



**FACULDADE DE PINDAMONHANGABA**

**Caroline Marinho Cruz  
Ana Flávia de Oliveira Boaventura  
Danielle Cristina Pereira de Almeida**

***STAPHYLOCOCCUS* spp. E ENTEROBACTÉRIAS NA  
CAVIDADE BUCAL DE RATOS FUMANTES PASSIVOS E  
CONTROLE**

**Pindamonhangaba – SP  
2012**



**Caroline Marinho Cruz  
Ana Flávia de Oliveira Boaventura  
Danielle Cristina Pereira de Almeida**

***STAPHYLOCOCCUS* spp. E ENTEROBACTÉRIAS NA  
CAVIDADE BUCAL DE RATOS FUMANTES PASSIVOS E  
CONTROLE**

Monografia a ser apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba.

Orientador: Profa. Dra. Silvia R. Querido Mateus  
Co-orientador: Claudemir de Carvalho

**Pindamonhangaba – SP  
2012**

Almeida, Danielle Cristina Pereira; Boaventura, Ana Flávia de Oliveira; Cruz, Caroline Marinho

*Staphylococcus spp.* e Enterobactérias na cavidade bucal de ratos fumantes passivos e controle / Ana Flávia Boaventura; Caroline Marinho Cruz; Danielle Cristina Pereira de Almeida / Pindamonhangaba –SP: FAPI Faculdade de Pindamonhangaba, 2012. 29f

Monografia (Graduação em Farmácia) FAPI-SP.  
Orientador: Prof. Dr. Claudemir de Carvalho

1 *Staphylococcus spp.* 2 Enterobactérias. 3 Fumantes. 4 Cavidade bucal  
I *Staphylococcus spp.* e Enterobactérias na cavidade bucal de ratos fumantes passivos e controle II Ana Flávia Boaventura; Caroline Marinho Cruz; Danielle Cristina Pereira de Almeida.



**Ana Flávia de Oliveira Boaventura**  
**Caroline Marinho Cruz**  
**Danielle Cristina Pereira de Almeida**

***STAPHYLOCOCCUS SPP. E ENTEROBACTÉRIAS NA CAVIDADE BUCAL DE  
RATOS FUMANTES PASSIVOS E CONTROLE***

Monografia a ser apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba.

Orientador: Profa. Dra. Silvia R. Querido Mateus  
Co-orientador: Claudemir de Carvalho

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

Prof. \_\_\_\_\_ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. \_\_\_\_\_ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. \_\_\_\_\_ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura \_\_\_\_\_

Dedicamos este trabalho de conclusão da graduação a Deus sendo Ele nosso refúgio e fortaleza nos momentos mais difíceis, aos pais, irmãos, familiares, namorados e amigos que de muitas formas nos incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho. A orientadora ao Profa. Dra. Silvia Rodrigues e ao Coorientador Prof. Dr. Claudemir Carvalho e a Marcela, responsáveis pela a realização deste trabalho e pelo empenho, paciência e credibilidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo a Deus, pai misericordioso que sempre esta ao meu lado e por me privilegiar de exercer uma profissão magnífica.

Aos meus Pais, Luiz Flávio e Roseli que me deram toda a estrutura para que me tornasse a pessoa que sou hoje.

Ao meu irmão Marcus Vinícius, por estar sempre presente, na minha vida a cada dia nos tornarmos mais amigos.

Aos minhas amigas Danielle, Gabriella, Sirlene, Ana Carolina, Paula e Caroline ao longo desses meus quatro anos, posso considerar como verdadeiras amigas.

A meu noivo Luiz Henrique ofereço um agradecimento mais do que especial, por ter vivenciado comigo passo a passo desta jornada.

Agradeço meus familiares minha avó Oswaldina e minha tia Ophelia (em memória) que sempre acreditaram muito no meu trabalho e me ajudaram no que foi preciso.

A todos os meus professores, futuros colegas e acima de tudo por terem se tornado grandes amigos, fizeram com que eu continuasse e chegasse até onde cheguei.

Ana Flavia

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Agradeço também a minha mãe por ter me dado a oportunidade de cursar este curso e por todo apoio, compreensão, paciência, ajuda e incentivo. Obrigada pelos sacrifícios que você fez em razão a minha educação.

Agradeço ao meu namorado que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Agradeço à minha família, por estarem a postos sempre que precisei e por todo o esforço que me permitiu estar aqui.

Nesse momento, sintetizo um agradecimento especial a Danielle e a Ana Flavia pela ajuda nesse trabalho e a todos os meus amigos que fizeram parte da minha vida durante esses quatro anos de graduação, proporcionando e ao mesmo tempo dividindo momentos de alegrias, tristezas, experiências e conquistas.

Agradeço todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente e torceram pela concretização desta conquista.

Caroline Marinho

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que tem me proporcionado.

Aos meus pais, José Paulo e Maria Luiza, por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar, nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grata.

Ao meu noivo Luís, pelo apoio e incentivo durante toda essa minha jornada, por compreender a importância dessa conquista.

Ao meu avô José, pelos sorrisos que me mostravam diariamente que não podemos nos abater pelas angústias do dia-a-dia.

As minhas irmãs Dayana, Laura e Livian, pela segurança e pelo apoio incondicional, sempre me incentivando a correr atrás dos meus objetivos.

As grandes amigas que fiz ao longo desta caminhada na FAPI, pelas histórias, os longos papos e risadas, principalmente pelas agradáveis lembranças que serão eternamente guardadas no coração, muito obrigado.

As amigas Ana Flávia e Caroline por estarem comigo neste trabalho, pois sem elas, ele não seria o mesmo.

A todos os familiares, tios, tias e primos que torceram e acreditaram na conclusão deste curso, fico muito grata.

Danielle Almeida.

Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas... Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma de ontem me faz perceber que valeu a pena.

Albert Einstein

## RESUMO

Estudos tem demonstrado que o hábito de fumar cigarros é um fator de risco para a saúde. Os danos ao organismo humano proveniente do tabagismo não afetam apenas as pessoas que fumam, mas atingem a não fumantes que vivem sob a poluição da fumaça de cigarro. A mucosa bucal, de modo similar a outras partes do corpo, apresenta uma microbiota natural, com composição característica e o cigarro assim como outros fatores podem causar um desequilíbrio nesta microbiota. Portanto o trabalho objetivou-se em determinar se há alterações, observando a presença de *Staphylococcus* spp. e Enterobactérias na cavidade bucal de ratos fumantes passivos. Foram utilizados 18 ratos adultos, machos, distribuídos, através de um sorteio aleatório, em dois grupos, controle e fumantes passivos. Cada animal foi anestesiado e em seguida, a microbiota bucal foi coletada por meio de *swabs* estéreis embebidos de solução salina (NaCl 0,9%), esterilizada. Após coleta, o *swab* foi semeado em placas de Petri, contendo ágar Salgado e ágar MacConkey, para isolamento de *Staphylococcus* spp. e Enterobactérias, respectivamente. Assim, avaliando os resultados obtidos de acordo com os testes paramétricos e não paramétricos, não houve diferença significativa para *Staphylococcus* spp. e Enterobactérias. Observou-se que fumantes passivos por estar em contato com a fumaça, a sua microbiota bucal não sofre diferença em relação à presença destas bactérias.

Palavras chaves; *Staphylococcus* spp. Enterobactérias. Fumantes. Cavidade bucal.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
1.1 Nicotina.....	14
1.2 Fumante Passivo .....	15
1.3 Microbiota Bucal .....	17
1.4 Enterobactérias ou Enterobacteriaceae .....	18
1.5 Staphylococcus spp.....	18
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
1.6 Aspectos Éticos e Legais da Pesquisa.....	19
1.7 Seleção da amostra .....	19
1.8 Divisão dos grupos.....	19
1.9 Anestesia.....	19
1.10 Exposição a fumaça de Cigarro .....	19
1.11 Coleta de secreção da cavidade bucal .....	20
<b>4. RESULTADO.....</b>	<b>21</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>25</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O tabagismo é amplamente reconhecido como uma doença crônica gerada pela dependência da nicotina, estando por isso inserido na Classificação Internacional de Doenças.<sup>1</sup>

Considerado um problema de saúde pública, o tabagismo acomete milhares de pessoas e leva a dependência química similar a outras drogas, sendo que o cigarro pode acarretar em diversas outras doenças, tais como infarto do miocárdio, derrames e enfisemas, podendo em sua forma mais grave gerar um câncer.

A cavidade bucal é a primeira a ser afetada pelo hábito de fumar, que causa diversas alterações locais e sistêmicas e de acordo com Ministério da Saúde <sup>2</sup>, portaria nº 1575 de 29 de agosto de 2002, há no mundo mais de 1 bilhão e 200 milhões de fumantes consumidores de nicotina, com isso estima-se que 2 bilhões de pessoas não fumantes inalam nicotina por viverem expostas à poluição tabágica ambiental. Mais da metade da humanidade inala nicotina diretamente quando são fumantes e indiretamente quando convivem com fumantes.

Sendo assim, mesmo os indivíduos não fumantes correm sérios riscos de desenvolver doenças cardiovasculares, asma, pneumonias, sinusites, entre outras, pois a fumaça do cigarro quando inalada possui diversas substâncias químicas, sendo a nicotina a substância mais farmacologicamente ativa. A maior parte da nicotina parte é absorvida pela mucosa alveolar, indicando que o fumante passivo também pode sofrer alterações na microbiota bucal.

A mucosa da boca, de modo similar a outras partes do corpo, apresenta uma microbiota natural, com composição característica e o cigarro assim como outros fatores pode causar um desequilíbrio nesta microbiota.

Neste contexto o propósito do presente estudo foi analisar a presença de *Staphylococcus* spp. e Enterobactérias na cavidade bucal de ratos fumantes passivos e não fumantes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Nicotina

O tabaco é uma das principais causas de morte prematura em todo mundo. Segundo a estimativa da Organização Mundial da Saúde, quatro milhões de pessoas morrem a cada ano devido às doenças causadas diretamente pelos derivados do tabaco.<sup>3</sup>

O tabaco é obtido a partir de duas espécies vegetais, a *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana rustica*, nativas dos Andes peruanos e equatorianos. Essas plantas foram descobertas há aproximadamente 1.800 anos, época em que populações asiáticas que migraram para a América.<sup>4</sup>

A nicotina é um alcalóide vegetal e sua fonte principal é a planta do tabaco. Esta substância é sintetizada nas raízes, subindo pelo caule até as folhas.<sup>5</sup>

O fumante não consome a nicotina pura, usando seu invólucro, que é o tabaco no qual está embutida. O tabaco por sua vez contém mais de 6000 substâncias tóxicas, por isso é abordado alguns aspectos da problemática do tabagismo, de sua epidemiologia e medidas para o seu controle.<sup>6</sup>

A nicotina induz tolerância e dependência pela ação nas vias dopaminérgicas centrais, levando às sensações de prazer e recompensa mediada pelo sistema límbico. É estimulante do sistema nervoso central (SNC), aumenta o estado de alerta e reduz o apetite. A diminuição de 50% no consumo da nicotina pode desencadear sintomas de abstinência nos indivíduos dependentes: ansiedade, irritabilidade, distúrbios do sono, aumento do apetite, alterações cognitivas se fissura pelo cigarro. A fumaça do cigarro consiste de substâncias químicas voláteis (92%) e material particulado (8%) resultantes da combustão do tabaco. A nicotina, uma amina terciária volátil, é o componente ativo mais importante do tabaco.<sup>7</sup> Quando a temperatura da brasa do tabaco atinge cerca de 80°C, surgem formas racêmicas da nicotina, as quais formam quatro nitrosaminas com potencial cancerígeno. Todavia, cerca de 35% da nicotina são destruídos no momento da combustão do cigarro, mais 35% são perdidos com a fumaça não inalada e 8% com a porção não fumada. Assim, cada cigarro contém 7-9 mg de nicotina, dos quais pouco mais de 1 mg é absorvido pelo fumante.<sup>5</sup>

A nicotina é rapidamente absorvida pelos pulmões, atingindo o cérebro em dez segundos e sendo distribuída para todos os sistemas. A meia-vida de eliminação da nicotina é

de aproximadamente duas horas. Sua metabolização ocorre principalmente no fígado. Apenas 5% da nicotina são excretados em sua forma original pelos rins. Seu metabólito principal é a cotinina, cuja detecção pode ser sistematizada como um coadjuvante no tratamento da dependência de nicotina, monitorando a abstinência.<sup>8</sup>

A partir da síntese do cigarro diversas substâncias químicas ficam contidas no produto final, estas substâncias são predominantemente tóxicas e os riscos inerentes a estas substâncias a seguir: Amônia ( $\text{NH}_3$ ); Propilenoglicol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ ); Acetato de chumbo [ $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ ]; Formol ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); Pólvora; Methoprene; Cádmio ( $\text{Cd}$ ); Naftalina ( $\text{C}_{10}\text{H}_8$ ); Fósforo ( $\text{P}_4$  ou  $\text{P}_6$ ); Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ); Terebentina; Xileno ( $\text{C}_8\text{H}_{10}$ ); Butano ( $\text{C}_4\text{H}_{10}$ ).<sup>9</sup>

De acordo com Organização Mundial da Saúde, “na atualidade o consumo diário são de 200 toneladas de nicotina, totalizando 73 mil toneladas por ano. Mais da metade da humanidade inala nicotina diretamente quando são fumantes e indiretamente quando convivem com fumantes. Há no mundo em torno de 1 bilhão de pessoas dependentes da nicotina”.<sup>10</sup>

Johnson<sup>11</sup>, Morozumi<sup>12</sup> e Lindhe<sup>13</sup> declararam que os malefícios causados pelo fumo devem-se às substâncias relacionadas ao tabaco, como a nicotina e o monóxido de carbono, que causam alterações imunológicas, reduzindo a imunoglobulina G (IgG) e prejudicando a função dos neutrófilos e macrófagos. Também propiciam efeitos vasoconstritores, reduzindo o fluxo sanguíneo de forma crônica, causam efeitos citotóxicos sobre tecidos e células, afetando os fibroblastos e, por fim, alteram a microbiota patogênica, aumentando sua prevalência.

## **1.2 Fumante Passivo**

Os danos ao organismo humano provenientes do tabagismo não afetam apenas as pessoas que fumam, mas atingem as não fumantes que vivem sob poluição pela fumaça de cigarros nos domicílios, nos ambientes de trabalho, de lazer, escolas e demais espaços públicos fechados. A fumaça inalada pelos fumantes passivos ou involuntários é responsável por grande parte das doenças tabaco-relacionadas incidentes nestes indivíduos, em particular o câncer de pulmão.<sup>14</sup>

Nas grandes cidades, o fumo polui mais séria e nocivamente o ambiente do que as indústrias e os veículos automotores. Sabe-se que a fumaça do cigarro é uma mistura de mais

de 4 mil componentes, entre eles encontramos muitos que são farmacologicamente ativos e que são tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos.<sup>15</sup>

A fumaça do cigarro pode gerar efeitos nocivos tanto para fumantes, mas também os que estão ao seu lado e que constitui o que se denomina fumante passivo.<sup>16</sup>

O fumante passivo, pode conter no sangue, urina e saliva, quantidade de nicotina equivalente à encontrada em fumantes de 1 a 10 cigarros/dia, dependendo do número de horas de exposição e da poluição ambiental.<sup>17</sup>

A absorção da fumaça do cigarro por aqueles que convivem em ambientes fechados com fumantes pode causar inúmeras alterações em adultos não-fumantes que o maior risco de doença por causa do tabagismo é proporcionalmente ao tempo de exposição à fumaça, sendo assim possui um risco 30% maior de câncer de pulmão e 24% maior de infarto do coração do que os não-fumantes que não se expõem. Já em crianças ocorrem com maior frequência resfriados, infecções do ouvido e doenças respiratórias como pneumonia, bronquites e exacerbação da asma. Em bebês o risco é cinco vezes maior de morrerem subitamente sem uma causa aparente (Síndrome da Morte Súbita Infantil), e possuem um maior risco de doenças pulmonares em bebês de até 1 ano de idade, proporcionalmente ao número de fumantes em casa.<sup>10</sup>

Fumantes passivos também sofrem os efeitos imediatos da poluição tabagística ambiental, tais como, irritação nos olhos, manifestações nasais, tosse, cefaléia, aumento de problemas alérgicos, principalmente das vias respiratórias e aumento dos problemas cardíacos, principalmente elevação da pressão arterial e angina (dor no peito). Outros efeitos a médio e longo prazo são a redução da capacidade funcional respiratória (o quanto o pulmão é capaz de exercer a sua função), aumento do risco de ter aterosclerose e aumento do número de infecções respiratórias em crianças.<sup>18</sup>

Os dois componentes principais da poluição tabagística ambiental (PTA) são a fumaça exalada pelo fumante (corrente primária) e a fumaça que sai da ponta do cigarro (corrente secundária). Sendo, esta última o principal componente da PTA, pois em 96% do tempo total da queima dos derivados do tabaco ela é formada. Porém, algumas substâncias, como nicotina, monóxido de carbono, amônia, benzeno, nitrosaminas e outros carcinógenos podem ser encontradas em quantidades mais elevadas.<sup>19</sup>

### 1.3 Microbiota Bucal

Já foram identificados mais de 700 espécies bacterianas na cavidade bucal humana<sup>20</sup>, sendo que a saliva pode conter até  $10^8$  micro-organismos/ml.<sup>21</sup>

A microbiota, ou sua alteração, é também investigada nos indivíduos expostos a fatores de risco para câncer de boca, cigarro e álcool, os quais modificam o habitat local, em relação à microbiota de indivíduos não expostos a esses fatores.<sup>22</sup>

A saliva pode ser utilizada para pesquisa de avaliação da microbiota salivar especificamente da composição bacteriana<sup>23</sup> e composição de leveduras.<sup>24</sup>

Ainda não existe um consenso em relação à composição da microbiota bucal de tabagistas comparada a de não-tabagistas. Enquanto alguns estudos não demonstraram diferenças microbianas significativas entre esses indivíduos<sup>25,26,27</sup>, outros sugeriram que o tabaco poderia levar a uma alteração na microbiota bucal.<sup>28,29</sup>

A cavidade bucal, por exemplo, apresenta uma das mais concentradas e variadas populações microbianas, cuja localização principal está no dorso da língua, no sulco gengival e no biofilme dentário<sup>13</sup>. Estima-se que a saliva contém 108 bactérias/mL e biofilme dentário, 1011 bactérias/mL. Participam desta microbiota numerosos gêneros, como: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacteoides*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Mycoplasmae* e outros.<sup>30</sup> Na verdade, os fumantes são 18 vezes mais propensos a abrigar bactérias na cavidade em comparação com não fumantes.<sup>31</sup>

Isogai et al.<sup>32</sup>, isolaram mais de 15 espécies bacterianas bucais de ratos, dentre estas os tipos predominantemente isolados na saliva, no dorso da língua, na mucosa bucal e no sulco gengival.

Colman descreve que os fatores de risco para o câncer de boca, fumo e álcool, promovem alterações no habitat local. Estudos realizados a partir da avaliação da variabilidade da microbiota bucal, demonstraram que o fumo tem propriedade antibacteriana (fenóis que danificam a membrana de células bacterianas), além de gerar condições anaeróbicas na mucosa bucal, favorecendo o crescimento de anaeróbios estritos entre eles, micro-organismos Gram-negativos (apud Rojas<sup>33</sup>).

Segundo Martins et al.<sup>34</sup> os fatores que modificam esse equilíbrio podem ser de ordem local ou sistêmica. Entre os fatores locais destacam-se: xerostomia, uso de antibióticos e corticosteróides, dieta rica em carboidratos, câncer bucal, uso de próteses e aparelhos ortodônticos, associação com outras doenças bucais e hábito de fumar.

## 1.4 Enterobactérias

São características dos membros da família *Enterobacteriaceae* se apresentarem em forma de bacilos Gram-negativos, medindo em geral 0,3-1,8µm. Estes microrganismos podem ser imóveis ou móveis. São anaeróbios facultativos e quimioorganotróficos, tendo tanto o metabolismo aeróbico como o fermentativo. A maioria das espécies se desenvolve bem a temperatura de 37°C, entretanto algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30°C e são frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas. Existem gêneros psicrotróficos frequentemente encontrados no solo, água e trato gastrointestinal dos seres humanos e animais.<sup>35,36</sup>

Enterobactérias em sua maioria habita intestinos do homem e de animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes infecciosos.<sup>37</sup> Onde estão frequentemente associadas a infecções oportunistas em doentes com as defesas naturais comprometidas.<sup>38</sup>

## 1.5 Gênero *Staphylococcus spp.*

São bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae*, possuem células esféricas (0,5 – 1,5 µm), Gram-positivas que podem ser encontradas isoladas, aos pares e em grupamentos irregulares. São imóveis e não esporulados. São anaeróbios facultativos, quimioorganotróficos com metabolismo fermentativo e respiratório. A temperatura ótima de crescimento é de 30 – 37°C. Estão associadas à pele e membranas mucosas de animais vertebrados de sangue quente, podendo ser, eventualmente, isolados de produtos alimentares, poeira e água. Muitas espécies são patogênicas para o homem e animais, uma vez que produzem toxinas extracelulares.<sup>35</sup>

Tanto no homem como nos animais, *Staphylococcus spp.* podem colonizar a pele e membranas mucosas e estar presentes transitoriamente no trato intestinal, sendo que a colonização é desprovida de sintomas, ou seja, o indivíduo desenvolve infecção.<sup>39</sup>

Em vários casos poderá surgir uma superinfecção, que corresponde a uma alteração na microbiota benéfica e aumento de patógenos potencialmente prejudiciais ou oportunistas, onde o seu desenvolvimento, poderá ocorrer em diversos tecidos do organismo, inclusive na cavidade bucal.<sup>40</sup> Esta superinfecção pode envolver micro-organismo resistentes como o exemplo *Staphylococcus spp.*<sup>41</sup>

### **3. METODOLOGIA**

#### **1.6 Aspectos Éticos e Legais da Pesquisa**

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Pindamonhangaba, sob o protocolo 020/2012.

#### **1.7 Seleção da amostra**

Foram utilizados 18 ratos adultos, machos, da raça Wistar, pesando entre 300 e 400g. Os animais foram produzidos e mantidos no Biotério da Faculdade de Pindamonhangaba, em gaiolas plásticas, com temperatura controlada em  $23\pm 2$  °C, regime de 12 horas de luz, com acesso a comida e água *ad libitum*.

#### **1.8 Divisão dos grupos**

Os 18 ratos utilizados foram distribuídos, através de um sorteio aleatório, em dois grupos (G1 e G2) com 9 animais cada. Para cada grupo foram utilizadas duas gaiolas com quatro e cinco animais cada.

Os animais do grupo 1 (G1) foram expostos a fumaça de cigarro três vezes ao dia, por 60 dias.

Os animais do grupo 2 (G2) **não** foram expostos a fumaça de cigarro.

#### **1.9 Anestesia**

Para anestesia geral dos animais, foram utilizados os anestésicos Cloridrato de Quetamina e o Cloridrato de Xilazina diluídos na proporção 1:1 e aplicados na dosagem de 0,2 ml para cada 100 gramas de peso corpóreo, no músculo da coxa do animal.<sup>42</sup>

#### **1.10 Exposição a fumaça de Cigarro**

De acordo com Duarte<sup>43</sup> modificado, os animais do grupo experimental GCS (divididos em dois subgrupos) foram expostos durante 60 dias à fumaça de cigarro, seguindo-se o seguinte protocolo: a) inicialmente os animais passarão por um período de adaptação<sup>40</sup>

que será constituído de dois dias, onde no primeiro dia estes ficarão expostos por períodos de cinco minutos, no segundo dia sete minutos e a partir do terceiro dia os animais serão expostos em três períodos diários de oito minutos; b) exposição à fumaça de cigarros-experimentais com filtro), por três períodos diários de oito minutos.

### **1.11 Coleta de secreção da cavidade bucal**

Conforme método utilizado de Porto et al.<sup>44</sup>, cada animal foi anestesiado e colocado deitado na posição de decúbito dorsal. Em seguida, a microbiota bucal foi coletada por meio de *swabs* estéreis embebidos de solução salina (NaCl 0,9%), esterilizada.

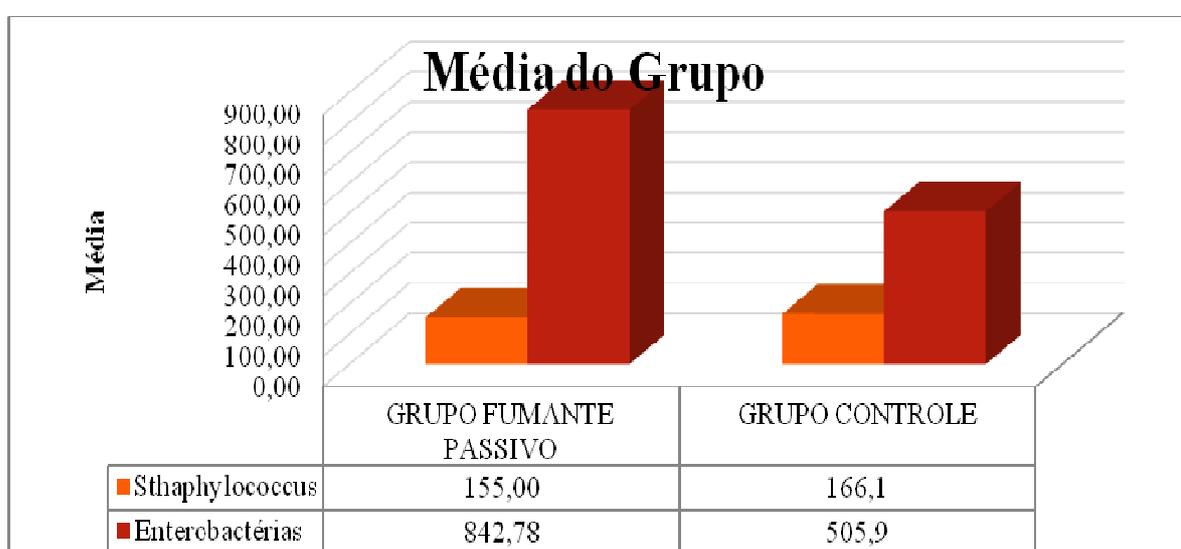
Após coleta, o *swab* foi semeado em placas de Petri contendo, ágar Salgado e ágar-MacConkey, para isolamento de *Staphylococcus spp.* e Enterobacteriaceae, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas.

Após incubação realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), com o auxílio do contador de colônias eletrônico.

#### 4. RESULTADO

Os resultados foram avaliados conforme as características da distribuição amostral. Foram utilizados não paramétricos Mann-whitney sendo empregados de acordo com a normalidade dos resultados, do nível de significância de 5%, utilizando como ferramenta o software bioEstat 5.0.

Dos 18 ratos analisados, apresentaram crescimento de *Staphylococcus spp.* e Enterobactérias conforme analisado na gráfico 1.



**Gráfico 1:** Médias entre os grupos

Grupos	<i>Staphylococcus</i> spp.	Enterobactérias	Fumantes Passivos	Controle
Valor de p	0,9415	0,2173	0,2697	0,6911

**Tabela 1:** Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Desta análise, obteve-se a média de 842 (11,10%) UFC de Enterobactérias e 155 (11,12%) UFC de *Staphylococcus* spp. em ratos fumantes passivos. Em relação ao grupo controle obteve-se a média de 505 (13,9%) de Enterobacterias e 166 (12,27%) de *Staphylococcus* spp. Das quais não houve diferença significativa entre *Staphylococcus* spp. (p=0,9415) e Enterobacterias ( p=0,2173).

A partir dos dados analisados, o grupo de ratos fumantes passivos (p=0,2697) e grupo controle (p=0,6911), não apresentaram diferença estatística em relação à UFC da microbiota bucal de ratos fumantes passivos e não fumantes, sendo que para ser estatisticamente significativos deve ser  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo os resultados estão de acordo com os apresentados por MacGregor<sup>45</sup>, que mostraram níveis de biofilme dentário semelhantes entre fumantes e não fumantes.

No parâmetro clínico microbiota, vários autores encontraram associação com o tabagismo, enquanto outros autores não tiveram a mesma conclusão. Autores como Bergstrom et al.<sup>46</sup> analisaram a relação do fumo com várias bactérias, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides intermedius* e concluíram que o tabagismo não interfere na microbiota, mas sim nos tecidos periodontais, deixando-os mais susceptíveis para a ação de periodontopatógenos, comprometendo a saúde periodontal.

Existem estudos que nos fornecem informação abundante da relação entre o tabagismo e a microbiota bucal, cuja força varia, dependendo dos critérios usados para identificar as bactérias, a periodontite e os efeitos do biofilme e outras variáveis estão relacionadas em ser fumantes e fumantes passivos. De acordo com Kamma et al.<sup>47</sup> existem relatos contraditórios sobre os efeitos do tabaco na microbiota o que, em parte, é explicado por diferenças na metodologia e expressão estatística dos resultados. Alguns estudos, relataram não haver diferença na prevalência de bactérias subgingivais associadas à periodontite.<sup>28,48,49</sup> Stoltenberg et al.<sup>50</sup> também demonstraram não haver diferença significativa na prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* entre fumantes e não-fumantes. Já Haffajee e Socranky<sup>51</sup> avaliaram a mucosa bucal e as amostras das bactérias contidas na saliva de fumantes e não

fumantes diagnosticados com periodontite crônica e mostraram que houve uma pequena, mas não estatisticamente significativa diferença entre as proporções de bactérias entre fumantes e não fumantes.

De acordo com Castellanos<sup>52</sup>, tabagistas apresentam índice elevado de bactérias patogênicas comparadas aos não tabagistas, sugerindo que o tabagismo e o tabaco e seus produtos modulam diretamente a ecologia subgengival por favorecer a colonização com patógenos periodontais.

Já Lie et al.<sup>53</sup> analisaram que a microbiota bucal dos fumantes e não-fumantes com gengivite estabelecida e a microbiota bucal de uma gengivite experimental e concluíram que na gengivite experimental as respostas não são causadas por fatores na composição da microbiota ora bucal, pois a formação de biofilme não houve diferença entre fumantes e não-fumantes.

Os autores Darby et al.<sup>54</sup> e Bostrom et al.<sup>25</sup> observaram que o fumo exerce pouca ou nenhuma influência sobre a ocorrência de algumas bactérias subgengivais periodontopatogênicas.

Há estudos, mostrando que bactérias são seletivamente afetadas pela fumaça do cigarro e que os fumantes mostram uma diminuição da pressão parcial de oxigênio em bolsas periodontais, favorecendo a colonização das bactérias anaeróbias. Em contraste, estudos clínicos apresentaram pequenas diferenças entre fumantes e não-fumantes em relação à microbiota bucal.<sup>55</sup>

Em contrapartida, vários estudos têm demonstrado prevalência e maior gravidade da doença periodontal em indivíduos tabagistas. Sendo necessário um aprofundamento em relação às diferenças e semelhanças entre a microbiota de fumantes e não-fumantes.<sup>53</sup>

Estudos de Vinhas e Pachecco<sup>56</sup> demonstraram que não houve diferenças entre a microbiota de fumantes em relação aos de não fumantes.

Embora um número de estudos mostrasse que não há diferença entre a microbiota oral de fumantes e não fumantes, resultados de outros estudos sugerem que há uma tendência do fumante em ter um número maior de periodonto patógenos do que não fumantes, sem um aumento na quantidade de biofilme.<sup>57</sup>

Estudos examinaram a prevalência e a proporção de espécies bacteriana subgengivais em adultos fumantes e não fumantes, e não encontram diferença estatisticamente significantes.<sup>28,58,59,60</sup>

Conforme Filho et al.<sup>61</sup> a fumaça inalada pelos fumantes passivos ou involuntários é responsável por grande parte a doenças a nível respiratório, principalmente o pulmão. Essa poluição decorrente da fumaça exalado pelo fumante e por aquela resultante da queima da ponta do cigarro, corresponde a mais importante fonte de poluição ambiental. Esta hipótese é fortalecida por evidencias científicas, segundo as quais o tabagismo influenciaria numa maior ocorrência de doenças pulmonares.

## **6. CONCLUSÃO**

Não foi observada diferença significativa entre o grupo fumante passivo e o grupo controle no que se diz respeito à quantidade de UFC (unidade formadoras de colônias) de bactérias, a saber, *Staphylococcus spp.* e Enterobactérias, o que significa dizer que fumantes passivos por estar em contato com a fumaça e não diretamente com o cigarro, apresentam provavelmente uma maior absorção a nível pulmonar não influenciando diretamente na microbiota bucal.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Organização Mundial de Saúde (OMS). Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – Décima Revisão- (CID 10). Traduzido pela Faculdade de Saúde Pública de São Paulo - Centro Colaborador da OMS para Classificação de Doenças em Português - 4a ed – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo;1997.
2. Ministério da Saúde. Portaria nº 1575 de 29 de agosto de 2002, dispondo sobre a criação e implantação de Centros de Abordagem e Tratamento de Fumantes na Rede SUS. Diário Oficial. 03 de set 2002.
3. Gigliotti et al. Apud Mundim MM, Bueno GN. Análise comportamental em um caso de dependência à nicotina. Rev. Bras. de Ter. Comp. Cogn. 2006;8(2):179-81.
4. Pagani JC, De Souza, Pagani T. O tabagismo nos dias atuais. **Ensaio e Ciência**. [Internet]. 2007 nov [citado 2012 out 19]. Disponível em: <http://migre.me/8PDkb>
5. Balbani AP, Montovani JC. Métodos para abandono do tabagismo e tratamento da dependência da nicotina. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2005;71(6):820-7.
6. Rosemberg J. Nicotina: Droga Universal. São Paulo: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo; 2003.
7. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. J Clin Periodontol .2005;32(6):180-95.
8. Marques ACPR. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. Rev. Bras Psiquiatria.2001;4(23):200-14.

9. Boeira SL, Guivant JS. Indústria de Tabaco, Tabagismo e Meio ambiente: as redes ante os riscos. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*. 2003;20(1);45-78.
10. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer/Fundação Getúlio Vargas. *Cigarro Brasileiro. Análises e Propostas para Redução do Consumo*. Rio de Janeiro, 2000.
11. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol*. 2007;44:178-94.
12. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 2004;31(4):267-72.
13. Lindhe J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2005.
14. Wunsch FF, et al. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*.2010;2(13):175-87.
15. Britton JR. Tobacco: the epidemic we could all avoid. *Thorax*. 1998;52:1021-22.
16. Sallum AW, Neto JB, Sallum EJ. Tabagismo e a doença periodontal. *Rev. Periodontia*.2007;17(2)45-3.
17. Lefevre AMC, et al. Criança: fumante passivo sem opção. *BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista*; 2004.
18. Rosemberg J. *Pandemia do tabagismo : Enfoques Históricos e Atuais*. São Paulo: Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo;2002.
19. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Tabagismo passivo: efeitos da fumaça na saúde da criança*. Disponível em <http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=passivo&link=tabagismo.htm> [Acessado em 06 de novembro de 2012].

20. Paster BJ et al. The Breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology*.2006;42:80-7.
21. Marsh PD, Martin MV. *Microbiologia Oral* .4° ed. São Paulo: Santos;2005.
22. Kurkivuori J, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral Streptococci. *Oral oncology*. 2007;43:181-86.
23. Dawes C, Tsang RWL, Suelzle T. The effects of gum chewing, four oral hygiene procedures, and two saliva collection techniques, on the output of bacteria into human whole saliva. *Archives of oral biology*. 2001;46:625-32.
24. Johansson I, et al. Adhesion of *Candida albicans*, but not *Candida krusei*, to Salivary Statherin and Mimicking Host Molecules. *Oral Microbiology and Immunology*. 2000;15:112-18.
25. Bostrom L, Bergstrom J, Dahlen G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* . 2004;28(3):212-19.
26. Persson L, Bergström J, Ito H, Gustafsson A. Tobacco smoking and neutrophil activity in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 2001;72:90-5.
27. Preber H, Bergström J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol* 1992; 19:667-71.
28. Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. Effects of periodontitis and Smoking on the microbiota of oral mucosal membranes and saliva in systemically healthy subjects. *J Clin periodontol*.2003;30:1031-7.
29. Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol*. 1998;69:1111-18.

30. Gutierrez PJJ, et al. Orofacial infections of odontogenic origin. *Méd Oral*. 2004;1(9): 280-7.
31. Shiloah J, et al. The prevalence of pathogenic periodontal microflora in healthy young adult smokers. *J Periodontol*. 2000;71:562-67.
32. Isogai E, et al. Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis. *Infect Immun*. 1985;1(489):520.
33. Colman et al. 1976 apud Rojas EU. Avaliação da viabilidade e da variabilidade da microbiota salivar armazenada em diferentes temperaturas. [dissertação]. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul; 2007.
34. Martins JS, Ribeiro PM, Junqueira JC, Colombo CED, Jorge AOC. Recuperação de *candida albicans* da cavidade bucal de ratas ovariectomizadas. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*. 2006 maio-ago;18(2):135-42.
35. Holt, JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley, JT, Williams, ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 1994;9:787.
36. International commission on microbiological specifications for foods (ICMSF). *Microrganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración*. 2000;2:147-50.
37. Trabulsi LR, Campos LC. *Microbiologia*. 3ed. Sao Paulo: Atheneu, 2002, Generalidade sobre Enterobacterias; p.207-13.
38. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase type. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(1):54-61
39. Costa CDRS. Importância de *Staphylococcus spp.* produtores de enterotoxinas em alimentos. [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

40. Kranz F. Isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas* sp e de bactérias da família Enterobacteriaceae encontradas em cédulas de dinheiro circulante na cidade de Chapecó-SC.[tese].Unochapecó: Universidade comunitária da região de chapecó; 2010.
41. Miyabe M. Efeito fotodinâmico antimicrobiano sobre cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de pacientes submetidos a antibioticoterapia prolongada [tese].São Paulo: Universidade de São Paulo;2007.
42. Massone F. Anestesiologia veterinária, 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
43. Duarte JL, Faria FAC, Ceolin DS, Cestari TM, Assis GF. Efeitos da inalação passiva do cigarro sobre as pregas vocais de ratos. Ver. Bras Otorrinolaringol. 2000;72(2):210-6.
44. Porto SMMS, et al. Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. Rev. Nutr.2007;6(2):625-32.
45. MacGregor IDM. Toothbrushing efficiency in smokers and 5. non-smokers. J Clin Periodontol. 1984; 11(5): 313-20.
46. Bergstrom J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health J. Clin. Periodontol. 2002;27(1):61-68.
47. Kamma J.J., Nakou M., Baehni P.C. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. Journal Periodontology Research.2005;35:377-88.
48. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS.The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. J Clin Periodontol. 2001;28:283-95.

49. Zambon JJ, et al. Cigarettes smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J. Periodontol.* 1996; 67; 1050-54.
50. Stoltenberg JL, et al. Association between cigarette smoking, aetrial pathogens, and periodontal status. *J. Periodontol.* 1993; 64:1225-30.
51. Socransy SS, Haffaje AD, Cugeni MA, Smith C, Kent RL jr. Microbial complexes in subgenvival plaque. *J clin periodontal.* 1998 feb,;25(2):134-44.
52. Castellanos A, De la Rosa M, De la Garza M, Caffesse RG. Enamel matrix derivative and coronal flaps to cover marginal tissue recessions. *J Periodontol* 2006;77(1):7-14.
53. Lie MA, et al. Oral microbiota in smokers and non-smokers in natural and experimentally-induced gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* 1998;25:677-86.
54. Darby, I. B. et al. Microbial comparison of smoker and non-smoke adult and early onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J. Clin. Periodontol.* 2000;27:417-24.
55. Lindhe, J. Microbiologia da doença periodontal associada à placa. In: *Tratado de periodontologia clínica*. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1992.
56. Vinhas AS, Pachecco JJ. Tabaco e doenças periodontais. *Rev. Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial.* 2008;49(1):39-5.
57. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol* .2005;32(6):180-95.
58. Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, et al. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol* 2003; 30:1031-1037

59. Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin periodontol.* 2005;32(9):973-83.
60. Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol.* 1998;69:1111-18.
61. Filho VW, Mirra AP, Lopez RV, Antunes LF. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. *Ver. Bras. Epidemiologia.* 2010;13(2):175-87.