhantes e que não se diferiram estatisticamente ($p=0,045$).

Marx et al. (2016) avaliaram ossos crus com diferentes texturas, esponjosos e compactos. Ossos esponjosos apresentaram maior redução de área coberta por cálculo dentário em comparação com ossos compactos em 12 dias, 81,6% e 70,6%, respectivamente. Este fato foi atribuído a fricção mecânica e textura em função da maior porosidade permitindo assim que os dentes penetrassem melhor no osso durante a mastigação, mostrando eficiência na remoção de cálculo dentário pré-existentes.

Neste estudo, a fricção foi importante para o tratamento controle, pois pode-se observar que houve uma maior redução de área coberta por cálculo dentário quando os dentes foram escovados por um período de nove dias contínuos, a diferença em 6 pontos percentuais entre o lado escovado para o não escovado foi de 32% ($p=0,047$) e os demais tratamentos 13% e 12% para hexametáfosfato e blend respectivamente ($p>0,05$). Em um estudo comparativo que utilizou escova dental e dedeira na remoção de placa bacteriana em cães Lima et al. (2004) obteve resultados positivos com ambas as escovas, obtendo remoção de 96,95% com a escova e 81,40% com a dedeira.

O tratamento com hexametáfosfato apresentou redução da área coberta por cálculo, não diferindo-se do tratamento controle e do blend ($p=0,049$). A ação do hexametáfosfato, já foi consolidada em outros estudos. Paiva et al. (2007) observaram os efeitos de coadjuvantes de ação mecânica na higiene oral e o uso de polifosfatos de sódio na diminuição da ocorrência de cálculo dentário, concluindo que biscoitos contendo coadjuvantes orais com polifosfatos, sob forma de trifosfato ou hexametáfosfato de sódio, apresentam uma ação efetiva e significativa na diminuição da formação do cálculo dentário e podem ser recomendados como uma alternativa à escovação. Pinto et al. (2007) estudaram dois tipos de fosfatos na prevenção e retardo do desenvolvimento de cálculo dentário incluindo estes fosfatos (trifosfato e hexametáfosfato) como cobertura e na massa de ração seca e concluíram que a inclusão de fosfato pode ser feita no alimento rotineiro de cães, a ração seca,

tornando-se uma opção prática para o controle de cálculo dentário. Segundo Cox et al. (2003) os cristais de polifosfatos ajudam a prevenir a mineralização da placa em cálculo dentário formando uma barreira física em sua superfície. Aliados a esses efeitos, os polifosfatos, também, podem proporcionar benefícios para toda a boca ao serem liberados durante a mastigação.

O tratamento com extratos de romã e própolis proporcionou maior redução de área coberta por cálculo, possivelmente, este maior efeito está associado as propriedades antimicrobianas dos extratos somado a textura dos biscoitos. A *Punica granatum* possui ação antimicrobiana específica sobre bactérias presentes no biofilme supragengival, produzindo uma interferência na síntese de poliglicanos, agindo, então, no mecanismo de aderência das bactérias sobre a superfície dos dentes em humanos (KAKIUCHI et al., 1986; CÁCERES, 1987, NAQVI et al., 1991; ANESINI; PEREZ, 1993). Também de acordo com Amorim et al. (2016), que avaliaram métodos alternativos na higienização oral de animais de companhia com uso de romã encontraram que além da melhora clínica dos animais e relatos positivos dos tutores que participaram do presente estudo, foi possível levar informações benéficas quanto à saúde e bem estar dos animais de companhia. Nota-se, portanto, que o fitoterápico tem potencial antimicrobiano contra bactérias da placa bacteriana, agindo positivamente na melhora da saúde oral dos animais. Para a própolis temos estudos como o de Santos (2012) que trabalhou com própolis no tratamento de doenças microbianas orais, encontrou que a própolis mostrou atividade antimicrobiana eficiente contra *Pseudomonas sp.* e *Staphylococcus aureus*. O efeito antimicrobioano da própolis é diretamente proporcional a sua concentração. A atividade antibacteriana do extrato de própolis se deriva principalmente dos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes em resinas, galangina, pinostrobrina, e pinocebrina que são conhecidos como os agentes mais efetivos contra bactérias.

5.2 AVALIAÇÃO DE MICROBIOMA ORAL

Com os resultados obtidos do microbioma oral dos Beagle nos dias 0 e 19 contabilizou-se os filamentos com maior predominância em ambos os dias, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobactéria*, *Chlorobi*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Candidatos Saccharibacteria* e *Chloroflexi*. Para cada tratamentos foram obtidos os seguintes

resultados nos dias 0 e 19 (Figuras 16, 17, 18) para controle, hexametáfosfato e blend, respectivamente.

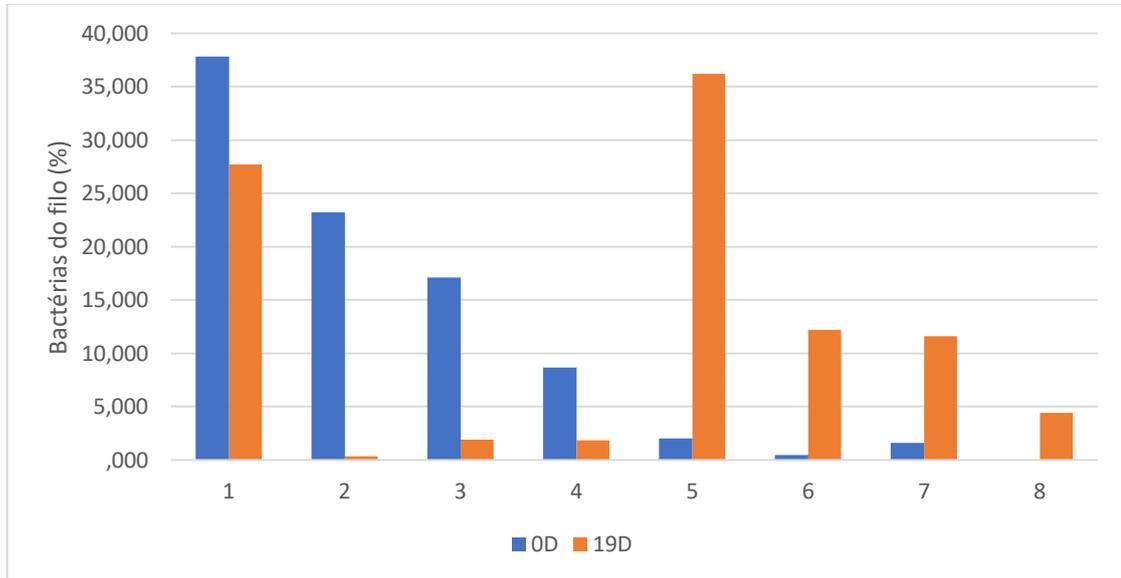


Figura 16 - Microbioma (Filo) tratamento biscoito controle (sem aditivo). 1)Bacteroidetes; 2)Proteobactéria; 3)Firmicutes; 4)Fusobactéria; 5)Actinobactéria; 6)Candidatus Saccharibactéria; 7)Chlorobi; 8)Chloroflexi.

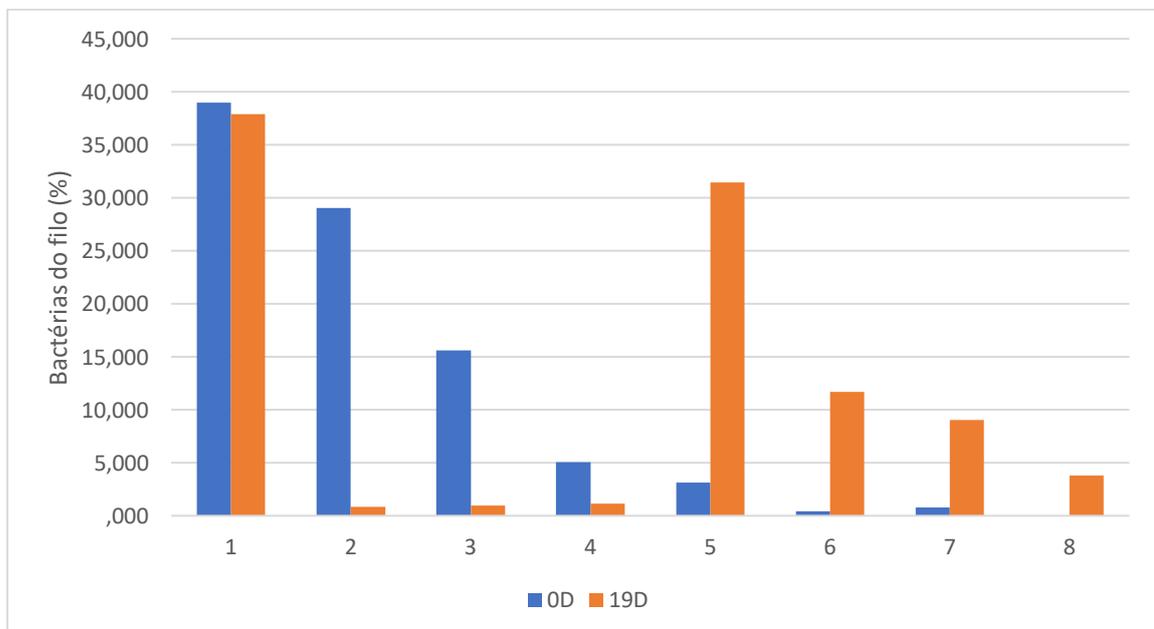


Figura 17 - Microbioma (Filo) tratamento biscoito com hexametáfosfato. 1)Bacteroidetes; 2)Proteobactéria; 3)Firmicutes; 4)Fusobactéria; 5)Actinobactéria; 6)Candidatus Saccharibactéria; 7)Chlorobi; 8)Chloroflexi.

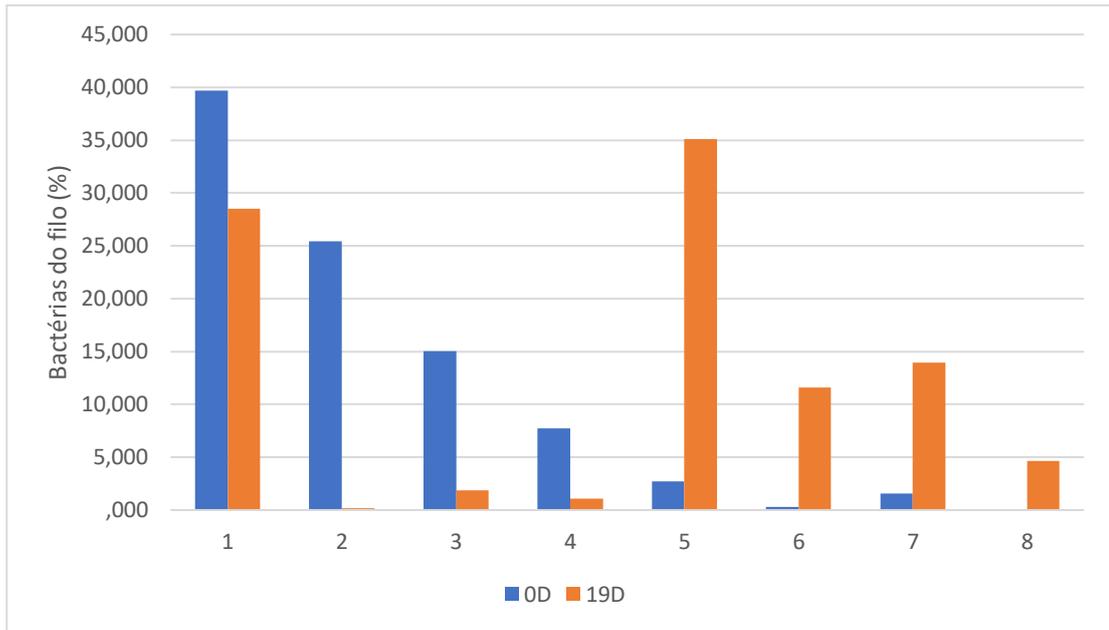


Figura 18 - Microbioma (Filo) tratamento biscoito contendo blend. 1)Bacteroidetes; 2)Proteobactéria; 3)Firmicutes; 4)Fusobacteria; 5)Actinobactéria; 6)Candidatus Saccharibactéria; 7)Chlorobi; 8)Chloroflexi.

Nas figuras é possível observar que o perfil entre gram negativas e gram positivas foi alterado do dia 0 para o dia 19, conforme é possível observar nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

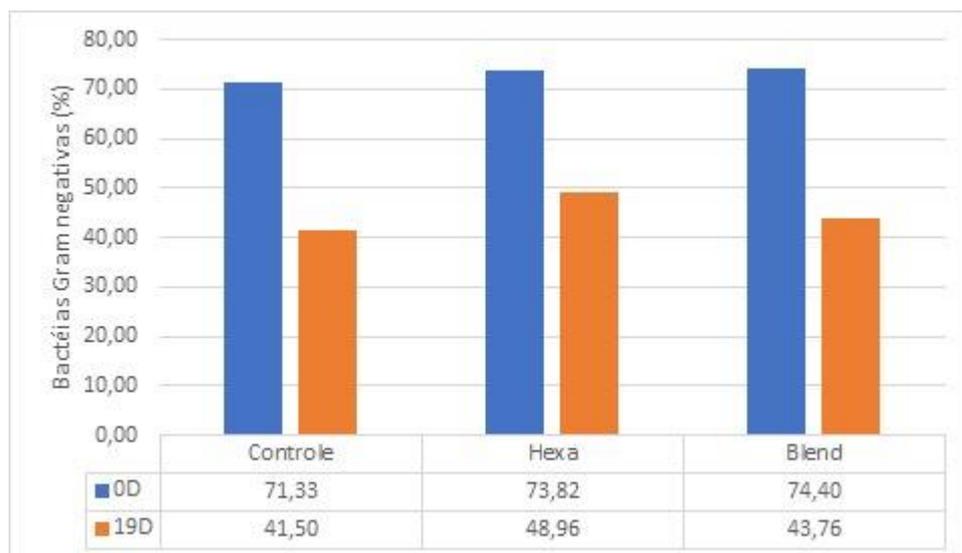


Figura 19 - Percentagem de bactérias gram negativas dias 0 e 19.

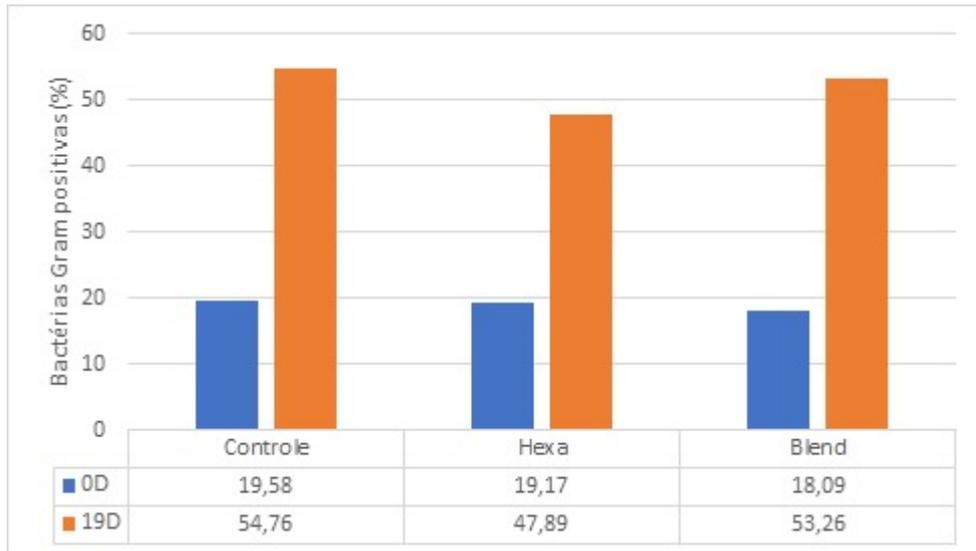


Figura 20 - Percentagem de bactérias gram positivas dias 0 e 19

Pode-se observar que houve uma mudança no microbioma entre os dias 0 e 19, sendo que no dia 0 ao início do experimento havia uma predominância de bactérias gram negativas e no 19º dia uma predominância de bactérias gram positivas, o que indica que houve uma melhora na saúde oral dos cães.

Segundo Braga et al. (2005) o isolamento de *Porphyromonas* spp. catalase positiva (Filo Bacteroidetes), *Pasteurella multocida* (Filo Proteobacteria), *Escherichia coli* (Filo Proctobacteria) e *Fusobacterium russi* (Filo Fusobacteria) foi maior em sítios com doença periodontal, quando comparado com sítios saudáveis. Por outro lado, o isolamento de *Staphylococcus saprophyticus* (Filo Firmicutes) foi superior nos sítios saudáveis dos cães. A contagem de colônias de *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium* spp. (Filo Fusiobacteria) E *Bacteroides* spp. (Filo Bacteidetes) foi sempre superior em sítios doentes. Considerando sítios saudáveis, bactérias anaeróbias facultativas foram predominantes, especialmente *Staphylococcus saprophyticus* (Filo Firmicutes).

Posteriormente foi avaliado a diversidade de bactérias para ambos os dias 0 e 19, ou seja, de um número 17 e 16 de filos de bactérias encontradas 16, 17, 16 no dia 0 e 15, 14, 15 no dia 19 estavam presentes no *pool* dos cães do tratamento hexametáfosfato de sódio, controle e blend respectivamente (Figura 21).

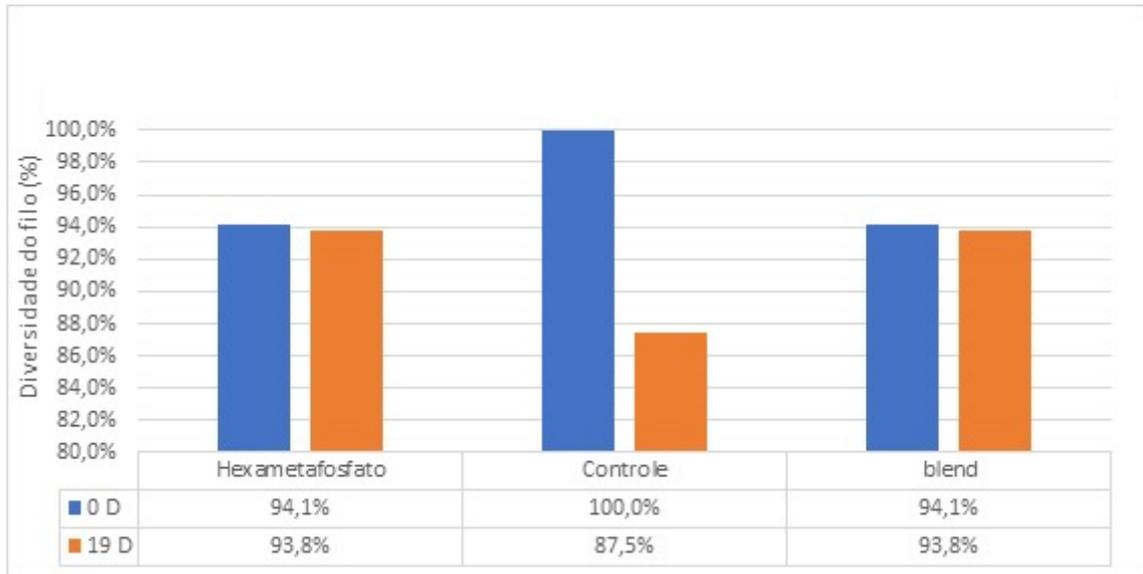


Figura 21- Diversidade dos filamentos dos microbiomas por tratamentos

O tratamento controle mostrou uma diminuição na diversidade devido apenas a remoção mecânica, já que o mesmo não possui nenhum aditivo que altere de alguma forma química.

No estudo de Bolzan (2018), que trabalhou com avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de sete extratos vegetais, entre eles a romã, sobre o microbioma oral de cães da raça Labrador Retriever, observou que a *Punica granatum* apresentou em sua composição fotoquímica a presença de flavonóides e nos testes de sensibilidade antimicrobiana todos os extratos demonstraram halo de inibição frente ao microbioma oral dos cães testados.

Santos et al (2012) trabalhou com uso de própolis para tratamento de doenças microbianas orais, extratos etanólicos de própolis exibiram atividade antimicrobiana significativa contra vários patógenos da cavidade oral em humanos, incluindo *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, que é o microbioma principal envolvida e doenças periodontais relacionadas a placa.

5.3 ANÁLISE DE PREFERÊNCIA

Na tabela 2, observam-se os resultados de preferência dos cães levando em consideração a relação preferência x tempo, como primeira escolha biscoitos

contendo blend e hexametáfosfato foram os tratamentos que levaram menos tempo a serem escolhidos ($p>0,05$), o controle por sua vez apresentou maior tempo até a sua escolha ($p<0,05$). Para a segunda escolha, o blend não apresentou diferença no tempo ao controle da “primeira escolha” ($p>0,05$) e nem diferença com relação aos demais tratamentos da segunda escolha ($p>0,05$). A terceira escolha apresentou comportamento semelhante a primeira, a qual o tratamento com o blend e com hexametáfosfato apresentaram menor tempo quando comparado com controle.

Tabela 2 - Resultado da interação da preferência dos cães em relação ao tempo médio de consumo dos biscoitos pelos cães

Escolha	Tratamento	Tempo (s)
Primeira	Controle	21,44 d
	Hexametáfosfato	17,91 e
	Blend	16,72 e
Segunda	Controle	38,53 c
	Hexametáfosfato	36,02 c
	Blend	33,36 cd
Terceira	Controle	69,13 a
	Hexametáfosfato	61,01 ab
	Blend	57,87 b
Valor de P	0,0358	
Desvio padrão	13,79	

Fonte: Próprio autor

Considerando todos os dados a primeira escolha ficaria com o tratamento blend, a segunda escolha para o tratamento hexametáfosfato e a terceira escolha com o tratamento controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Ranqueamento dos tratamentos determinado pelos resultados da interação da preferência dos cães em relação ao tempo médio de consumo dos biscoitos pelos cães

Escolha	Tratamento
1º Lugar	Blend
2º Lugar	Hexametáfosfato
3º Lugar	Controle

Fonte: Próprio autor

Fatores como aroma e sabor podem ter sido decisivos para este ranqueamento, uma vez que a ideia do teste foi com que o animal associasse aroma, textura e sabor para assim ter seu tratamento preferido. Um dos fatores que pode ter sido o diferencial para o blend em todas as posições ter sido o primeiro a ser escolhido, pode dar-se pelo seu aroma diferenciado devido aos extratos de romã e própolis em sua composição, que após o período de armazenamento se intensificaram.

Este experimento foi adaptado de Li et al. (2018) que desenvolveram um procedimento de ranqueamento de preferência canina, levando em consideração a ordem de escolha e tempo como forma de avaliação. Segundo o estudo a escolha dos cães no início de cada fase de testes se deu principalmente, se não exclusivamente, pelo aroma do petisco, foi observado que ao longo dos testes os cães começaram a associar as qualidades sensoriais tais como, aroma, textura e sabor de cada petisco, porém o estudo indica que os animais deveriam ser expostos durante mais tempo aos petiscos para se obter uma real certeza da preferência.

Neste estudo, observou-se que os cães apresentaram comportamento semelhante ao estudo aos cães que foram mencionados no trabalho, como: demarcação de território, exploração do local de teste, interação com o examinador, etc.

6. CONCLUSÃO

Os biscoitos assados contendo o blend de extratos de romã e própolis foram tão eficientes quanto o hexametáfosfato de sódio para a redução da área coberta por cálculo dentário. A utilização de biscoitos assados reduziu a prevalência de bactérias gram-negativas e aumentou a população de gram-positivas, no entanto, são necessárias avaliações mais aprofundadas para observar o efeito dos aditivos no perfil do microbioma a nível de gênero e espécie. Os biscoitos contendo o blend apresentou ser a primeira escolha no ranqueamento.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho como um todo obteve resultados muito interessantes principalmente levando em consideração a falta de trabalhos que utilizem fitogênicos como aditivos em alimentos para cães. Quando falamos de redução de área coberta por cálculo dentário observou-se o resultado de redução de 40% no blend em um período de 18 dias, acredito que se o fornecimento dos biscoitos continuasse por um período maior talvez esse valor fosse maior ainda. Quando falamos de microbioma o perfil de bactérias se alterou no período de experimento, levando em consideração que foram trabalhados apenas os filós houve uma possível melhora na saúde oral dos animais, entretanto serão necessária avaliações mais aprofundadas para avaliar o microbioma a nível de gênero e principalmente espécie, aumentando assim sua especificidade. Sobre o teste de preferência e ranqueamento, os resultados foram interessantes apesar do curto período de tempo, para uma avaliação mais aprofundada os períodos tanto de adaptação quando de teste em si deveriam ser estendidos.

Este trabalho contribuiu de diversas formas tanto vida pessoal quanto profissional, me ensinou o verdadeiro trabalho em equipe, o quanto comunicação e organização são essenciais para um bom resultado. Me proporcionou aprender sobre diversos assuntos que durante minha graduação tive pouco ou nenhum contato.

8. REFERÊNCIAS

- ADEPU, R. et al. **A clinical study on the incidence of periodontal diseases in dogs and their surgical management**. The Pharma Innovation Journal, Neva Deli, v. 7, n. 4, p. 290-292, abr. 2018.
- ABADALLA, S. L. **Análise computadorizada para avaliação do índices de placa bacteriana e cálculo dentário em cães (Canis familiaris)**. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Ciências Clínicas) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ. 2008.
- Abdalla, S. et al. **Quantificação computadorizada dos índices de placa e cálculo dentais da imagem digital da superfície vestibular dos dentes de cães**. Pesq. Vet. Bras 29(8): 666-672. 2009.
- AGA, H. et al. **Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis**. Biosci Biotechnol Biochem, Tokio, v.58, n.5, p.945–946, 1994.
- ALAKER, R. P. et al. **Prevalence of Porphyromonas and Prevotella species in the dental plaque of dog**. Vet. Record, v. 140, p. 147-148, 1997.
- Aldrich, G. C.; Koppel, K. (2015). **Pet food palatability evaluation: A review of standard assay techniques and interpretation of results with a primary focus on limitations**. Animals, 5, 43–55.
- Amorim, T. C. et al. **Terapêutica odontológica com fitofármaco**. XX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba. 2016.
- Araujo, J. A.; Milgram, N. W. (2004). **A novel cognitive palatability assessment protocol for dogs**. Journal of Animal Science, 82, 2200–2206.
- Araujo, J. A. et al (2004). **Comparison of the cognitive palatability assessment protocol and the two-pan test for use in assessing palatability of two similar foods in dogs**. American Journal of Veterinary Research, 65, 1490–1496.

- AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, Ö. **The oral microbiota: living with a permanent guest.** DNA and cell biology, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009.
- BAIA, J. D. et al. **Doença periodontal em cães: revisão de literatura.** Scientific Electronic Archives, Mato Grosso, v. 10, n. 5, p. 150-162, out. 2017.
- BANKOVA, V. et al. **Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis.** Z Naturforsch C, Tübingen, v.50, n.3-4, p.167–172, 1995.
- BANKOVA, V. et al. **Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China.** J Ethnopharmacol, Limerick, v.72, n.1-2, p.239–246, 2000.
- BROOK, A.; NIEMIEC, D.V.M. **Periodontal disease – topical review.** Companion Animal Medicine, Santa Bárbara, v. 23, n. 2, p. 72-80, 2008.
- BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. **Natural flavonoids as antimicrobial agents.** JANA, v. 7, n. 2, p. 9-16, 2004.
- CAMPBELL, R. D. et al. **Comparing intraoral radiography and computed tomography for detecting radiographic signs of periodontitis and endodontic disease in dogs: an agreement study.** Frontiers in Veterinary Science, Lausanne, v. 3, n. 68, p. 1-9, ago. 2016.
- CARDOSO, J. K. **Mensuração sérica de interleucina-1 β , interleucina 6, interleucina 10 e fator de necrose tumoral α em cães com doença periodontal crônica.** 2012. 118 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- Cleland Jr, W. P. (2000). **"Nonsurgical periodontal therapy."** Clin Tech Small Anim Pract 15(4): 221-225."
- CORRÊA, H.L; VENTURINI, M.A.F.A. **Cálculo dentário subgingival.** Clínica Veterinária, v.1, n.5, p.6-7, 1996.
- COX, L.P.; LEPINE, A.J.; CAREY, D.P. 2003. **Influencias nutricionales en la salud dental del perro.** Revista de Medicina Veterinária de Buenos Aires. 83(1):265-272.
- DE MARCO, V., GIOSO, M. A. **Doença periodontal em cães e gatos: profilaxia e manejo dietético.** Ver. Clin. Vet., v.2, p.24-28, 1997.

- DEBOWES, L.J. (2010b). **Problems with the gengiva**. In: Niemiec BA (Ed.), Small Animal Dental Oral and Maxillofacial Disease, a Color Handbook (pp. 159-181). London: Manson
- DISILVESTRO, R.A.; DISILVESTRO, D.J.; DISILVESTRO, D.J. **Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk**. Phytotherapy Research, v.23, n.8, p.1123- aug, 2009.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 3. p. 86-89.
- ELLIOTT, D.R. et al. (2005). **Cultivable oral microbiota of domestic dogs**. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5470–5476.
- ETTINGER, S.; FELDMAN, E. C.(2010). **Veterinary Internal Medicine**. Canada, Saunders Elsevier.
- FAHRENKRUG, P. (2007). "**Problemas dentales en el perro joven**." Proceedings of the SEVC-AVEPA Conference, Barcelona(2).
- FERNANDES, N. A. et al. **Prevalence of periodontal disease in dogs and owners' level of awareness - a prospective clinical trial**. Revista Ceres, Viçosa, v. 59, n. 4, p. 446-451, jul/ago. 2012.
- FRAGUA, V. et al. (2015). **Evaluation of the use of esterified fatty acid oils enriched in medium-chain fatty acids in weight loss diets for dogs**. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 48–59.
- GARCIA, Z.; DIAS, G. G. (2008). "**Doença periodontal em cães**." Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária 11.
- GIOSO, M. A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 2ª ed. São Paulo, 2007.13p.
- GIOSO, M. A. **Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais**. 3. Ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1994. 51 p.
- GORREL, C. (2004). **Periodontal disease**. In: **Veterinary Dentistry for the General Practitioner**. (pp.87-109). Philadelphia: Elsevier Saunders.

- GORREL, C. Anatomia e fisiologia. In:_____. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap 1, p. 3-7.
- GORREL, C.; BIERER, T.L. **Long-term effects of a dental hygiene chew on the periodontal health of dogs**. J. Vet. Dent., v.16, p.109-113, 1999.
- GORREL, C.; RAWLINGS, J.M. **The role of a 'Dental Hygiene Chew' in maintaining periodontal health in dogs**. J. Vet. Dent., v.13, p.31-34, 1996.
- GREENAWAY, W. et al. **Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis**. Z Naturforsch C, Tübingen, v.46, n.1-2, p.111– 121, 1991
- HA, J. D. A. V. **Prevalência de afecções orais e fatores de risco para a doença periodontal em cães**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2013.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C.A. **Advances in flavonoid** research since 1992. Phytochemistry, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.
- HARDHAM, J. et al(2005). **Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis**. Vet Microbiol, 106 (1-2), 119-128.
- HARVEY, C.E. (1998). **Periodontal disease in dogs: Etiopathogenesis, prevalence, and significance**. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 28(5), 1111-1128.
- HEWSON-HUGHES, A. K. et al. (2013). **Geometric analysis of macronutrient selection in breeds of the domestic dog**, canis lupus familiaris.
- IKENO K, IKENO T, MIYAZAWA C. **Effects of propolis on dental caries in rats**. Caries Re. 1991; 25(5):.347-351
- JOHNSTON, N. (2002). "**Veterinary Dentistry Basics**." Royal Veterinary College(2): 1-10.
- KAUR, G. et al. **Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice**. Food and Chemical Toxicology, v. 44, n. 7, p. 984-993, 2006.

KLEIN, T. (2000). "**Predisposing factors and gross examination findings in periodontal disease.**" Clin Tech Small Anim Pract 15(4): 189-196.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos-: Texto e Atlas Colorido.** Artmed Editora, 2016.

KOO, H. et al. **Effect of Apis mellifera propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats.** Caries Res, Basel, v.33, n.5, p.393–400, 1999.

KOO. et al. **In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens.** Arch Oral Biol, Oxford, v.45, n.2, p.141–148, 2000.

KUETE, V. et al. **Antimicrobial activity of the methanolic extract from the bark of Trides moste monomphalocarpoides (Sapotaceae).** Journal of ethnopharmacology, v. 104, n. 1, p. 5-11, 2006.

KUJUMGIEV, A. et al. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** J Ethnopharmacol, Limerick, v.64, n.3, p.235 – 240, 1999.

KYLLAR, M.; WITTER, K (2005). "**Prevalence of dental disorders in pet dogs.**" Veterinarni Medicina 50(11): 496-505.

LANSKY, E.P.; NEWMANN, R.A. 2007. **Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer.** J Ethnopharmacol 109: 177- 206.

LI, H. et al. **Preference ranking procedure proposal for dogs: A preliminary study.** Journal of Sensory Studies, v. 33, n. 1, p. e12307, 2018.

LOGAN, E. I.; BOYCE, E.N. **Oral health assessment in dog: parameters and methods.** Journal of Veterinary Dentistry, v.11, n.2, p.58-63. 1994

LOVE, D.N. et al. **Phorphyromonas canoris sp.nov., an Asaccharolytic, Black-Pigmented species from the gingival sulcus of dogs.** Int. J. Syst. Bacteriol., v.44, p.204-208, 1994

- MAPA (2009). Instrução normativa 15/2009. Disponível
“<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1312271284>” Acesso: 25/01/2019.
- MAPA. (2004) Instrução normativa 13/2004. Disponível “” Acesso: 25/01/2019
- MARCUCCI, M. C. et al. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities**. J EthnophARMBORNE, J. B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.harmacol, Limerick, v.74, n.2, p.105–112, 2001
- MARCUCCI, M. C.; DE CAMARGO, F. A.; LOPES, C. M. A. **Identification of aminoacids in Brazilian propolis**. Z Naturforsch C, Tübingen, v.51, n.1-2, p.11–14, 1996.
- MARSHALL, M. D. et al. **A longitudinal assessment of periodontal disease in 52 Miniature Schnauzers**. BMC Veterinary Research, Londres, v. 10, n. 1, p. 166-179, set. 2014.
- MARX, F. R. et al. **Raw beef bones as chewing items to reduce dental calculus in Beagle dogs**. Australian Veterinary Journal, Sydney, v. 94, n. 1-2, p. 18-23, jan./fev. 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy of Science, 2006. 398p.
- NIEMIEC, B.A. (2013). **Veterinary Periodontology** (1ª Ed.). San Diego, California, USA: WileyBlackwell.
- OBA, P.M. et al. **Aditivos nutricionais empregados no controle e na melhora da saúde oral de cães e gatos**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP, Pirassununga/São Paulo – SP. 2014
- PAIVA, A.C. et al. **Eficácia dos coadjuvantes de higiene bucal utilizados na alimentação de cães**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.5, p.1177-1183, 2007.
- PATEL, N. et al. **The prevalence of canine oral protozoa and their association with periodontal disease**. Journal of Eukaryotic Microbiology, Mountain View, v. 64, n. 3, p. 286-292, set. 2016.

- PEREIRA, J.V. et al. **Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 16(1): 88-93, Jan./Mar. 2006.
- PINTO, A.B.F. et al. **Tripolifosfato de sódio e hexametáfosfato de sódio na prevenção do cálculo dentário em cães.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.60, n.6, p.1426-1431, 2008.
- RASHOTTE, M. E.; FOSTER, D. F.; AUSTIN, T. (1984). **Two-pan and operant lever-press tests of dogs' preference for various foods.** Euroscience & Biobehavioral Reviews, 8, 231–237.
- REZENDE, R. J. C. et al. (2004). **"Frequency of dental bacterial plate in dogs."** biosci. J. 20(2): 113-118.
- RIBEIRO, A. A. et al. **MICROBIOMA HUMANO: UMA INTERAÇÃO PREDOMINANTEMENTE POSITIVA.** REVISTA UNINGÁ REVIEW, v. 19, n. 1, 2014.
- RIGGIO, M. P. et al. (2011). **"Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease."** Vet Microbiol 150(3-4): 394-400.
- ROZA, M. R. **Odontologia em pequenos animais.** 1. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária LTDA. 2004. 361 p.
- SAIDLA, J. E. **Odontologia: considerações genéticas, ambientais e outras.** In.: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina veterinária interna: doenças do cão e do gato. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2014. v. 2. cap. 132. p. 1184.
- SANTOS, J. D. M. M. **Relação entre a doença periodontal e doenças sistêmicas bacterianas no cão: um estudo retrospectivo.** 2018. 70 p. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2018.
- SANTOS, N.S.; CARLOS, R.S.A; ALBUQUERQUE, G.R. **Doença periodontal em cães e gatos** – revisão de literatura. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; 2012; 10(32); 1-637.

SANTOS, V. R. **Propolis: Alternative Medicine for the Treatment of Oral Microbial Diseases**. Intech, 2012. url: <https://api.intechopen.com/chapter/pdf-download/41698>; acessado: 01/06/2019.

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

SEMEDO-LEMSADDEK, T. et al. **Enterococcal Infective Endocarditis following Periodontal Disease in Dogs**. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1-6, jan. 2016.

SFORCIN, J.M. et al. **Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity**. *J Ethnopharmacol*, Limerick, v.73, n.1-2, p.243–249, 2000.

SILVA, R. C. C. et al. **Eficácia de um gel de Quitosano Mucoadesivo contendo doxiciclina associada ou não ao meloxicam como coadjuvante ao tratamento da gengivite em cães portadores de doença periodontal**. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 40-44, nov. 2016.

SIMÕES, G. J. M. **Avaliação dos níveis séricos de proteína c reativa em cães com doença periodontal**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2016.

SINGH, R. et al. **Autophagy regulates lipid metabolism**. *Nature*, v. 458, n. 7242, p. 1131, 2009.

Ssmith, J.C. et al. (1984). **Finegrained measures of dogs' eating behavior in single-pan and two-pan tests**. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 8, 243–251.

STELLA, J.L.; BAUER, A.E.; CRONEY, C.C. **A cross-sectional study to estimate prevalence of periodontal disease in a population of dogs (*Canis familiaris*) in commercial breeding facilities in Indiana and Illinois**. Editora: Francesco Staffieri, University of Bari, ITALY. *PLOS ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191395>. 13p, 2018

STOOKEY G.K.; WARRICK J.M.; MILLER L.L. **Effect of sodium hexametaphosphate on dental calculus formation in dogs**. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.913-918, 1995.

STOOKEY, G.K.; WARRIK, J.M.; MILLER, L.L. et al. **Hexametaphosphate-coated snacks biscuits significantly reduce calculus formation in dogs.**

TATAKIS, D.N.; KUMAR, P.S. **Etiology and Pathogenesis of Periodontal Diseases.** Dental clinics of North America, Philadelphia, v.49, p.491-516, 2005.

TEIXEIRA, P. M. **Doença periodontal em cães: nível de conhecimento dos proprietários acerca da doença e da sua profilaxia.** 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2016.

TELHADO, J. et al. (2004). "**Incidência de cálculo dentário e doença periodontal em cães de raça pastor alemão.**" Ciência Animal Brasileira 5(2): 99-104.

TUTT, C. (2006). **Small Animal Dentistry**, Blackell Publishing.

VELURI, R. et al. **Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 52, n. 5, p. 1077-1082, 2004.

VERBRUGGHE, A. et al. (2007). **The effect of salmon oil freshness on the palatability of dog foods.** Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 76, 201–207.

WANG, R. et al. **Pomogranate: constituents, bioactivities and Pharmacokinetics.** Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. v. 4, n. 2, p. 77-87, 2010.

WHYTE, A. et al. **Anatomia, estrutura e nomenclatura dental** In: SAN ROMÁN, F. et al. Atlas de Odontologia de Pequenos Animais. São Paulo: Manole, 1999. cap 02. p.17-38.

WHYTE, A. et al. **Canine stage 1 periodontal disease: a latent pathology.** The Veterinary Journal, Idaho, v. 201, n. 1, p. 118-120, abr. 2014.