UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE

VANESSA MARIA FAGUNDES LEITE

AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE UM DENTIFRÍCIO EXPERIMENTAL À
BASE DE *Ricinus communis* PARA LIMPEZA DE PRÓTESES TOTAIS

RIBEIRÃO PRETO

2012

VANESSA MARIA FAGUNDES LEITE

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE UM DENTIFRÍCIO EXPERIMENTAL À
BASE DE *Ricinus communis* PARA LIMPEZA DE PRÓTESES TOTAIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre, junto ao Departamento de Materiais Dentários
e Prótese.

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva.

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Leite, Vanessa Maria Fagundes

Avaliação laboratorial de um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* para limpeza de próteses totais. Ribeirão Preto, 2012.

104p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Biblioteca da Unidade sede do Programa.

Orientadora: Silva-Lovato, Cláudia Helena

1. Prótese total.
2. Dentifrício.
3. *Ricinus communis*.
4. Propriedades físico-químicas.
5. Microbiologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Maria Fagundes Leite

Avaliação laboratorial de um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* para limpeza de próteses totais.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, junto ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Data da defesa: ____/____/2012.

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

À Deus, alimento da minha alma, fonte de eterno amor e bondade, por permitir o convívio com meus familiares, amigos e colegas e, também minha caminhada até aqui.

Aos meus pais Vitor e Elisa alicerces e exemplos da minha vida, por todo apoio, confiança, amor, dedicação e suporte. Pelo acalento e palavras de muito otimismo nos momentos de desespero. Pela amizade e participação de cada avanço e regresso da minha vida. A vocês todo meu amor, respeito e eterna gratidão. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Vitor e Vinícius, pelo apoio, carinho e palavras de incentivo.

Ao meu namorado Flávio, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis, pelas palavras de carinho e incentivo.

À minha cunhada Mayra pela amizade, paciência, incentivo e participação em minha conquista.

Agradecimento Especial

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Helena Lovato da Silva, profissional competente, com quem tive a oportunidade de aprender o que é ser um professor. A você, minha querida orientadora, todo meu respeito e admiração. Agradeço todo ensinamento, confiança, dedicação, carinho e amizade. Com você aprendi a profissão de mestre e também cresci como pessoa.

Muito Obrigada!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do diretor, Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros, pela oportunidade oferecida à minha formação profissional, desde a graduação ao mestrado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, Prof.^a Dr.^a Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza, pela oportunidade oferecida, por proporcionar um Programa de qualidade e pela competência em sempre buscar melhorias.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio concedido.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pela convivência e auxílios prestados durante toda minha permanência na FORP.

Às secretárias Ana Paula Xavier, Regiane de C. Tirado Damasceno e Fernanda Talita de Freitas, por todo auxílio prestado e carinho nos momentos de correria e atrasos.

Ao funcionário Luíz Sérgio Soares, por todo apoio e incentivo.

Ao funcionário Hermano Teixeira Machado, pelos serviços de fotografia prestados.

Aos técnicos, *Júlio César Souza da Matta, Marcelo Aparecido Vieira e Lício Firmino Junior*, pelo apoio e ajuda em momentos de grande necessidade.

Aos técnicos, *Edson Volta, Ana Paula Macedo e Viviane de Cássia Oliveira*, pela colaboração na realização da parte prática deste trabalho.

À *Viviane de Cássia Oliveira*, companheira de todas as horas, por todo aprendizado, apoio e incentivo.

Aos *professores* do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pela convivência e colaboração durante toda minha vida acadêmica.

Ao *Prof. Dr. Heitor Panzeri e Prof. Dr. Evandro Watanabe*, por toda dedicação, apoio e ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À *Prof.^a Dr.^a Helena de Freitas Oliveira Paranhos e Prof. Dr. Raphael Freitas de Oliveira*, por todo apoio, ensinamento e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Reabilitação Oral, *Viviane, Maria Paula, Tatiana, Adriana, Rômulo, Amanda, Juliana, Marina, Talita, Luciano, Marcela, Marina Pisani, Danilo e Ingrid*, por compartilharem os momentos de trabalhos laboratoriais.

Às companheiras, *Juliana e Marina*, pelos momentos de aprendizagem, apoio e carinho que compartilhamos.

Aos colegas de mestrado, Tatiana, Maria Paula, Juliana, Lourdes, Karina, Nathália, Isabela, Lourenço, Danilo, Camilo, Carla, Milena, Marcelo, Rafael e Brahim, pelos momentos de alegria e desespero compartilhados.

Aos colegas de pós-graduação do doutorado, Flávio, Ana Paula, Diogo, Murilo, Rômulo, Vitor, Carol, Amanda, Marina e Ingrid, por toda experiência transmitida.

Aos alunos de Iniciação Científica, Talita e Luciano, pela convivência e oportunidade de compartilhar minha experiência.

Aos alunos de graduação do PAE, pela oportunidade de aprender mais e aprimorar meus ensinamentos.

Ao Mario Sadaiti Ogasawara, funcionário da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo incentivo, ensinamento e auxílio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Gilberto, da Faculdade de Química da USP de São Carlos, por nos ceder gentilmente a matéria-prima (*Ricinus communis*) para a realização de nosso trabalho e por todo ensinamento.

À Prof.^a Dr.^a Elza Helena Guimarães Lara, por ceder gentilmente o Laboratório HELP-Laboratório de Análises para a realização de uma parte deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Denise de Andrade da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP, por ceder gentilmente o Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) para a realização de uma parte deste trabalho.

À equipe do DAPE, Prof.^a Dr.^a Marilena, Dr.^a Ana Carolina, Dr.^a Rosimeire, Prof.^a Dr.^a Cláudia, Prof.^a Dr.^a Helena, Prof.^a Dr.^a Andrea, Prof.^a Dr.^a Camila, Prof. Dr. Raphael, Renata e Fátima, pelos momentos compartilhados, pelo apoio, incentivo, aprendizado e carinho.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por fazerem parte da minha vida, por todo apoio, incentivo, paciência e carinho.

Aos meus avós, Heloisa, Manuel, Expedita e José (in memoriam), por acreditarem em meu trabalho, pelo apoio, carinho, incentivo e paciência.

À Ellen pela força e torcida para que este dia chegasse.

Aos meus amigos, Glauce, Paula Dariana, Paula Pastana, Cristiane, Ingrid, Marina, Gabriela, Juliana, Amanda, Cinthia, Mary Elly, Juliane, Michelli, Maressa, Mayra, Maristela, Marília, Maria Beatriz, Thais, Nathy, Lourdes, Marcelo e Lenin, pelo companheirismo, compreensão, apoio, incentivo, por compartilharem comigo os momentos de alegria, mas também os de tristeza.

Resumo

LEITE, V. M. F. **Avaliação laboratorial de um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* para limpeza de próteses totais.** Ribeirão Preto, 2012. 104p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* para higiene de próteses totais. Foram analisadas características físico-químicas, abrasividade e microbiológicas frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (S.a), *Escherichia coli* (E.c), *Streptococcus mutans* (S.m), *Enterococcus faecalis* (E.f), *Candida albicans* (C.a), *Candida glabrata* (C.g), *Bacillus subtilis* (B.s). Inicialmente, foi verificada a concentração inibitória mínima (CIM) do *R. communis* puro a uma concentração máxima de 2,5%. A CIM de 0,0781% foi eficaz contra os microrganismos, exceto E.c. Em seguida, foram obtidos os dentifrícios experimentais a 1, 2, 5 e 10%, cuja ação antimicrobiana pelo método do poço difusão em Ágar foi avaliada em comparação com dentifrícios comerciais (Colgate, Trihydrall, e Corega Brite). Os resultados foram considerados positivos quando da presença da formação de halo. Os ensaios físico-químicos foram realizados com base na medida da densidade, pH, consistência e características reológicas. A abrasividade foi avaliada por ensaio gravimétrico e rugosidade em 30 espécimes de resina acrílica (90x30x4mm) antes e após a escovação em máquina de escovação artificial, com A – Colgate, B – Experimental a 10%, C - Dentu-Creme, D – Trihydral e Água (controle). A ação antimicrobiana do dentifrício experimental a 10% foi analisada pelo método de formação de biofilme sobre espécimes de resina acrílica. Após a contaminação, os espécimes foram escovados manualmente por 60s com água e dentifrícios A, B, C e D (n=10) e imersos em meio de cultura líquido, o qual foi resuspenso para semeadura em meio de cultura sólido. Foram empregados controles positivo (contaminado e não escovado) e negativo (sem contaminação). Os resultados das análises físico-químicas e antimicrobiana por poço difusão em ágar foram informados em tabelas auto-explicativas. Os dados de abrasividade e análise microbiológica por formação de biofilme foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey (p=0.05). Para o método poço difusão em ágar os dentifrícios experimentais não foram efetivos contra E.c, C.a e C.g. Os dentifrícios comerciais não apresentaram ação antimicrobiana somente contra E.c. O dentifrício B ($0,0430 \pm 0,0032$) promoveu perda de peso similar ao C ($0,0424 \pm 0,0018$) e D ($0,0403 \pm 0,0022$). O dentifrício A ($0,0531 \pm 0,0066$) promoveu a maior perda de peso. Os dentifrícios B ($17,325 \pm 2,302$) e A ($16,573 \pm 3,282$) promoveram a maior rugosidade superficial se comparados ao C ($9,775 \pm 1,661$) e D ($7,089 \pm 3,980$). A escovação com Água promoveu menores valores de rugosidade ($0,000 \pm 0,006$) e perda de peso ($0,0003 \pm 0,0011$). A atividade antimicrobiana do dentifrício B variou em função da cepa e apresentou semelhança a alguns dos dentifrícios comerciais: para E.f - B ($3,66 \pm 0,56$), A ($3,82 \pm 0,83$), C ($2,84 \pm 0,81$) e D ($3,13 \pm 0,46$); C.g, B ($3,96 \pm 0,54$), A ($3,84 \pm 0,49$) e D ($3,35 \pm 0,59$); S.a, B ($4,99 \pm 0,53$), A ($4,78 \pm 0,72$) e escovação com Água ($4,86 \pm 0,43$); C.a, B ($3,98 \pm 0,57$), A ($3,76 \pm 0,78$), C ($3,23 \pm 0,23$), Controle positivo ($3,99 \pm 0,44$) e Água ($3,41 \pm 0,66$). Para a E.c e B.s todos os dentifrícios apresentaram atividade antimicrobiana semelhante. Para o B.s, os dentifrícios também foram semelhantes ao Controle positivo e Água. Contra S.m, o dentifrício B, apresentou-se semelhante somente ao Controle positivo e Água. Novos estudos, buscando a diminuição da abrasividade e aumento da ação antimicrobiana do dentifrício Experimental, são necessários.

Palavras Chaves: 1. Prótese total. 2. Dentifrício. 3. *Ricinus communis*. 4. Propriedades físico-químicas. 5. Microbiologia.

Abstract

LEITE, V. M. F. **Laboratory evaluation of an experimental dentifrice based on *Ricinus communis* for complete denture.** Ribeirão Preto, 2012. 104p. Dissertation (Master's Degree in Oral Rehabilitation). Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

This study was to develop an experimental dentifrice based on *Ricinus communis* for denture hygiene and its evaluate the physico-chemical characteristics, abrasiveness and antimicrobiol activity against *Staphylococcus aureus* (S.a), *Escherichia coli* (E.c), *Streptococcus mutans* (S.m), *Enterococcus faecalis* (E.f), *Candida albicans* (C.a), *Candida glabrata* (C.g), *Bacillus subtilis* (B.s). Initially, the minimum inhibitory concentration (MIC) assay was performed with *R. communis* at maximum concentration of 2.5%. The MIC of 0.0781% was effective against the microorganisms, except E.c. From this result, experimental dentifrices were obtained at 1, 2, 5 and 10% and antimicrobial activity was evaluated by means of an agar diffusion assay in comparison with commercial toothpastes (Colgate, Trihydrall, and Corega Brite). The results were considered positive when the presence of inhibition halo. The physico-chemical data were obtained with density measurement, pH, texture and rheological characteristics. The abrasiveness was assessed by gravimetric method and roughness. Thirty specimens of acrylic resin (90x30x4mm) were brushed before and after on artificial toothbrushing device with A – Colgate, B – Experimental at 10%, C - Dentu-Creme, D – Trihydral and Water (control). The antimicrobial activity of experimental dentifrice 10% was analyzed by the method of biofilm formation on acrylic resin. After contamination, specimens were manually brushed for 60s with water and dentifrices A, B, C and D (n = 10) and immersed in liquid culture medium, which was resuspended for sowing in solid culture medium. Positive and negative controls were used. The results of physico-chemical analyses and antimicrobial activity for agar well diffusion were reported in tables. The data of abrasiveness and microbiological analysis by biofilm formation were submitted to ANOVA and Tukey test (p = 0.05). For the agar well diffusion, the experimental dentifrice wasn't effective against E.c., C.a. and C.g. The commercial dentifrices didn't show antimicrobial activity against E.c. The dentifrice B (0.0430 ± 0.0032) induced weight loss similar to the C (0.0424 ± 0.0018) and D (0.0403 ± 0.0022). The dentifrice A (0.0531 ± 0.0066) promoted greater weight loss. Dentifrices B (17.325 ± 2.302) and A (16.573 ± 3.282) promoted greater roughness compared to C (9.775 ± 1.661) and D (7.089 ± 3.980). Brushing with water promoted lower roughness (0.000 ± 0.006) and weight loss (0.0003 ± 0.0011). The antimicrobial activity of the dentifrice B varied according to the microorganism and showed similarity to some of the commercial dentifrices: for E.f. - B (3.66 ± 0.56), A (3.82 ± 0.83), C (2.84 ± 0.81) and D (3.13 ± 0.46) were similar; Cg - B (3.96 ± 0.54), A (3.84 ± 0.49) and D (3.35 ± 0.59) were similar; Sa - B (4.99 ± 0.53), A (4.78 ± 0.72) and brushing with water (4.86 ± 0.43) were similar; Ca - B (3.98 ± 0.57), A (3.76 ± 0.78), C (3.23 ± 0.23), positive control (3.99 ± 0.44) and water (3.41 ± 0.66) were similar. All toothpastes showed similar antimicrobial activity for E.c. and B.s. For B.s., dentifrices were similar to a positive control and water. Against S.m., the dentifrice B was similar only to the positive control and water. Further studies are needed in order to decrease the abrasiveness and increased antimicrobial activity of Experimental dentifrice.

Key words: 1. Complete denture. 2. Dentifrice. 3. *Ricinus communis*. 4. Physical-chemical properties. 5. microbiology

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma da metodologia utilizada no teste de CIM.....	37
Figura 2 -	Seringa preparada para o ensaio de densidade.....	41
Figura 3 -	Becker com 20 mL de suspensão (5 mL de dentifrício e 15 mL de água.....	41
Figura 4 -	Leitura de pH com auxílio de peagâmetro.....	41
Figura 5 -	Amostra de dentifrício entre duas placas de vidro.....	42
Figura 6 -	Peso de 300 g sobre as placas de vidro.....	42
Figura 7 -	Mensuração do diâmetro do dentifrício com régua milimetrada.....	43
Figura 8 -	Placa de Petri (20x100 mm) com 12 mL de camada base de Tryptic Soy Agar.....	45
Figura 9 -	Adição de 8 mL da camada seed (meio de cultura com inóculo microbiano) sobre a camada base solidificada.....	45
Figura 10 -	Remoção do meio de cultura para formação do poço.....	46
Figura 11 -	Inserção dos dentifrícios nos poços do meio de cultura da placa de Petri.....	46
Figura 12 -	Pré-incubação das placas de Petri com papel de filtro a temperatura ambiente durante 2 h.....	46
Figura 13 -	Matrizes metálicas.....	48
Figura 14 -	Moldes em Zetalabor.....	48
Figura 15 -	Manipulação da resina acrílica.....	48
Figura 16 -	Resina acrílica acomodada nos moldes em Zetalabor.....	49
Figura 17 -	Muflas posicionadas em prensa hidráulica.....	49
Figura 18 -	Polimerizadora Termocicler T100.....	49
Figura 19 -	Corpos de prova após acabamento.....	50
Figura 20 -	Distribuição dos corpos de prova esterilizados na placa de cultura celular.....	53
Figura 21 -	Inserção do meio de cultura nos poços do grupo controle negativo.....	54
Figura 22 -	Estufa bacteriológica.....	54
Figura 23 -	Lavagem dos corpos de prova e poço com solução salina a 0,85%.....	54
Figura 24 -	Escovação do espécime contaminado com escova e dentifrício.....	55
Figura 25 -	Placas de cultura em anaerobiose contendo meio de cultura e corpos de prova em resina contaminados com S. mutans.....	56

Figura 26 -	Corpo de prova em plex-glass com as marcações para orientação de leitura de rugosidade.....	57
Figura 27 -	Pesagem dos corpos de prova em balança analítica de precisão.....	58
Figura 28 -	Máquina de escovação artificial.....	59
Figura 29 -	Escova após remoção do cabo.....	59
Figura 30 -	Resultado do ensaio de reologia do dentífrico experimental a 1%.....	64
Figura 31 -	Resultado do ensaio de reologia do dentífrico experimental a 2%.....	64
Figura 32 -	Resultado do ensaio de reologia do dentífrico experimental a 5%.....	64
Figura 33 -	Resultado do ensaio de reologia do dentífrico experimental a 10%.....	65
Figura 34 -	Comparação da perda de peso (g) e desvio-padrão promovida pela escovação com os dentífricos e com água. Cores iguais indicam igualdade estatística.....	68
Figura 35 -	Comparação das médias (DP) da rugosidade superficial (Ra) promovida pela escovação com água e dentífricos. Cores iguais indicam igualdade estatística.....	69
Figura 36 -	Espécime escovado com dentífrico Colgate.....	70
Figura 37 -	Espécime escovado com dentífrico Experimental.....	70
Figura 38 -	Espécime escovado com dentífrico Dentu creme.....	70
Figura 39 -	Espécime escovado com dentífrico Trihydral.....	70
Figura 40 -	Espécime escovado Água.....	70

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Microrganismos padrão selecionados para o experimento.....	36
Tabela 2-	Composição do dentifrício experimental.....	38
Tabela 3-	Dentifrícios comerciais empregados.....	44
Tabela 4-	Concentração inibitória mínima do <i>Ricinus communis</i> frente aos microrganismos padrão.....	62
Tabela 5-	Características organolépticas dos dentifrícios experimentais.....	63
Tabela 6-	Valores de densidade, pH e consistência do dentifrício experimental a base de <i>Ricinus communis</i> nas concentrações de 1, 2, 5 e 10%.....	63
Tabela 7-	Comportamento reológico (viscosidade e área de histerese) dos dentifrícios experimentais.....	65
Tabela 8-	Médias dos diâmetros dos halo de inibição em mm dos dentifrícios frente aos microrganismos selecionados.....	66
Tabela 9-	Turvação do meio de cultura dos tubos de ensaio contendo os corpos-de-prova após a escovação e incubação.....	66
Tabela 10-	Análise de variância (One-Way ANOVA) dos valores de UFC/10 mL...	67
Tabela 11-	Comparação das médias (DP) das UFC/espécime, entre os grupos.....	67
Tabela 12-	Análise de variância (One-Way ANOVA) do método gravimétrico.....	68
Tabela 13-	Análise de variância (One-Way ANOVA) da rugosidade superficial.....	69

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Introdução	25
2. Proposição	33
3. Material e Método.....	35
3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do <i>Ricinus communis</i> e manipulação dos dentifrícios	36
3.2. Análises das características organolépticas	39
3.2.1. Aspecto	39
3.2.2. Cor	39
3.2.3. Odor	39
3.2.4. Sabor.....	40
3.3. Análises das características físico-químicas	40
3.3.1. Medida da densidade aparente	40
3.3.2. Medida do Ph	41
3.3.3. Determinação da consistência.....	42
3.3.4. Avaliação das características reológicas	43
3.4. Análise da efetividade antimicrobiana dos dentifrícios à base de <i>Ricinus communis</i>	43
3.4.1. Método de poço-difusão em Ágar.....	44
3.4.2. Método de formação de biofilme sobre corpos de prova em resina acrílica.....	47
3.4.2.1. Confeção dos corpos de prova	47
3.4.2.2. Esterilização dos corpos de prova.....	50
3.4.2.3. Meios de cultura utilizados.....	51
3.4.2.3.1. Mueller Hinton Broth (HB)	51
3.4.2.3.2. Mueller Hinton Agar (MHA)	51
3.4.2.3.3. Sabouraud Dextrose Broth (SDB)	51
3.4.2.3.4. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	51
3.4.2.3.5. Sb 20-modificado	51
3.4.2.3.6. Mitis Salivarius Agar Base (MS)	52

3.4.2.3.7. Tryptone Soya Agar (TSA)	52
3.4.2.3.8. Tryptone Soya Broth (TSB)	52
3.4.2.3.9. Letheen Broth (LB)	53
3.4.2.4. Contaminação dos corpos de prova e formação do biofilme	53
3.4.2.5. Procedimento de higienização dos corpos de prova - Aplicação do Método de Higiene por escovação com os diferentes dentríficos	55
3.4.2.6. Semeadura do meio de cultura para avaliação da ação antimicrobiana dos dentrífcios	56
3.5. Avaliação da abrasividade.....	57
3.6. Análise dos dados	60
4. Resultados.....	61
4.1. Avaliação da Concentração inibitória mínima (CIM) do <i>Ricinus communis</i>	62
4.2. Características organolépticas	62
4.3. Características físico-químicas	63
4.4. Avaliação da ação antimicrobiana	65
4.4.1. Método do poço-difusão em Ágar	65
4.4.2. Método de formação de biofilme sobre corpos de prova em resina acrílica.....	66
4.5. Avaliação da abrasividade	68
5. Discussão	71
6. Conclusão	81
Referências Bibliográficas	83
Apêndice.....	92

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, o número de idosos com idade acima dos 65 anos crescerá em velocidade acelerada (2 a 4% ao ano) (Nasri, 2008). Dentre esta população, cerca de 63,1% de pessoas necessitam de tratamentos reabilitadores totais. Consequentemente, a preocupação com os indivíduos edentados torna-se evidente por parte dos profissionais da odontologia.

Embora a ciência odontológica tenha se desenvolvido com a utilização dos implantes osseointegráveis, grande parte do tratamento ainda é realizada com próteses totais convencionais e estudos mostram a precariedade da saúde bucal de usuários de próteses totais em função da falta de higiene dos aparelhos protéticos e dos tecidos orais (Smith e Sheiham, 1979; Hoad-Reddick et al., 1990; Moskona e Kaplan, 1992; Budtz-Jørgensen et al., 2000; Paranhos et al., 2000^a; Kulak-Ozkan et al., 2002).

A realização inadequada da higiene leva ao acúmulo de biofilme sobre as superfícies das próteses, o qual é definido como uma massa microbiana densa formada por microrganismos e seus produtos metabólicos, sendo constituído por mais de 10^{11} microrganismos por grama em peso seco (Nikawa et al., 1999), constituindo-se em fator etiológico importante da Candidíase Atrófica Crônica (Paranhos et al., 2009).

A Candidíase Atrófica Crônica é uma lesão inflamatória da mucosa de suporte de prótese, que afeta aproximadamente 50% dos pacientes usuários de próteses maxilares completas e a etiologia é multifatorial (Andrucioli et al., 2004). Dentre os fatores significantes estão os traumas causados pela própria prótese, infecção por *Candida*, higiene precária da prótese, uso contínuo da dentadura e fatores dietéticos e sistêmicos (Lemos et al., 2003; Andrucioli et al., 2004). *C. albicans* e outras espécies de fungos encontrados no biofilme têm sido consideradas como importantes agentes para instalação, manutenção e exacerbação desta doença (Lemos et al., 2003; Andrucioli et al., 2004). A habilidade das espécies de *Candida* de formar biofilme é muito importante, uma vez que está relacionada com persistência no hospedeiro e infecção (Silva et al., 2010)

Sendo assim, é notável a necessidade de programas de atenção que proporcionem condições à manutenção da saúde bucal, tais como programas de desenvolvimento, orientação e utilização adequada de materiais de higiene específicos, eficazes e acessíveis aos portadores de próteses totais (Silva-Lovato et al., 2006). O produto ideal para higiene deve ser de fácil manuseio; efetivo na remoção dos depósitos orgânicos, inorgânicos e manchas; bactericida e fungicida; não tóxico ao paciente; não deletério aos materiais constituintes do aparelho e de baixo custo (Abere, 1981).

Os métodos propostos para higiene da prótese total são divididos em dois grupos principais: químicos e mecânicos (Abere, 1979; Budtz-Jørgensen, 1979; Abelson, 1981; Council on Dental Materials, Equipments and Instruments, 1983; Ferran et al., 1984; Abelson, 1985; Jagger e Harrison, 1995). Os químicos, de acordo com seus componentes principais e mecanismo de ação, são classificados em hipocloritos, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, enzimas, ácidos, drogas brutas e enxaguatórios para dentaduras (Nikawa et al., 1999) e o seu emprego consiste na imersão do aparelho protético em soluções que tem ação solvente, detergente, bactericida e fungicida. A limpeza por meio de imersão apresenta como vantagem a remoção de manchas e ação antimicrobiana. Este método pode ser visto como uma alternativa para pacientes que apresentam dificuldade motora (Budtz-Jørgensen, 1979). Porém, podem apresentar efeitos deletérios como alteração de cor do aparelho protético, acidentes durante seu manuseio, manchamento (Silva-Lovato et al., 2006) e também apresentar-se como um método mais dispendioso, quando comparado à escovação.

Os métodos mecânicos são classificados em escovação e ultrassônico, sendo que a escovação com escova dental e dentifrício ou sabão é o mais difundido tornando-se uma prática comum de higiene bucal (Andrade Jr., 1998; Dyer et al., 2001; Silva-Lovato et al., 2006). Tem a vantagem de ser um método simples, de baixo custo e eficaz na remoção de manchas e depósitos orgânicos (Purnaveja et al., 1982). Possui desvantagens quanto à dificuldade de uso, principalmente para pacientes com problemas de coordenação motora (Abelson, 1985; Jagger e Harrison, 1995), possibilidade de desgaste da resina acrílica e danos às superfícies de materiais de reembasamento, seja pelo uso incorreto do método ou pela associação de materiais não específicos para prótese total (Haselden et al., 1998). Budtz-Jørgensen (1979) indica o emprego de dentifrícios de baixa abrasividade associado à escova de cerdas macias.

Muitos autores (Hutchins e Parker, 1973; Augsburger e Elahi, 1982; Lee et al., 1985; Keng e Lim, 1996; Nikawa et al., 1999; Andrucioli et al., 2004) preconizam a utilização dos métodos mecânico e químico combinados, embora na literatura, encontram-se resultados contraditórios, onde o método associado apresenta-se com eficácia similar ao método mecânico (Paranhos et al., 2009). Uma desvantagem desta associação é pautada na necessidade de maior disponibilidade de tempo pelo paciente, uma vez que deverá realizar dois procedimentos, além de gerar maior custo.

Quando o método de escovação é empregado, normalmente associam-se dentifrícios, que até há pouco tempo era tido como um produto cosmético, com finalidade de remover

restos alimentares após as refeições, e proporcionar hálito refrescante. Porém, atualmente apresenta-se com função terapêutica e preventiva (Cury, 2002; Fávero e Pantarolo, 2004).

Especificamente em prótese total, estudos laboratoriais e clínicos têm avaliado o emprego de dentifrícios com agentes antimicrobianos para o controle do biofilme. Pisani et al. (2010c) realizaram um estudo laboratorial para avaliação da abrasividade de dois dentifrícios experimentais, sendo um composto por cloramina T e o outro por zonil e, como parâmetro de comparação utilizaram o dentifrício Corega Brite (específico) e Sorriso (convencional). A escovação foi realizada por meio de uma máquina de escovação artificial e a análise da abrasividade, pelo método gravimétrico e rugosidade superficial. Os dentifrícios experimentais apresentaram a menor perda de peso quando comparados aos dentifrícios comerciais e apresentaram rugosidade semelhante ao Corega Brite. Os autores indicam o uso dos dentifrícios experimentais com base nas propriedades avaliadas. Panzeri et al. (2009) e Andrade et al. (2012) realizaram estudos clínicos com o objetivo de avaliar a eficácia de dentifrícios experimentais a base de cloramina T e Zonil. O primeiro autor utilizou como controle a água, enquanto o segundo, o dentifrício Corega Brite. Ambos obtiveram resultados favoráveis, uma vez que os dentifrícios experimentais mostraram redução do biofilme quando comparados aos controles.

Para a utilização de um dentifrício na higiene de próteses totais alguns aspectos devem ser considerados, dentre os quais a composição e interação dos componentes e indicação, se para uso terapêutico ou profilático e ainda, se para uso em tecidos orais.

Como composição, um dentifrício é uma somatória de substâncias com funções próprias que associadas garantirão ao produto sua ação cosmética, terapêutica e preventiva (Cury, 2002). Os dentifrícios podem ser considerados produtos complexos, sendo constituídos de agentes espessantes (que conferem viscosidade ao produto), abrasivos (responsáveis pela remoção mecânica do biofilme e manchas), umectantes (previnem o ressecamento), tensoativos (conferem ação detergente por meio da redução da tensão superficial), edulcorantes (conferem o sabor adocicado ao dentifrício) e flavorizantes (conferem odor e sabor ao produto) (Silva et al., 2001). Substâncias antimicrobianas ou outros agentes terapêuticos podem também estar presentes. No desenvolvimento de uma formulação de dentifrício, um antimicrobiano e surfactante adequados podem ser escolhidos para maior eficiência na remoção de biofilme (Panzeri et al., 2009). Em função desta característica complexa, quando de sua formulação, há necessidade de análises específicas que visem a estabilidade do produto, possibilitando e favorecendo a ação específica de cada substância.

Dentre as propriedades físico-químicas, as mais comumente estudadas e discutidas estão o pH, densidade, consistência e abrasividade. O pH pode influenciar a ação da formulação de maneira acentuada, principalmente no que diz respeito à atividade dos princípios ativos (Darr, 1981). A medida da densidade tem relação com a dispensação do dentifrício para a utilização e consequente veiculação dos princípios ativos permitindo controlar a dose a ser empregada e a individualização para a faixa etária à qual se destina. A consistência é um fator importante sob vários aspectos: apresentação, facilidade de remoção do tubo, manutenção da forma quando sobre as cerdas da escova, facilidade de espalhamento e grau de liberação de princípios medicamentosos (Lara, 1988; Paranhos et al., 2000b). A abrasividade promove alterações estéticas e superficiais tanto nas superfícies dentais, quanto nos materiais restauradores (Lara e Panzeri, 1998) e protéticos (Panzeri et al., 2009). Para sua verificação *in vitro*, os estudos procuram desenvolver equipamentos capazes de simular uma condição mais aproximada possível da escovação real e, neste aspecto, além da escolha do substrato, um fator importante a ser destacado refere-se ao método de avaliação e quantificação do desgaste. Há necessidade do controle de fatores como tipo de escova (manual ou elétrica), técnica e frequência de escovação, concentração do dentifrício, força aplicada e temperatura.

Quanto à indicação dos dentifrícios, existem formulações específicas para tratamento de doenças periodontais agudas, tendo como objetivo principal a terapia. Para uso rotineiro, o dentifrício deve ter compostos atóxicos, eficientes na remoção do biofilme podendo ou não ser antimicrobianos e inertes às estruturas sob sua ação.

Especificamente quando indicados para usuários de próteses totais, aspectos importantes quanto à formulação e eficácia devem ser considerados. As resinas acrílicas têm sido usadas para confecção de próteses totais por mais de 60 anos e são compostas por poli (metil-metacrilato), um material de baixa dureza (Anusavice, 2006). Seus diferentes métodos de polimerização podem alterar suas propriedades físicas e mecânicas, incluindo a resistência à abrasão (Purnaveja et al., 1982; Lai et al., 2004). Os dentes artificiais também estão sujeitos à ação da abrasividade quando submetidos à limpeza mecânica, uma vez que são compostos de resina acrílica (Sato et al., 1990).

Os dentifrícios potencializam a ação da escova, por meio de seus agentes abrasivos e detergentes. A escovação com dentifrícios pouco abrasivos ou com outros agentes (sabão neutro, por exemplo), pode resultar em um aumento de manchas extrínsecas sobre o acrílico. Porém, o maior efeito adverso da escovação com dentifrícios abrasivos é o desgaste de tecidos duros e de materiais restauradores e protéticos (Dyer et al., 2001). A abrasão gerada em

resinas acrílicas consiste em fenômeno importante, sendo indesejável estética e biologicamente, pois modifica as suas condições superficiais, tornando-as mais rugosas e susceptíveis à pigmentação e ao acúmulo do biofilme (Tanoue et al., 2000), podendo também interferir em sua adaptação (Richmond et al., 2004).

Um questionamento a ser levantado refere-se a quão abrasivo necessita ser o agente higienizador para promoção de efetiva limpeza de uma prótese total, uma vez que apenas a abrasão é comumente estudada, sem associá-la à sua capacidade higienizadora (Matthes, 2003, 2005). Discussões sobre a relação entre efetividade de limpeza e grau de abrasão não têm sido amplamente relatadas (Mäkila e Taulio-Korvenmaa, 1988; Chan et al., 1991; Lee et al., 2002). A ação efetiva sobre o controle do biofilme pode ser delegada à associação com um método químico de higiene, o que para muitos usuários de prótese total pode tornar-se um procedimento complexo, uma vez que dispense de alguns cuidados. Normalmente a indicação dos produtos químicos deve seguir tempo correto de imersão bem como dissolução em água com temperaturas controladas, além de ser um procedimento a mais na prática diária.

Almejando-se promover maior facilidade para o usuário de prótese total com controle adequado do biofilme, pode-se pensar na associação dos métodos mecânico e químico em um único passo, ou seja, escovação com dentifrícios para uso diário contendo compostos antimicrobianos e atóxicos para os tecidos orais.

A seleção e indicação de substâncias antimicrobianas deve considerar aspectos como:

1. toxicidade: sua interação com os tecidos bucais deve ser bem conhecida;
2. permeabilidade aos tecidos: deve ser baixa considerando os efeitos sistêmicos das substâncias para a saúde;
3. microbiota residente: não deve provocar desequilíbrio;
4. substantividade: a substância deve ser retida no local de ação e ser liberada lentamente.

A substância selecionada deve reunir o maior número possível das características citadas e sua efetividade deve ser comprovada por estudos tanto laboratoriais quanto clínicos (Torres et al., 2000).

Atualmente, a clorexidina é um antisséptico importante no controle do biofilme bacteriano; no entanto, seu uso frequente e por longos períodos, apresenta alguns efeitos colaterais (Cordeiro et al., 2006). Por isso são necessários estudos que visem obter substâncias tão efetivas quanto à clorexidina, porém sem seus efeitos colaterais (Torres et al., 2000).

Hoje, o crescimento mundial da fitoterapia em programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas. Cavalcanti et al. (2011)

avaliaram a atividade antifúngica de três óleos essenciais (*Melaleuca alternifolia*, *Cymbopogon winterianus* e *Rosmarinus officinalis*) sobre cepas de *Candida*, obtendo resultados satisfatórios. No entanto, o emprego correto de plantas para fins terapêuticos requer o uso de amostras selecionadas e cientificamente validadas como medicinais, para sua eficácia e segurança (Garcia et al., 2008).

Revisando a literatura na busca por um produto que pudesse ser indicado para o controle do biofilme de protestes totais, pode-se encontrar o óleo de mamona, que é utilizado desde a Antiguidade e que tem apresentado avanços nas pesquisas médicas e odontológicas. O *Ricinus communis* (mamona) é uma planta tropical oleaginosa que tem como principal subproduto o óleo ricinoléico (Garcia et al., 2008). A partir deste óleo pode-se obter substrato em diferentes estados desde líquido, gel e resinoso. A resina de *Ricinus communis* é atóxica e apresenta biocompatibilidade, tempo de manipulação ideal, não libera gases, tampouco é exotérmica ao polimerizar-se; possui propriedades detergentes, bactericidas e fungicidas, dentre outras (Mastrantonio e Ramalho, 2003). O desenvolvimento da resina se difundiu para diferentes extensões no campo da medicina odontologia (Meneghin et al., 2006). O óleo de *Ricinus communis* também apresenta alto potencial cicatrizante e osteogênico além de propriedades antiinflamatórias (Garcia et al., 2008).

Baseado no resultado dos estudos de biocompatibilidade em ortopedia, pesquisas odontológicas tem considerado a viabilidade do uso dos materiais derivados do *Ricinus communis* para reconstrução óssea e reparo de defeitos intraósseos, elevação do assoalho de seio maxilar e preenchimento de alvéolo dental, visando a viabilidade para colocação de implantes e pinos metálicos (Meneghin et al., 2006). De acordo com alguns autores, o polímero derivado do óleo de *Ricinus communis* apresentou neoformação fibroblástica e progressiva reparação óssea ao redor e dentro dos poros do material, com ausência de resposta inflamatória tardia e sem sinal de efeito tóxico sistêmico, demonstrando ser biocompatível (Valderramas et al., 2008). Em endodontia, o detergente derivado do óleo de mamona foi empregado para utilização como solução irrigante de canais radiculares. Este detergente apresentou ação antimicrobiana similar ao hipoclorito de sódio 0,5% quando usado em canais radiculares com necrose (Ferreira et al., 1999) e em concentração de 3,3%, o detergente de *Ricinus communis* apresentou ação de limpeza similar ao hipoclorito de sódio 1% na eliminação de debris do terço apical de canais radiculares (Meneghin et al., 2006). É biocompatível ao tecido periapical, aumenta a permeabilidade dentinária e tem capacidade para remover smear layer dos canais radiculares semelhante ao EDTA 17% (Teixeira et al., 2001). Na prótese total, estudos laboratoriais empregaram uma solução de *Ricinis communis*

como método químico de higiene. Pisani et al., (2010a, 2010b) avaliaram propriedades mecânicas de reembasadores resilientes e resinas acrílicas após imersão em hipoclorito de sódio a 1% e solução de *Ricinus communis* (experimental). Os espécimes foram analisados após períodos de 15 e 183 dias de imersão. Para os reembasadores avaliados, as menores alterações nas propriedades foram promovidas pela solução experimental, enquanto para as resinas, os higienizadores tiveram influência na resistência flexural da resina polimerizada em micro-ondas, mas os valores obtidos estão dentro do limite aceitável pela ISO 156736.

A literatura evidencia a necessidade do controle do biofilme, com a instituição de correta higienização, com a utilização de métodos que não causem danos e que sejam efetivos. Mostra também a importância de estudos experimentais desses produtos, sendo salientada a relevância dos estudos laboratoriais, uma vez que eles permitem o conhecimento do modo de ação de cada produto testado (Nikawa et al., 1999).

Baseado na literatura e sabendo das dificuldades encontradas pelos usuários de prótese total em ter acesso a produtos específicos de higiene no mercado brasileiro, o objetivo desse trabalho foi formular um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* para próteses totais e realizar testes laboratoriais focalizando ensaios físico-químicos específicos e microbiológicos, com intuito de conhecer as principais propriedades do produto desenvolvido. Uma vez obtidos resultados satisfatórios, análises in vivo deverão ser realizadas.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi formular e avaliar um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis*, como potencial higienizador de prótese total.

Como objetivos específicos, foram estudados:

1. Concentração inibitória mínima para formulação do dentifrício;
2. Características organolépticas:
 - 2.1 Aspecto;
 - 2.2 Cor;
 - 2.3 Odor;
 - 2.4 Sabor
3. Características físico-químicas:
 - 3.1 Densidade;
 - 3.2 pH;
 - 3.3 Consistência;
 - 3.4 Características reológicas;
4. Efetividade antimicrobiana contra microrganismos específicos.
5. Características de abrasividade.

3. Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do *Ricinus communis* e manipulação dos dentifrícios

A concentração inibitória mínima (CIM) é a concentração mínima de agente antimicrobiano para a qual não se observa crescimento do microrganismo. O teste foi realizado segundo CLSI e os valores da CIM do *Ricinus communis* foram determinados com base no método das diluições sucessivas em placas de cultura celular (TPP, Trasadingen, Unterkieltgau, Suíça) contendo 96 poços e em duplicata (Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP). Neste método, as placas foram preparadas contendo o meio de cultura com diferentes concentrações do agente antimicrobiano. Cada um dos poços foi inoculado com o microrganismo a ser testado e após o período de incubação, o crescimento microbiano foi avaliado através da turvação ou não do meio de cultura.

Como meio de cultura foram utilizados o *Tryptic Soy Broth* (Difco, Sparks, MD, USA), *Muller Hinton Agar* (Difco, Sparks, MD, USA) e *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco, Sparks, MD, USA). Os microrganismos selecionados para o teste (Tabela 1) representam os principais microrganismos presentes no biofilme bucal de indivíduos dentados e desdentados.

Tabela 1 - Microrganismos padrão selecionados para o experimento.

Microrganismo	Identificação	Características Morfotintórias
<i>Staphylococcus aureus</i> (S.a)	ATCC 25923	Cocos gram-positivos
<i>Escherichia coli</i> (E.c)	ATCC 25922	Bacilos gram-negativos
<i>Streptococcus mutans</i> (S.m)	ATCC 25175	Cocos gram-positivos
<i>Enterococcus faecalis</i> (E.f)	ATCC 29212	Cocos gram-positivos
<i>Bacillus subtilis</i> (B.s)	ATCC 6633	Bacilos gram-positivos
<i>Candida albicans</i> (C.a)	ATCC 10231	Leveduras
<i>Candida glabrata</i> (C.g)	ATCC 2001	Leveduras

ATCC, American Type Culture Collection.

A suspensão microbiana foi preparada em solução fisiológica a partir de culturas recentes dos microrganismos (37 °C por 24 horas em estufa microbiológica, DeLeo, B2DG, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil), correspondente à escala 0,5 de McFarland (10^8

UFC/mL para as bactérias e 10^6 UFC/mL para as leveduras). Após a realização das suspensões, elas foram diluídas na proporção de 1:10 para as bactérias, obtendo-se um inóculo bacteriano de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Para as leveduras a diluição foi 1:10, para obtenção de um inóculo de aproximadamente 10^5 UFC/mL. Quando a alíquota de 5 μ L das suspensões foi inoculada no meio de cultura, a concentração final de cada tipo bacteriano foi de aproximadamente 10^5 UFC/mL e, para as leveduras 10^3 UFC/mL.

A solução diluída de *Ricinus communis* foi obtida a uma concentração de 5% (0,5 g de gel de *Ricinus communis* para 9,5 mL de água destilada) para que no primeiro poço fosse conseguida a concentração de 2,5%.

Para cada microrganismo foram obtidos 10 grupos de concentrações de *Ricinus communis* variando entre 2,5 a 0,0048% e, dois para os controles, sendo um positivo e um negativo, com o objetivo de comprovar a contaminação e a esterilidade do meio de cultura, respectivamente. No controle positivo foram colocados 50 μ L de meio de cultura, 50 μ L de solução salina e 5 μ L de inóculo; nos controles negativos foram colocados 50 μ L de meio de cultura e 50 μ L de solução de *Ricinus communis* a 5%. A figura 1 ilustra a metodologia utilizada.

Figura 1- Fluxograma da metodologia utilizada no teste de CIM.

Após o preparo das placas com o meio de cultura em duplicata para cada microrganismo, as mesmas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, em estufa microbiológica. Os resultados foram analisados com base na turvação do meio, identificado a olho nu. A presença de turvação nos dois poços de cada concentração para cada microrganismo indicou crescimento microbiano.

Uma vez identificada a concentração inibitória mínima do *Ricinus communis*, passou-se para a manipulação do dentifrício.

A manipulação dos dentifrícios foi realizada seguindo as técnicas de desinfecção e antissepsia preconizadas para manipulações farmacêuticas (Brasil - Anvisa - RDC n ° 33, 2000; Laboratório HELP Laboratório de Análises da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

Com base nos valores da CIM, foram obtidas quatro formulações de dentifrícios à base de *R. communis* nas concentrações de 1, 2, 5 e 10% (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição do dentifrício experimental.

Componentes	Fabricante	Função
Hidroxietilcelulose	Union Carbide Corp., Houston, TX, USA	Espessante
Glicerina	Ely Martins, Ribeirão Preto, SP, Brasil	Umectante
EDTA	Dow Chemical Co., Midland, MI, USA	Quelante
Sacarina		Flavorizante
Gel de <i>Ricinus communis</i>	IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil	Conservante
		Antimicrobiano
		Tensoativo
Sílica (Sident 8)	Evonik Degussa GmbH, Düsseldorf, Germany	Abrasivo
Sílica (Sident 22S)	Evonik Degussa GmbH	Espessante
Dióxido de titânio	Minérios Ouro Branco, São Paulo, SP, Brasil	Pigmento (branco)
Mentol e eucaliptol	Givaudan do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil	Flavorizante
Água destilada	-	Veículo

Para a obtenção dos dentifrícios, a hidroxietilcelulose, a glicerina, o EDTA, a sacarina e a água foram pesados em balança digital (Ind. e Com. Eletro-Eletrônica GEHAKA Ltda, São Paulo, Brasil, Mod. BG400), homogeneizados manualmente e mantidos em repouso na ausência de luz por 24 horas para a formação do gel. Na sequência, os demais componentes

foram pesados e acrescentados, gradativamente, ao gel para homogeneização em um misturador a vácuo (SEW do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil – Mod. MPDL-6). Após a obtenção de um dentifrício homogêneo, o mesmo foi dispensado e armazenado em bisnagas de coloração branco-leitoso com capacidade para 60 g.

3.2. Análises das características organolépticas

As características organolépticas foram avaliadas segundo orientações da ANVISA (Brasil - Anvisa, 2007) em diferentes períodos de tempo, ou seja, 15, 30, 60 e 90 dias, tendo como parâmetro de comparação as características obtidas imediatamente após a manipulação do dentifrício experimental.

3.2.1. Aspecto

Em cada um dos períodos de análise, uma amostra de 20 g foi retirada do tubo plástico de armazenamento do dentifrício, dispensada sobre uma placa de vidro e a manutenção ou não do aspecto inicial (obtido após a manipulação do dentifrício) foi observada visualmente, buscando identificar a separação de fases, precipitação e turvação. A amostra foi classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo;
- separado, precipitado ou turvo.

3.2.2. Cor

Uma amostra de 20 g foi dispensada sobre uma placa de vidro e a análise foi realizada por meio visual sob fonte de luz branca e/ou natural. A cor inicial obtida após a manipulação do dentifrício foi registrada como branco-leitosa e alterações nesta cor ao longo dos períodos de análise foram classificadas segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;
- modificada;
- intensamente modificada.

3.2.3. Odor

Após a obtenção do dentifrício, o odor obtido foi característico aos flavorizantes selecionados (mentol e eucaliptol). Nos períodos de avaliação, uma amostra de 20 g de

dentifrício foi dispensada sobre uma placa de vidro e por meio do olfato, o odor foi comparado ao inicial (dos flavorizantes) e classificado segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;
- modificada;
- intensamente modificada.

3.2.4. Sabor

As alterações ou manutenção do sabor inicial do dentifrício obtido após sua manipulação foram verificadas por meio do paladar, em uma amostra de 20 g do dentifrício. O sabor inicial foi registrado como refrescante (característico de mentol e eucalipto) e doce e a classificação do sabor após 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento da amostra deu-se da seguinte forma:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;
- modificada;
- intensamente modificada.

3.3. Análises das características físico-químicas

Ensaio físico-químico são procedimentos técnicos que consistem em determinar uma ou mais características de um produto, processo ou serviço, de acordo com um procedimento especificado. Estas avaliações permitem ao formulador detectar futuros problemas que possam afetar a estabilidade e a qualidade do produto (Brasil - Anvisa, 2004).

3.3.1. Medida da densidade aparente

A determinação da densidade foi realizada de acordo com o preconizado pelo Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos (Brasil - Anvisa, 2008). Para realização desse ensaio, foram utilizadas amostras de 5 mL de dentifrício. Este volume padrão (5 mL) foi obtido por meio de uma seringa hipodérmica, cuja parte terminal foi removida (Figura 2). O êmbolo foi retraído até a marca de 5 mL e, com uma espátula, o material foi depositado no interior do cilindro da seringa até o seu preenchimento total. Uma lâmina reta foi apoiada e passada nas bordas do cilindro para remoção de eventuais excessos. Em seguida, o material foi depositado em um recipiente adequado, e o seu peso foi determinado em balança eletrônica analítica com sensibilidade de 0,1 mg e capacidade de 210 g (Ohaus, Explore, EUA). O peso do recipiente foi descontado. Para obtenção do valor da densidade, foi usada a relação $D = m/v$, onde D = densidade aparente em g/mL; m = massa da amostra em gramas; v = volume final em mililitros.

Figura 2 - Seringa preparada para o ensaio de densidade.

3.3.2. Medida do pH

Essa verificação foi realizada com um peagâmetro (ATI Orion Research, USA), utilizando eletrodo de vidro. Inicialmente, o aparelho foi ligado e a sua calibração realizada, empregando soluções padrões (pH 4,7 e 9). Em um béquer, uma amostra de 5 mL de dentifrício foi suspensa em 3 partes de água destilada obtendo-se um volume de 20 mL e, após agitação suave, foram realizadas três leituras para obtenção de um valor médio (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Becker com 20 mL de suspensão (5 mL de dentifrício e 15 mL de água).

Figura 4 - Leitura de pH com auxílio de peagâmetro.

3.3.3. Determinação da consistência

A medida da consistência foi baseada no escoamento da amostra, sob uma carga constante em tempo determinado. Sobre uma placa de vidro, foram depositados 5 mL do dentifrício. Outra placa de vidro de peso conhecido foi colocada paralelamente sobre esse conjunto (Figura 5), juntamente com massa necessária para completar 300 g (Figura 6). Transcorridos 10 minutos do início da aplicação da carga, foram realizadas três mensurações do diâmetro da figura formada entre as duas placas de vidro, com o auxílio de uma régua milimetrada posicionada sobre a placa de vidro (Figura 7). A média das três mensurações foi expressa em milímetro.

Figura 5 - Amostra de dentifrício entre duas placas de vidro.

Figura 6 - Peso de 300 g sobre as placas de vidro.

Figura 7 - Mensuração do diâmetro do dentífrico com régua milimetrada.

3.3.4. Avaliação das características reológicas

O estudo das características reológicas permite conhecer as propriedades de escoamento e deformação dos materiais sob a influência de forças externas. Engloba elasticidade, viscosidade, plasticidade, deformação e fluidez da matéria (Brasil – Anvisa, 2008).

A medida das características reológicas do produto foi realizada com um reômetro (Rheotest 2.1 – VEB-MLW-DDR, Lamedid), aparelho que consiste de dispositivo de medição com cilindros coaxiais e de dispositivo de cone e placa (Paranhos et al. 2000b). Após a seleção do dispositivo de medição e condições do aparelho adequadas, as mensurações foram realizadas. Foram colocados 25 mL de amostra no recipiente do aparelho e a escala de velocidades foi acionada. Inicialmente a amostra foi submetida a velocidades crescentes que variaram de 1 a 11. Posteriormente a amostra foi submetida às mesmas velocidades, porém em escala decrescente (da velocidade 11 a 1). A cada velocidade (crescente e decrescente) foram realizadas as leituras. Este ensaio rotativo permite análise do fluxo da amostra por meio da obtenção do valor da viscosidade e, por meio do traçado do reograma, o comportamento tixotrópico, bem como a área formada na figura (área de histerese), podendo-se também, estimar a liberação do princípio ativo do produto.

A viscosidade foi obtida em poise, a tensão de cisalhamento em dina/cm^2 e o gradiente de cisalhamento em s^{-1} .

3.4. Análise da efetividade antimicrobiana dos dentífrícios à base de *Ricinus communis*.

Para análise da efetividade antimicrobiana dos dentífrícios experimentais foram empregados dois métodos, sendo o método de poço-difusão em ágar e o método de formação do biofilme sobre corpos de prova em resina acrílica.

Para parâmetro de comparação, além dos dentífrícios experimentais nas concentrações de 1%, 2%, 5% e 10%, foram empregados também dentífrícios comerciais (Tabela 3).

Tabela 3 - Dentífrícios comerciais empregados.

Dentífrícios	Fabricante	Cidade	País
Colgate com cálcio (não específico para prótese)	Colgate-Palmolive Divisão da Kolynos do Brasil	Osasco	Brasil
Dentu-Creme (específico para prótese)	Dentco, Inc.	Jersey	EUA
Corega Brite (específico para prótese)	GSK - GlaxoSmithKline, Brasil Ltda	Rio de Janeiro	Brasil
Trihydall (para próteses totais e dentes naturais)	Perland Pharmacos Ltda	Cornélio Procópio	Brasil

3.4.1. Método de poço-difusão em Ágar

Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório (NEPECISS).

Todo o teste foi realizado em duplicata frente aos microrganismos apresentados na Tabela 1. A padronização do inóculo microbiano foi realizada com culturas recentes dos microrganismos, obtidas a partir de semeadura em tubos de ensaio com *Muller Hinton Agar* (Difco, Sparks, MD, USA) inclinado e incubado a 37 °C por 24h.

Com auxílio de alça bacteriológica, esterilizada em bico de Bunsen, os inóculos microbianos foram transferidos para tubos de ensaio (15x150 mm) com 6 mL de solução salina a 0,85% para obtenção de turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland. A homogeneização dos inóculos foi realizada em agitador de tubos (Phoenix, AP 56, Araraquara, São Paulo, Brasil) e a padronização em espectrofotômetro, com a leitura da absorbância entre 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625 nm (bactérias: $\sim 10^8$ UFC/mL e leveduras: $\sim 10^6$ UFC/mL).

Os meios *Tryptic Soy Agar* (Difco, Sparks, MD, USA) e *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco, Sparks, MD, USA) preparados seguindo as instruções do fabricante, foram distribuídos em placas de Petri (20 x 10 mm) estéreis para obtenção da camada base de 12 mL. Tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio de cultura esterilizado foram mantidos em banho-maria a ± 45 °C. Nestes tubos foram inseridos 200 μ L dos diferentes inóculos microbianos padronizados, de acordo com o meio de cultura adequado, com auxílio de pipeta automática, para obtenção de 1% do inóculo microbiano. As soluções obtidas foram homogeneizadas em agitador de tubos e 8 mL destas soluções foram transferidos para a placa de Petri e depositados sobre a camada base solidificada com o auxílio de pipeta de vidro (10 mL), formando assim a camada *seed* (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Placa de Petri (20x100 mm) com 12 mL de camada base de *Tryptic Soy Agar*.

Figura 9 - Adição de 8 mL da camada *seed* (meio de cultura com inóculo microbiano) sobre a camada base solidificada.

Após a solidificação desta camada, foram confeccionados 05 poços com 5,0 mm de diâmetro em cada placa de Petri, com auxílio de canudos plásticos e agulha bacteriológica esterilizados em autoclave e bico de Bunsen, respectivamente (Figura 10). Em seguida, em cada poço foram adicionados os diferentes dentífricos, com auxílio de espátulas esterilizadas (Figura 11) e as placas de Petri foram pré-incubadas a temperatura ambiente (25 °C) por 2 horas, para permitir a difusão do produto no meio de cultura. Decorrido o período de pré-incubação, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em estufa microbiológica. Foi colocado papel absorvente no fundo da tampa das placas, para evitar o contato da água de condensação com o meio de cultura (Figura 12).

Figura 10 - Remoção do meio de cultura para formação do poço.

Figura 11 - Inserção dos dentifrícios nos poços do meio de cultura da placa de Petri.

Figura 12 - Pré-incubação das placas de Petri com papel de filtro a temperatura ambiente durante 2 h.

Após o período de incubação, a mensuração dos halos de inibição do crescimento microbiano, formados ao redor dos dentifrícios, foi realizada com o auxílio de régua milimétrica e expressa em milímetros. As medições foram realizadas na maior distância entre

2 pontos no limite exterior da zona de inibição formada em torno do poço. Uma vez que o teste foi realizado em duplicata, foram obtidas duas medidas de cada halo ao redor dos dentifrícios testados para cada microrganismo e em seguida, uma média das duas medidas. Com base nos resultados deste ensaio, foi selecionado o dentifrício experimental que apresentou o melhor resultado para ser utilizado na avaliação da ação antimicrobiana pelo método de formação de biofilme sobre corpos de prova em resina acrílica.

3.4.2. Método de formação de biofilme sobre corpos de prova em resina acrílica.

3.4.2.1. Confeção dos corpos de prova

Foram obtidos 455 corpos de prova em formato discoide com dimensões de 18 mm de diâmetro e 3 mm de espessura em resina acrílica termicamente ativada (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) para base de dentadura. A confecção dos espécimes foi baseada na inclusão de dez matrizes metálicas (Figura 13) de mesmo formato e dimensão em mufla metálica convencional (OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), gesso pedra tipo III (Gesso Rio, Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil) espatulado mecanicamente na proporção 30 mL de água para cada 100 g de pó, e sílica de condensação densa (Zetlabor; Zhermack S.p.A, Badia Polesine, Rovigo, Italy). Toda extensão da matriz foi envolvida, exceto uma das faces planas.

Após a presa do gesso, a mufla foi aberta e o padrão metálico removido (Figura 14) para que a resina fosse acomodada no interior do molde em silicone. A resina foi manipulada conforme as recomendações do fabricante (Figura 15), inseridas nos moldes (Figura 16) e após o fechamento da mufla, esta foi levada a uma prensa hidráulica (Prensa Hidráulica Protecni, Protecni Equip. Med., Araraquara, SP, Brasil) para compactação da resina a 1250 Kgf, por 30 minutos (Figura 17). Os espécimes foram polimerizados pelo método convencional (em banho de água) em polimerizadora automática (Termocicler 100, Oficina de Presição, Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil; Figura 18) à 65 °C por 1 hora, seguido por um estágio a 100 °C por 30 minutos.

Após o resfriamento da mufla em temperatura ambiente (em bancada) e demuflagem dos espécimes, eles foram imersos em água destilada e mantidos em estufa (Odontobrás Ind. e Com. Equip. Med. Odont. Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) a 50 °C por 24 horas para eliminação do monômero residual. Os excessos de material dos corpos de prova foram eliminados com fresa (Maxi-cut, Malleifer AS, Ballaiguer, Swetzerland) (Figura 19).

Figura 13 - Matrizes metálicas.

Figura 14 - Moldes em Zetalabor.

Figura 15 - Manipulação da resina acrílica.

Figura 16 - Resina acrílica acomodada nos moldes em Zetalabor.

Figura 17- Muflas posicionadas em prensa hidráulica.

Figura 18 - Polimerizadora Termocicler T100.

Figura 19 - Corpos de prova após acabamento.

Obtidos os corpos de prova em resina acrílica, os mesmos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- 1) Controle negativo: sem contaminação e higienização por escovação: 5 corpos de prova para cada cepa – total: 35 corpos de prova.
- 2) Controle positivo: contaminado sem higienização por escovação: 10 corpos de prova para cada cepa – total: 70 corpos de prova.
- 3) Escovação com água destilada estéril: 10 corpos de prova para cada cepa – total: 70 corpos de prova
- 4) Escovação com dentifrício experimental a 10% (*Ricinus communis*, Instituto de Química de São Carlos, Prof. Dr. Gilberto Chierice): 10 corpos de prova para cada cepa – total: 70 corpos de prova.
- 5) Escovação com Dentifrício específico para prótese total Dentu Creme: 10 corpos de prova para cada cepa – total: 70 corpos de prova.
- 6) Escovação com dentifrício convencional Colgate com Cálcio: 10 corpos de prova para cada cepa – total: 70 corpos de prova.
- 7) Escovação com dentifrício de uso convencional e específico para prótese Trihydral: 10 corpos de prova para cada cepa – total: 70 corpos de prova.

3.4.2.2. Esterilização dos corpos de prova

Os corpos de prova de cada grupo com 10 e 5 espécimes foram acondicionados em envelopes especiais com uma face de plástico (Envelope Grau Cirúrgico Termo-selável, Sispack, SP, Brasil) devidamente selados e submetidos à esterilização com óxido de etileno.

Os envelopes foram colocados no aparelho SERCON MP300 com câmara modelo HG (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP) programado no ciclo 1 com pré-vácuo de 20 minutos a 55°C, esterilização de 180 minutos, hiperventilação de 120 minutos, pressão de 50 Kgf/cm² e vácuo de 50 Kgf/cm².

3.4.2.3. Meios de cultura utilizados.

3.4.2.3.1. Mueller Hinton Broth (HB)

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo microbiano e contaminação dos corpos de prova com *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*. O período de incubação foi de 48 h a 37 °C. Para cada 21,0 g do meio de cultura desidratado *Mueller Hinton Broth* (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2.3.2. Mueller Hinton Agar (MHA)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura da suspensão obtida após a escovação dos corpos de prova contaminados com *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis* (37 °C por 24 h). Para cada 38 g do meio de cultura desidratado *Mueller Hinton* (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2.3.3. Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo microbiano e contaminação dos corpos de prova com *C. albicans* e *C. glabrata* (37 °C por 48 h). Para cada 30,0 g do meio de cultura desidratado *Sabouraud Dextrose* (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2.3.4. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura da suspensão obtida após a escovação dos corpos de prova contaminados com *C. albicans* e *C. glabrata* (37 °C por 24 h). Para cada 65,0 g do meio de cultura desidratado *Sabouraud Dextrose Agar* (HiMedia, Mumbai, India), foram adicionados 1000,0 mL de água destilada, seguida de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos segundo as instruções do fabricante.

3.4.2.3.5. Sb 20-modificado

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo microbiano e contaminação dos corpos de prova com *S. mutans* (37 °C por 48 h). Para preparo, foram adicionados 15 g de casitona (HiMedia, Mumbai, India), 5 g de extrato de levedura (HiMedia, Mumbai, India), 0,2 g de cisteína (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), 0,1 g de sulfito de sódio (Chemco, Hortolândia, Brasil), 20 g de acetado de sódio (Dinâmica, Diadema, Brasil), 200 g de sacarose (Dinâmica, Diadema, Brasil) em 1000,0 mL de água destilada, seguindo esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos (Davey e Rogers, 1984).

3.4.2.3.6. Mitis Salivarius Agar Base (MS)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura da suspensão obtida após a escovação dos corpos de prova contaminados com *S. mutans* (37 °C por 24 h). Segundo o fabricante, para cada 90,0 g do meio de cultura desidratado *Mitis Salivarius Agar Base* (HiMedia, Mumbai, India), foram adicionados 1000,0 mL de água destilada, seguida de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após o resfriamento do meio de cultura a uma temperatura entre 50-55 °C foi adicionado 20% de sacarose.

3.4.2.3.7. Tryptone Soya Broth (TSB)

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo microbiano e contaminação dos corpos de prova com *E. faecalis* (37 °C por 24 h). Para cada 30,0 g do meio de cultura desidratado *Tryptone Soya Broth* (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2.3.8. Tryptone Soya Agar (TSA)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura da suspensão obtida após a escovação dos corpos de prova contaminados com *E. faecalis* (37 °C por 24 h). Para cada 40,0 g do meio de cultura desidratado *Tryptone Soya Agar* (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2.3.9. Lethen Broth (LB)

Este meio de cultura foi utilizado para a avaliação de esterilidade (Controle negativo) e confirmação da contaminação, por “submersão”, dos corpos de prova com os microrganismos estudados (Controle positivo).

Para cada 25,7 g do meio de cultura desidratado *Lethen Broth* (Difco, Detroit, EUA) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada. O meio de cultura foi distribuído em alíquotas aproximadas de 10,0 mL para cada tubo de ensaio (20x200 mm), que posteriormente foram tamponados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2.4. Contaminação dos corpos de prova e formação do biofilme

Para a padronização dos inóculos selecionados, os microrganismos foram adicionados à solução salina a 0,85%. A turvação da suspensão microbiana foi verificada seguindo a escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/ml para as bactérias e 10^6 UFC/mL para as leveduras) obtidas em espectrofotômetro, com a leitura da absorbância entre 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625 nm. Em seguida, foi realizada a inoculação do meio de cultura a uma concentração de 1%.

Assepticamente, em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, São Paulo, Brasil) os 10 corpos de prova de cada grupo foram distribuídos em placas para cultura celular de 12 poços, de forma que cada grupo correspondeu a uma placa (Figura 20). Para o controle negativo, apenas 5 corpos de prova foram colocados na placa de cultura celular.

Figura 20 - Distribuição dos corpos de prova esterilizados na placa de cultura celular.

Cada poço recebeu 2 mL de meio de cultura inoculado, com exceção do grupo controle negativo, o qual recebeu 2 mL de meio de cultura estéril (Figura 21). As placas foram incubadas a 37 °C por 1 h e 30 minutos sob agitação de 75 rpm em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker, Mod.- CE-320, Cienlab, Campinas, SP, Brasil) (Figura

22) para aderência dos microrganismos aos corpos de prova. Passado esse período, cada corpo de prova e poço foi lavado com solução salina a 0,85% para a remoção dos microrganismos não aderidos (Figura 23).

Figura 21 - Inserção do meio de cultura nos poços do grupo controle negativo.

Figura 22 - Estufa bacteriológica.

Figura 23 - Lavagem dos corpos de prova e poço com solução salina a 0,85%.

Após a lavagem, 2 mL de meio de cultura estéril foram novamente inseridos em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 75 rpm por 48 h para a maturação do biofilme. Após esse período os corpos de prova foram submetidos ao procedimento de higiene por escovação de acordo com os grupos de dentifrícios.

3.4.2.5. Procedimento de higienização dos corpos de prova - Aplicação do Método de Higiene por escovação com os diferentes dentifrícios.

Previamente à escovação, os dentifrícios foram dispensados em recipientes plásticos opacos de cor branca e identificados por letras, por um pesquisador diferente daquele que realizou a escovação, a contagem dos microrganismos e a análise estatística, buscando desta forma, a eliminação de viés. A escovação foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador, o qual foi previamente treinado e calibrado para o procedimento.

Em câmara de fluxo laminar, com auxílio de pinça esterilizada, cada corpo de prova foi retirado da placa de cultura celular e as superfícies (planas e laterais) foram escovadas por 20 segundos (total de 60 segundos), com escova dental (esterilizada) de cerdas macias Tek (Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda., S. J. dos Campos, Brasil) e água ou dentifrício higienizador (Figura 24).

Para a escovação com dentifrício, as cerdas da escova foram umedecidas com água destilada esterilizada e sobre elas, foi dispensado aproximadamente, 5 mm de dentifrício. Em seguida, os corpos de prova foram lavados com 50 mL de água destilada estéril por meio de uma seringa hipodérmica para eliminação do dentifrício, e colocados em tubos de ensaios contendo 10,0 mL de meio LB.

Figura 24 - Escovação do espécime contaminado com escova e dentifrício.

3.4.2.6. Semeadura do meio de cultura para avaliação da ação antimicrobiana dos dentifrícios.

O conjunto tubo de ensaio/corpo de prova foi levado a uma cuba de ultrassom (Altsonic, Clean 9CA, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 20 min, para que houvesse o desprendimento dos microrganismos não removidos pelo procedimento de higienização.

Para que fosse realizada a semeadura dos meios de cultura específicos em placas de Petri, para cada microrganismo, a solução contida nos tubos de ensaio foi diluída de forma seriada. Para isso, os tubos foram individualmente agitados em agitador de tubos de ensaio (Phoenix, AP 56, Araraquara, São Paulo, Brasil) e uma alíquota de 50 µL foi transferida para um eppendorf contendo 450 µL de salina a 0,85%. Esse procedimento foi realizado 3 vezes para cada espécime dos grupos controle positivo e 2 vezes, para os demais grupos, obtendo-se assim diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} . Uma alíquota de 50 µL de cada diluição foi transferida à placa de Petri e espalhada sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Em seguida, as placas de Petri foram submetidas à incubação a 37 °C por 24 horas em estufa microbiológica. Cabe salientar que para o *S. mutans* e *E. faecalis*, a incubação se deu em microaerofilia (Figura 25).

Figura 25 - Placas de cultura em microaerofilia contendo meio de cultura e corpos de prova em resina contaminados com *S. mutans*.

Após o período de incubação, todas as placas de Petri de cada diluição, foram posicionadas em uma lupa microscópica (Nikon, Japão) para contagem e registro do número de UFC. Para o cálculo das UFC/espécime (10 mL), foi considerada a diluição em que o número de UFC variou entre 30 a 300 colônias e foi utilizada a seguinte fórmula:

$\text{UFC}/10 \text{ mL} = (\text{número de colônias} \times 10^n/q) \times 10$, onde n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2 ou 3) e q equivale à quantidade, em mL (0,05), pipetada para cada diluição quando nas sementeiras das placas. O resultado obtido ao final foi multiplicado por 10 para obtenção da quantidade de UFC pelo volume total.

Os tubos de ensaio contendo os corpos de prova foram incubados a 37 °C por 24 horas em estufa microbiológica e a turvação foi avaliada e comparada à presença ou ausência do crescimento de microrganismos nas placas semeadas.

Para os Controles Negativo e Positivo, os corpos de prova foram retirados da placa de cultura celular, lavados com água destilada estéril e transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio de cultura LB. O controle positivo teve como objetivo confirmar o crescimento do microrganismo padrão, uma vez que não houve tratamento físico ou químico (apenas água). Por outro lado, o controle negativo serviu para comprovar a esterilidade dos corpos de prova.

3.5. Avaliação da abrasividade

A avaliação da capacidade abrasiva do dentifrício experimental a 10% foi realizada por meio da associação do ensaio de rugosidade e do método gravimétrico.

Como corpos de prova foram utilizadas placas acrílicas pré-fabricadas (Plex Glass, polimetilmetacrilato, Day Brasil S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil) medindo 90 mm de comprimento, 30 mm de largura e 4 mm de espessura, tamanho padronizado para adaptação nas cubas da máquina de escovação. Previamente à submissão dos espécimes à escovação mecânica in vitro, cada corpo de prova foi submetido ao ensaio de rugosidade. Os corpos de prova foram demarcados em três regiões centrais, para que a leitura da rugosidade superficial (R_a) pudesse ser feita sempre nos mesmos locais (Figura 26), dentro do curso a ser percorrido pelas escovas.

Figura 26 - Corpo de prova em plex-glass com as marcações para orientação de leitura de rugosidade.

A rugosidade foi mensurada em um Rugosímetro (Surftest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japan) com um Cutt off de 0,8 mm, de forma que a ponta da agulha percorreu uma área de 4,8 mm durante cada leitura. A partir das três leituras, uma média de rugosidade inicial (RI) foi atribuída a cada espécime.

Na sequência, os corpos de prova foram pesados em balança eletrônica analítica com sensibilidade de 0,1 mg e capacidade de 210 g (Ohaus, Explorer, EUA, Figura 27), para obtenção da massa inicial do espécime seco. Em seguida, eles foram imersos em água destilada e pesados diariamente até a obtenção de uma massa estável (massa úmida) para proceder-se a escovação. Este procedimento buscou a estabilização do processo de absorção de líquidos que a resina acrílica pode sofrer durante a escovação, uma vez que os corpos de prova foram mantidos em meio líquido composto pela suspensão do dentífrício.

Figura 27 - Pesagem dos corpos de prova em balança analítica de precisão.

Obtidos os valores da rugosidade superficial inicial (RI) e o peso úmido inicial (PU), procedeu-se à escovação mecânica com o auxílio de uma máquina do tipo Pepsodent (MAVTEC – Com. Peças, Acess. e Serv. Ltda. ME, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 28), que permite o ensaio de seis amostras simultaneamente com velocidade de 356 rotações por minuto e curso percorrido pela escova correspondente a 3,8 centímetros. O peso da sapata com a escova acoplada é de 200 gramas. Foram utilizadas escovas macias (Tek, Johnson &

Johnson Industrial Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil), sendo uma para cada corpo de prova. Estas escovas tiveram seus cabos cortados (Figura 29) para serem encaixadas e fixadas por meio de parafusos colocados nas laterais e na parte superior do suporte da máquina. O ajuste correto desses parafusos permitiu o nivelamento adequado da escova.

Figura 28 - Máquina de escovação artificial.

Figura 29 - Escova após remoção do cabo.

Um volume suficiente de cada dentifrício foi suspenso em água destilada (proporção 1:1) e vertido nas cubas do aparelho sobre os corpos de prova. Um grupo controle foi constituído pela associação da escova e água destilada.

Os tempos de escovação foram: 50 minutos (17800 ciclos), 100 minutos (35600 ciclos), 200 minutos (71200 ciclos) e 300 minutos (106800 ciclos). As escovas foram substituídas por novas em cada intervalo de 100 minutos, e as suspensões de escovação a cada 50 minutos. Os 17800 ciclos corresponderam a um ano de exposição à escovação por um indivíduo saudável, enquanto que 106800 ciclos corresponderam a 6 anos (Takeuchi et al., 2003).

Após o ensaio de escovação, os corpos de prova foram removidos, lavados com água corrente, secos com folhas de papel absorvente e novamente pesados para obtenção do peso final (PF). Os resultados foram obtidos pela diferença entre o peso úmido (PU) e o peso obtido após a escovação (PE), em gramas (método Gravimétrico). Em seguida, os espécimes foram submetidos à nova mensuração da rugosidade (RF), segundo o padrão acima citado.

3.6. Análise dos dados

Os resultados dos testes de CIM e a análise ação antimicrobiana dos dentifrícios pelo método de poço-difusão em ágar estão informados em tabelas auto explicativas. Os resultados das características organolépticas e das análises características físico-químicas estão apresentados em tabelas e figuras.

Os resultados da ação antimicrobiana pelo método de formação do biofilme foram expressos em UFC/10 mL e transformados em log10. Verificada a distribuição normal (teste de Levene) e homogênea (Teste de Shapiro-Wills) dos dados, foram aplicados os testes One-Way Anova e Tukey-HSD com $p < 0,05$.

Os resultados do método gravimétrico e da rugosidade foram analisados por meio do teste ANOVA (One-Way) e teste de Tukey-HSD com $p < 0,05$. Foi considerado como fator de variação somente os dentifrícios, uma vez que, foi obtida a variação do peso e rugosidade entre as mensurações iniciais e finais.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da Concentração inibitória mínima (CIM) do *Ricinus communis*

A concentração inibitória mínima do *Ricinus communis* para todos os microrganismos foi de 0,0781%, com exceção da *Escherichia coli* (Tabela 4), a qual não foi inibida até a concentração máxima de 2,5%.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima do *Ricinus communis* frente aos microrganismos padrão.

	CIM (µg/L)	CIM (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	195	0,0195
<i>Escherichia coli</i>	---	---
<i>Streptococcus mutans</i>	< 48	< 0,0048
<i>Enterococcus faecalis</i>	195	0,0195
<i>Candida albicans</i>	781	0,0781
<i>Candida glabrata</i>	781	0,0781
<i>Bacillus subtilis</i>	< 48	< 0,0048

*A concentração inicial do *Ricinus communis* analisada foi de 25.000 µg/L ou 2,5%. Onde há traço indica que não houve inibição.

4.2. Características organolépticas

Por meio da tabela 5, pode-se observar que os dentifrícios experimentais nas concentrações de 5 e 10% apresentaram alterações de cor após 60 e 90 dias, respectivamente. Os dentifrícios a 1 e 5% apresentaram alteração do aspecto após 60 dias.

Tabela 5 - Características organolépticas dos dentifrícios experimentais.

Características		15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Dentifrício a 1%	Aspecto	normal, sem alteração	normal, sem alteração	levemente separado	levemente separado
	Cor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Odor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Sabor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
Dentifrício a 2%	Aspecto	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Cor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Odor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Sabor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
Dentifrício a 5%	Aspecto	normal, sem alteração	normal, sem alteração	modificado	modificado
	Cor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	modificada	modificada
	Odor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Sabor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
Dentifrício a 10%	Aspecto	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Cor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	modificada
	Odor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Sabor	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração

4.3. Características físico-químicas

A tabela 6 apresenta as medidas de densidade, pH e consistência do dentifrício experimental a base de *Ricinus communis* nas concentrações de 1, 2, 5 e 10%. O dentifrício a 1% apresentou a maior densidade. Todas as concentrações de dentifrícios apresentaram pH neutro e a formulação a 10% apresentou a menor consistência.

Tabela 6 - Valores de densidade, pH e consistência do dentifrício experimental a base de *Ricinus communis* nas concentrações de 1, 2, 5 e 10%

	Experimental a 1%	Experimental a 2%	Experimental a 5%	Experimental a 10%
Densidade (g/mL)	1,2	0,121	0,107	0,103
pH	7,04	7,12	7,58	7,73
Consistência (mm)	41,52	34	43	60

A partir dos dados obtidos no ensaio de reologia (Tabelas A1, A2, A3, A4 -Apêndice) foram obtidos os gráficos apresentados nas figuras 30, 31, 32 e 33 e a Tabela 7, onde pode ser observado um comportamento típico de material com característica tixotrópica, ou seja, com baixa viscosidade.

Figura 30 - Resultado do ensaio de reologia do dentifrício experimental a 1%.

Figura 31 - Resultado do ensaio de reologia do dentifrício experimental a 2%.

Figura 32 - Resultado do ensaio de reologia do dentifrício experimental a 5%.

Figura 33 - Resultado do ensaio de reologia do dentifrício experimental a 10%.

Tabela 7 - Comportamento reológico (viscosidade e área de histerese) dos dentifrícios experimentais.

Dentifrício Teste	Experimental a 1%	Experimental a 2%	Experimental a 5%	Experimental a 10%
Viscosidade (cps)	24154,32099* 17253,08642**	46008,23045* 18403,29218**	20703,70370* 11502,05761**	11502,05761* 9201,64609**
Área de Histerese (cm²)	5,2	8,24	6,5	5,6

Legenda: * viscosidade da curva ascendente e, ** viscosidade da curva descendente, cps: centipoise.

O dentifrício a 2% apresentou-se mais viscoso, enquanto o dentifrício a 10%, o menos viscoso. Quanto à área de histerese, o dentifrício a 2% apresentou maior área, enquanto o dentifrício a 1%, a menor.

4.4. Avaliação da ação antimicrobiana

4.4.1. Atividade antimicrobiana do dentifrício experimental pelo método do poço-difusão em Ágar

A tabela 8 apresenta a média dos halos obtidos, em milímetros. Pode-se observar que nenhum dentifrício mostrou-se efetivo contra a *Escherichia coli*. Os dentifrícios experimentais mostraram atividade antimicrobiana somente contra as bactérias, não sendo efetivo contra as espécies de *Candida* estudadas.

Tabela 8 - Médias dos diâmetros dos halo de inibição em mm dos dentifrícios frente aos microrganismos selecionados.

	Colgate	Trihydall	Corega	Exp. 1%	Exp. 2%	Exp. 5%	Exp. 10%
S. a	16,5	16,5	15	6	9,5	9	12
E. c	0	0	0	0	0	0	0
S. m	17	22	13	0	10,5	12	13,5
E. f	15	20	11	0	8,5	10	16
C. a	20,5	19,5	17	0	0	0	0
C. g	21,5	20	15,5	0	0	0	0
B. s	21,5	18	14	9	13,5	13	15,5

Sendo: S.a (*Staphylococcus aureus*); E.c (*Echerichia coli*); S.m (*Streptococcus mutans*); E.f (*Enterococcus faecalis*); C.a (*Candida albicans*); C.g (*Candida glabrata*); B.s (*Bacillus subtilis*); Exp. 1%, Exp. 2%, Exp. 5%, Exp. 10% (dentifrícios experimentais a base de *Ricinus communis*, e suas respectivas concentrações).

4.4.2. Método de formação de biofilme sobre corpos de prova em resina acrílica

A tabela 9 apresenta o resultado da turvação do meio de cultura dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após a escovação e incubação. Sinal (-) indica ausência de turvação e conseqüentemente a comprovação da esterilidade. Sinal (+) indica crescimento de microrganismo.

Tabela 9 - Turvação do meio de cultura dos tubos de ensaio contendo os corpos-de-prova após a escovação e incubação.

Grupos	Microrganismos						
	S.a	E.c	C.a	C.g	B.s	S.m	E.f
Controle negativo	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+	+	+
Água	+	+	+	+	+	+	+
Colgate	+	+	+	+	+	+	+
Experimental a 10%	+	+	+	+	+	+	+
Dentu Creme	+	+	+	+	+	+	+
Trihydrall	+	+	+	+	+	+	+

Obtidos os dados da contagem de UFC/10 mL dos 07 microrganismos avaliados para cada dentifrício, água e controles positivo e negativo (Tabela A5 – Apêndice), os mesmos foram submetidos à Análise de variância (Tabela 10) que indicou diferença estatística entre os grupos para todos os microrganismos, exceto para o *B. subtilis*. A tabela 11 apresenta a comparação das médias e desvio padrão das UFC/espécime (10 mL) (em log10) em cada grupo.

Tabela 10 - Análise de variância (One-Way ANOVA) dos valores de UFC/10 mL.

Microrganismos	Soma dos quadrados	G.L.	Quadrados médios	F	Sig.
<i>S. aureus</i>	42,551	5	8,510	21,886	0,000
<i>E. coli</i>	52,526	5	10,505	5,932	0,000
<i>C. albicans</i>	6,694	5	1,339	3,812	0,005
<i>C. glabrata</i>	73,796	5	14,759	63,870	0,000
<i>B. subtilis</i>	12,492	5	2,498	1,383	0,245
<i>S. mutans</i>	97,133	5	19,427	35,095	0,000
<i>E. faecalis</i>	21,317	5	4,263	9,315	0,000

Tabela 11 - Comparação das médias (DP) das UFC/espécime, entre os grupos.

Grupos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. faecalis</i>
Controle positivo	6,10 ^A ±0,55	3,93 ^A ±0,44	3,99 ^A ±0,44	6,13 ^A ±0,27	1,90 ^A ±1,53	7,77 ^A ±0,01	4,72 ^A ±0,62
Água	4,86 ^B ±0,43	2,34 ^{AB} ±1,68	3,41 ^{AB} ±0,66	5,28 ^B ±0,56	1,52 ^A ±1,11	7,58 ^A ±0,24	3,85 ^{AB} ±0,70
Colgate	4,78 ^B ±0,72	2,00 ^B ±1,79	3,76 ^{AB} ±0,78	3,84 ^C ±0,49	1,87 ^A ±1,44	5,29 ^B ±0,79	3,82 ^B ±0,83
Experimental	4,99 ^B ±0,53	1,53 ^B ±1,63	3,98 ^A ±0,57	3,96 ^C ±0,54	1,56 ^A ±1,73	7,26 ^A ±0,67	3,66 ^{BC} ±0,56
Dentu Creme	3,51 ^C ±0,57	1,04 ^B ±1,15	3,23 ^{AB} ±0,23	2,94 ^D ±0,35	1,25 ^A ±1,14	4,57 ^B ±0,65	2,84 ^C ±0,81
Trihydrall	3,83 ^C ±0,86	1,47 ^B ±0,64	3,18 ^B ±0,70	3,35 ^{CD} ±0,59	1,50 ^A ±0,94	5,33 ^B ±1,33	3,13 ^{BC} ±0,46

Letras iguais representam igualdade estatística, entre os grupos para um mesmo microrganismo.

O dentifrício experimental a 10% apresentou atividade antimicrobiana semelhante a alguns dos dentifrícios comerciais testados: para *E. faecalis* foi semelhante ao Colgate, Dentu Creme e Trihydrall; *C. glabrata*, semelhante ao Colgate e Trihydrall; *S. aureus*, semelhante ao Colgate e escovação com Água; *C. albicans*, semelhante ao Colgate, Dentu Creme, grupo Controle positivo e a Água. Para a *E. coli* e *B. subtilis* todos os dentifrícios apresentaram atividade antimicrobiana semelhante, porém para o *B. subtilis* os dentifrícios também apresentaram atividade semelhante aos grupos Controle positivo e Água. Para o *S. mutans* o dentifrício experimental não apresentou uma atividade antimicrobiana favorável, uma vez que sua ação foi semelhante somente aos grupos Controle positivo e Água.

As figuras A3 a A5 (Apêndice) apresentam exemplos do crescimento de alguns microrganismos após a escovação com os diferentes dentifrícios e água.

4.5. Avaliação da abrasividade.

A tabela A6 (Apêndice) apresenta os pesos dos espécimes antes (PU) e após a escovação (PE), bem como a variação entre os dois períodos (PE-PU).

A análise estatística (Tabela 12) indicou diferença significativa entre os dentifrícios ($p = 0,00$). A menor perda de peso foi promovida pela escovação com água. O dentifrício experimental promoveu perda de peso similar ao Dentu Creme e Trihydrall, com valores intermediários, sendo o Colgate, o dentifrício que promoveu a maior perda de peso (Figura 34).

Tabela 12 - Análise de variância (One-Way ANOVA) do método gravimétrico.

	Soma dos Quadrados	G.L.	Quadrados Médios	F	Sig.
Modelo corrigido	0,010	4	0,003	200,193	0,000
Interação	0,039	1	0,039		0,000
Dentifrício	0,010	4	0,003	200,193	0,000
Erro	0,000	25	1,258		
Total	0,049	30

Figura 34 - Comparação da perda de peso (g) e desvio-padrão promovida pela escovação com os dentifrícios e com água. Cores iguais indicam igualdade estatística.

A tabela A7 (Apêndice) apresenta os valores de rugosidade superficial (Ra) obtidos antes da escovação (RI), após a escovação dos espécimes (RF), bem como a variação entre as médias (RF – RI). O teste estatístico indicou que houve diferença significativa entre os dentifrícios (Tabela 13). A comparação das médias (DP) está apresentada na Figura 35. A maior rugosidade superficial foi promovida pelo dentifrício experimental e pelo Colgate. Os dentifrícios Dentu Creme e Trihydrall não apresentaram diferença significativa entre si. A escovação com água foi responsável pelos menores valores de rugosidade.

Tabela 13 - Análise de variância (One-Way ANOVA) da rugosidade superficial.

	Soma dos quadrados	G.L.	Quadrados médios	F	Sig.
Modelo corrigido	1231,500	4	307,875	44,393	0,000
Interação	3102,257	1		447,324	0,000
Dentifrício	1231,500	4	307,875	44,393	0,000
Erro	173,379	25	6,935		
Total	4507,136	30

Figura 35 - Comparação das médias (DP) da rugosidade superficial (Ra) promovida pela escovação com água e dentifrícios. Cores iguais indicam igualdade estatística.

As figuras 36 a 40 apresentam espécimes após a escovação com os diferentes dentifrícios e água.

Figura 36 - Espécime escovado com dentifrício Colgate

Figura 37 - Espécime escovado com dentifrício Experimental.

Figura 38 - Espécime escovado com dentifrício Dentu creme.

Figura 39 - Espécime escovado com dentifrício Trihydral.

Figura 40 - Espécime escovado Água.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O biofilme se apresenta como uma população de microrganismos bastante variável, podendo ser encontrados fungos, bactérias, protozoários e até mesmo vírus (Rozen et al., 2001), além de ser uma estrutura bastante complexa que se difere nos diferentes sítios da cavidade bucal (Marsh et al., 1992; Spolidori et al., 2003; Sachdeo et al., 2008) devido às variações na presença de receptores para a adesão dos microrganismos e a capacidade de fornecimento de nutrientes (Marsh et al., 1992). A formação do biofilme ocorre em duas etapas: na primeira, há a adsorção de células na película adquirida e na segunda, há a ligação de uma célula a outra (Rosan e Lamont, 2000). As bactérias são responsáveis pela primeira etapa, produzindo polissacarídeos extracelulares que formam a matriz orgânica protetora, responsável pela adesão do biofilme às superfícies duras (Rozen et al., 2001). A partir dessa etapa o biofilme vai se transformando numa população bastante organizada, a consistência em gel da matriz de polissacarídeo (Palmer e White, 1997) e a presença de células mortas na superfície do biofilme agem como barreiras (Auschill et al., 2001) para a entrada de agentes antimicrobianos. Sendo assim, a busca por produtos para higienização bucal e protética é relevante, uma vez que o controle do biofilme é fundamental, pois possui espécies variadas de microrganismos que podem causar infecções desde Candidíase Atrófica Crônica até infecções gastrointestinais (Andrucioli et al., 2004) e pulmonares por aspiração de biofilme (Green, 1979; Martin et al., 1994).

Com o intuito de controlar os microrganismos da cavidade bucal e aparelhos protéticos, o objetivo deste estudo foi avaliar um método de higiene de fácil utilização caracterizado pela escovação associando um agente antimicrobiano ao dentífrício. Diferentes veículos podem ser utilizados para a liberação de agentes antimicrobianos e os mais comumente empregados são os colutórios que se constituem em uma mistura de água, álcool, flavorizante, surfactante, umectante e componente ativo; dentífrícios, ótimos por não necessitar da mudança de hábito de higiene do indivíduo; gel, que consiste em um sistema aquoso espesso; dispositivos para depósito, os quais são membranas saturadas de substância ativa, colocadas no local afetado por período determinado; vernizes, cuja aplicação é realizada na superfície dentária e o agente antimicrobiano é liberado lentamente; gomas de mascar e pastilhas, onde a ação do agente antimicrobiano é dependente da liberação do mesmo durante a mastigação ou durante a diluição da pastilha (Torres et al., 2000).

No presente estudo, a escolha do dentifrício como veículo foi baseada na cultura ou hábito da sociedade, em que o uso do dentifrício e escova dental é o método mais difundido e utilizado, além de apresentar menor custo (Peracini et al., 2010) e potencializar a ação da limpeza mecânica das escovas, por meio dos sistemas abrasivo e detergente (Dyer et al., 2001). Quanto à seleção do agente antimicrobiano, estudos na área de odontologia têm sido realizados com o *Ricinus communis*. Na endodontia (Leonardo et al., 2001; Ferreira et al., 2002) e periodontia (Leonel et al., 2003) este fitoterápico foi avaliado como solução irrigante demonstrando ação antimicrobiana. Em prótese total, seus efeitos sobre as propriedades físicas e químicas de resina acrílica, reembasadores e dentes artificiais foram avaliados após diferentes períodos de imersão (Pisani et al., 2010a; Pisani et al., 2010b). Entretanto, ainda são necessários estudos complementares envolvendo outros parâmetros, como potencial antimicrobiano, abrasividade e eficácia na remoção do biofilme, para viabilizar o uso do *Ricinus communis* para indivíduos desdentados.

Um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* foi idealizado e formulado em laboratório e como análises iniciais, foram verificadas suas características físico-químicas e organolépticas, sua ação antimicrobiana frente a sete microrganismos que compõem o biofilme de prótese total e seu potencial abrasivo.

Dentre os microrganismos foram selecionados o *S. mutans*, coco gram-positivo que exerce papel fundamental na colonização inicial do biofilme e é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária (Thein et al., 2006; Carreto et al., 2007). O *S. aureus*, coco gram-positivo que associada à redução da função do sistema imune pode levar a infecções oportunistas (Tada et al., 2006) como a infecção intestinal. As leveduras, *C. albicans* e *C. glabrata*, importantes na instalação e desenvolvimento da Candidíase Atrófica Crônica (Andrucioli et al., 2004). O *E. faecalis*, coco gram-positivo envolvido em várias doenças da cavidade bucal, tais como, periodontites apicais, cáries e infecções endodônticas recorrentes (Paradella et al., 2007) e ainda, pode estar associado a lesões em mucosa bucal em indivíduos imunocomprometidos (Wahlin e Holm, 1988) e na colonização de outros sítios do corpo humano, favorecendo a ocorrência de endocardite bacteriana (Smyth et al., 1987). O *B. subtilis*, bactéria gram-positiva não patogênica que contribui com o crescimento do biofilme e, consequentemente na aderência de outros microrganismos patogênicos (Tam et al., 2006). É comumente empregada como organismo modelo para estudos laboratoriais. A *E. coli*, bactéria bacilar gram-negativa considerada como uma bactéria transitória da cavidade bucal, responsável pela aderência inicial de leveduras sobre várias superfícies (Samaranayake et al., 1989).

Para a formulação adequada do dentifrício, foi necessário realizar o teste de CIM com o *R. communis* em forma de gel puro e determinar a mínima concentração necessária para inibição de todos os microrganismos. De acordo com o resultado obtido somente a *Escherichia coli* não foi inibida até a concentração máxima de 2,5%. Resultados semelhantes foram encontrados por Ito et al. (1999) e Takano et al. (2007). Essa bactéria possui uma membrana externa à parede celular que cobre a fina camada de peptidoglicano, servindo como uma barreira seletiva para a entrada e saída de algumas substâncias (Höfling and Gonçalves, 2010). Além disso, apresentam o espaço periplasmático contendo enzimas capazes de quebrarem moléculas estranhas ao meio (Duffy e Power, 2001), tornando-a altamente resistente. No entanto, Ferreira et al. (2002) avaliaram *in vitro* substâncias utilizadas como agentes antimicrobianos, dentre as quais o detergente de óleo de *Ricinus communis* a 10%, que apresentou-se efetivo contra bactérias gram-negativas, embora de espécies diferentes da *E. coli*. Este resultado sugere a necessidade de outros testes de CIM com o gel de *Ricinus communis* em concentrações maiores. Tal procedimento é seguro, uma vez que não apresenta toxicidade aos tecidos bucais.

Os microrganismos mais sensíveis ao *Ricinus communis* foram inibidos com concentração de 0,0048%, enquanto para as espécies mais resistentes, a CIM foi de 0,0781%. Com base nestes resultados, optou-se por formular os dentifrícios experimentais nas concentrações de 1 e 2% com margem de segurança para os microrganismos mais resistentes e, também, nas concentrações de 5 e 10% com o objetivo de alcançar ação antimicrobiana contra a *E. coli*.

Quando da avaliação da atividade antimicrobiana do dentifrício experimental pelo método do poço-difusão em ágar, verificou-se, novamente, ausência de atividade contra a *E. coli*. Este resultado também foi apresentado pelos dentifrícios comerciais. O dentifrício experimental, em todas as concentrações, não promoveu a formação consistente de halo de inibição do crescimento das espécies de *Candida*, quando comparado aos dentifrícios convencionais, uma vez que pode ser observada uma diminuição na concentração das colônias de leveduras sugerindo alguma atividade antimicrobiana sobre as mesmas (Figuras A1 e A2 - Apêndice).

Dentre os fatores que podem interferir nos resultados relacionam-se à metodologia e técnicas utilizadas (Alves et al., 2008). Para que um agente antimicrobiano desempenhe sua ação por este método (poço-difusão em ágar), é necessário que o princípio ativo se difunda pelo meio. Como o *Ricinus communis* apresenta características hidrofóbicas e o meio de cultura utilizado para o crescimento das leveduras, características hidrofílicas, sua ação pode

ter sido prejudicada contra as leveduras. Além disso, no estudo de Cordeiro et al. (2006) esta metodologia apresentou resultados variáveis em função da técnica, uma vez que encontrou resultados diferentes ao empregar três técnicas (disco de papel, hole plate e template) encontrando inibição da bactéria *P. aeruginosa* nas técnicas que utilizaram o template e o hole plate, porém o mesmo não ocorreu quando da utilização da técnica do disco de papel.

Como composição, um dentifrício é uma somatória de substâncias, sendo constituído de agentes espessantes, abrasivos, umectantes, tensoativos, edulcorantes e flavorizantes. No desenvolvimento de uma formulação de dentifrício, um antimicrobiano e surfactante adequados podem ser escolhidos para maior eficiência na remoção de biofilme (Panzeri et al., 2009). Em função desta característica complexa, a interação entre componentes tão diferentes precisa ser caracterizada, para que a ação do produto formulado, não seja prejudicada. Segundo Cummins e Creeth (1992) a mistura complexa dos componentes de um dentifrício devem ser compatíveis com o agente antimicrobiano, tanto física quanto quimicamente, a fim de que seja um produto estável durante a estocagem e apresente-se eficaz durante sua aplicação. Segundo Moran et al. (2001) alguns aditivos na formulação de dentifrícios podem reduzir ou inibir a atividade de alguns componentes dos mesmos, porém podem também, aumentar a substantividade e atividade clínica (Kjaerheim et al., 1994; Waaler et al., 1994). Com base nestas colocações, estudos com análises complexas de caracterização devem ser realizados, uma vez que o gel de *Ricinus communis* em sua forma pura inibiu as espécies de *Candida* e quando utilizado em associação com outros componentes na formulação do dentifrício experimental, sua ação foi reduzida.

Quando da avaliação das características organolépticas, segundo a ANVISA (Brasil - Anvisa, 2004), o produto deve manter seu aspecto inicial durante todo o período do teste sob todas as condições, exceto quando em temperaturas elevadas ou muito baixas e, quanto à cor, esta deve apresentar-se estável por um período mínimo de 15 dias. A avaliação indicou alteração no aspecto dos dentifrícios experimentais nas concentrações de 1 e 5% com a precipitação de uma fase oleosa o que pode ser explicado pela própria característica oleosa do *R. communis*. Quanto à alteração de cor, esta ocorreu nas concentrações de 5% e 10%, passando de branca a um tom amarelo-marrom, cor semelhante ao gel de *Ricinus communis* puro, talvez por apresentarem uma quantidade maior de gel. Tais alterações foram detectadas após 60 dias de manipulação. Outra hipótese para as alterações observadas é a ocorrência de reações tardias entre os componentes do dentifrício. A seleção dos ingredientes e sua compatibilidade são critérios de extrema importância, uma vez que estão diretamente relacionados à qualidade do dentifrício (ADA, 2001). Após 90 dias, o sabor e o odor mantiveram-se inalterados.

O dentifrício experimental a 1% apresentou a maior densidade (Tabela 6) e, esta propriedade apresenta relação direta com a abrasividade, ou seja, quanto maior a densidade, maior a abrasividade do dentifrício (Teitelbaum, 2008). A obtenção de pH neutro ($\text{pH} > 7$) de todos os dentifrícios experimentais (Tabela 6) foi um resultado satisfatório. Dentifrício com pH ácido pode potencializar a ação abrasiva por meio da associação com o efeito erosivo, aumentando danos à superfície higienizada (Andrade Junior et al., 1998). Além disso, o pH neutro dos dentifrícios pode contribuir para o controle do pH da cavidade bucal durante sua aplicação auxiliando no controle da formação de biofilme, uma vez que as principais bactérias formadoras do biofilme apresentam características acidúricas e acidogênicas. Quanto à medida da consistência (Tabela 6), não há um padrão ideal a ser seguido e está diretamente relacionada à sensação do cliente ao usar o produto e à capacidade de escoamento do mesmo. Quanto menor o diâmetro formado pelo produto ao ser comprimido durante o ensaio, menor o seu escoamento (Teitelbaum, 2008). O dentifrício experimental a 10% apresentou a menor consistência, se comparado aos demais.

Os ensaios de reologia nos mostra o comportamento tixotrópico dos dentifrícios, ou seja, a capacidade do sistema de apresentar baixa viscosidade quando submetido a uma força de cisalhamento e restabelecer-se estruturalmente em curto período de tempo. Esse comportamento é descrito pelas curvas ascendentes e descendentes dos gráficos do ensaio de reologia. A viscosidade é a resistência do sistema ao escoamento (Pereira e Silva, 2000) e, como a consistência, está relacionada com a percepção do usuário em relação ao produto. O dentifrício experimental a 2% apresentou a maior viscosidade, enquanto o dentifrício a 10%, a menor. Na prática clínica, a baixa consistência e baixa viscosidade poderiam ser favoráveis à aplicação do dentifrício a 10% em prótese total, uma vez que seu espalhamento sobre a superfície seria facilitado. No entanto, estudos que avaliem a sua aceitabilidade pelo paciente, devem ser realizados.

O ensaio de reologia também indica a área de histerese resultante das curvas ascendente e descendente dos gráficos, a qual representa a quantidade de energia necessária para a quebra da estrutura em rede do sistema e está relacionada com a liberação do princípio ativo do material analisado. Quanto maior a área de histerese maior a liberação de princípio ativo (Pereira e Silva, 2000). Apesar do dentifrício experimental a 10% não ter apresentado a maior área de histerese, foi o que apresentou melhores resultados no teste microbiológico de poço-difusão em ágar. Isto permite supor que ajustes em sua formulação, visando a obtenção de uma interação entre os componentes que proporcione maior área de histerese poderia representar melhores resultados microbiológicos com a maior liberação do princípio ativo *Ricinius communis*.

Com o intuito de analisar a ação antimicrobiana do dentifrício com *Ricinus communis* por metodologia aplicada à realidade clínica, ou seja, de formação de biofilme sobre espécimes de resina acrílica, a concentração de 10% foi selecionada. Como protocolo, pode ser empregada a formação estática do biofilme (Paranhos et al., 2009) por meio de incubação a 37°C por 48 h sem agitação ou, a formação do biofilme por meio de incubação a 37°C por 48 h sob agitação de 75 rpm (Marra, 2011). A escolha do protocolo foi baseada no fato da formação do biofilme na cavidade bucal não ser estática, uma vez que a musculatura bucal está em constante função.

Durante essa fase da pesquisa pode-se garantir que não houve contaminação bem como, garantir a esterilidade dos espécimes e do meio de cultura, uma vez que observando a turvação do meio de cultura do grupo controle negativo, não foi detectado crescimento microbiano.

O dentifrício experimental a 10% apresentou atividade antimicrobiana semelhante ao Colgate para todos os microrganismos, exceto para *S. mutans*., Trihydrall (*E. faecalis* e *C. glabrata*) e Dentu Creme (*E. faecalis* e *C. albicans*). A ação antimicrobiana do dentifrício Colgate pode ser atribuída ao monofluorofosfato de sódio que atua inibindo o metabolismo enzimático e a adesão das bactérias (Torres et al., 2000). O dentifrício Trihydrall apresenta como princípio ativo a Cloramina T que atua contra os microrganismos por meio de reação de oxidação e por hidrólise proteica, penetrando e rompendo sua parede celular (Torres et al., 2000). O Dentu Creme não apresenta agente antimicrobiano específico, podendo essa função ficar para os agentes surfactantes, uma vez que os mesmos apresentam a propriedade de reduzir a tensão superficial do substrato, interferindo na adesão dos microrganismos.

A CloraminaT é um agente aniônico, bem como o *Ricinus communis*, o qual é classificado como agente tensoativo aniônico permitindo supor que ambos possam apresentar uma atividade antimicrobiana semelhante. Segundo Misseti et al. (2010) a atuação do *Ricinus communis* na parede celular da bactéria se dá por meio do rompimento da ligação glicosídica, ou seja, rompimento da parede. Segundo Takano et al. (2007) a ação do detergente de *R. communis* contra fungos fitopatogênicos ocorre em função dos danos à parede celular que possibilitam a perda de constituintes do citoplasma e consequentemente a morte celular..

O dentifrício experimental não apresentou resultado satisfatório contra o *S. mutans*, apesar deste ter se apresentado sensível ao gel de *Ricinus communis* no teste de CIM e no teste de difusão em ágar (Tabelas 4, 8 e 11). O *S. mutans* possui características que, somadas à complexidade do biofilme, podem explicar sua maior resistência. Esse microrganismo apresenta uma cápsula envolvendo sua parede celular, responsável em promover sua

aderência às superfícies (Murray et al., 2006), e ainda, são capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares que aumentam sua adesão e diminuem o pH do meio, propiciando sua proliferação (Spolidorio et al., 2003). Pode ser observado neste teste que o *S. mutans* foi o microrganismo que apresentou o maior número de UFC após a utilização dos dentifrícios testados.

A *E. coli* não foi inibida por nenhum dentifrício no teste do poço-difusão em ágar, porém no ensaio de formação de biofilme todos os dentifrícios apresentaram atividade antimicrobiana contra a mesma. Como hipótese para esse resultado tem-se o fato da *E. coli* não apresentar boa aderência à superfície do espécime. Busscher et al. (1992) afirma que a formação do biofilme depende da capacidade de adesão do microrganismo à superfície do substrato. Segundo Fletcher (1996), a adesão bacteriana depende da característica da própria bactéria, da suspensão do meio de cultura e do substrato. Sendo assim, não se pode afirmar que os dentifrícios tiveram ação, pois se a adesão é fraca, o procedimento mecânico de escovação pode ter eliminado as bactérias.

Para o *B. subtilis* todos os grupos apresentaram atividade semelhante, incluindo o grupo Controle positivo. Uma hipótese para esse resultado pode ter como base, também, a afirmação de Fletcher (1996) e Busscher et al. (1992). Além disso, sabe-se que o *B. subtilis* trata-se de uma bactéria oportunista comum do meio ambiente (Murray et al., 2006), o que permite supor a possibilidade dessa bactéria não apresentar grande capacidade de adesão à superfícies quando isolada.

A capacidade de adesão dos microrganismos a uma dada superfície relaciona-se com a interação de forças eletrostáticas entre a superfície e o microrganismo, mas também depende de características como polaridade, presença de saliva, hidrofiliicidade do substrato e rugosidade superficial (Morgan et al., 2001; Zamperini et al., 2010). Esta última pode variar em função do polimento da superfície ou da abrasividade dos métodos de higiene. Muitos fatores podem influenciar a abrasividade, como tipo de escova (Dyer et al., 2001), técnica de escovação, frequência de escovação (Kielbassa et al., 2005), força aplicada, tempo gasto durante o processo de higienização, grau de abrasividade do dentifrício (Lara e Panzeri, 1998) e tipo de substrato.

Para a simulação da escovação manual com o dentifrício experimental a 10% foi preconizada a utilização de uma escova de cerdas macias associada à máquina de escovação artificial. Desta forma, pode-se controlar a velocidade, tempo e força (Lara e Panzeri, 1998) de escovação. Segundo Manly et al. (1965) a escovação artificial pode ser mais abrasiva

quando comparada à manual. No entanto, o emprego da máquina é um método simples, padronizado e considerado válido pela ISO/DTS 145692 (Murray et al., 1986).

Existem vários métodos que podem ser utilizados para avaliação da abrasividade de dentífrícios, porém os mais utilizados são a análise de alteração de peso, radiação, rugosidade superficial e o método de escaniamento por microscopia eletrônica de varredura (Pisani et al., 2010c).

Para o presente estudo, foram empregados o método gravimétrico (alteração do peso) e rugosidade superficial. O ensaio de abrasividade pelo método gravimétrico expressa a perda de massa dos espécimes, causada por meio de substâncias (como os dentífrícios) ou objetos (como as escovas). Já o ensaio de rugosidade expressa o quanto a substância ou objeto pode alterar a superfície dos espécimes.

O dentífrício Colgate promoveu a maior perda de peso dos espécimes enquanto os demais dentífrícios (Trihydrall, Dentu Creme e Experimental) promoveram perdas semelhantes entre si e menores que a causada pelo Colgate. Porém, no ensaio de rugosidade superficial o dentífrício Experimental apresentou semelhança ao Colgate que, promoveu a maior rugosidade. Tal resultado não era esperado, uma vez que segundo Pisani et al. (2010c), a sílica utilizada como abrasivo poderia causar perda de peso, porém sem aumentar a rugosidade uma vez que apresenta partículas pequenas e solúveis em água, agindo como agente de polimento.

Os dentífrícios Colgate e Trihydrall apresentam o carbonato de cálcio como sistema abrasivo e o Dentu Creme, além do carbonato de cálcio contém o fosfato dicálcio dihidratado, os quais apresentam variação na forma, tamanho e densidade de seus cristais (Prista et al., 1995). Como o grau de abrasividade é dependente da concentração de abrasivo, dureza, forma e tamanho das partículas do abrasivo (Freitas-Pontes et al., 2009), uma explicação para este resultado pode ser pautada na combinação de sílica abrasiva (Sident 8) e sílica espessante (Sident 22S) empregadas no dentífrício experimental, podendo conferir a ele capacidade abrasiva semelhante ao carbonato de cálcio presente no Colgate. Sendo assim, novos estudos precisam ser realizados na tentativa de identificar a proporção adequada entre o abrasivo e os demais componentes da formulação. Ainda, Stookey e Muhler (1968) observaram uma diferença na abrasão quando comparou diferentes abrasivos, dentífrícios de marcas diferentes contendo o mesmo sistema abrasivo e lotes de um mesmo produto (dentífrício).

Segundo Oliveira et al. (2007) a rugosidade considerada como limite para a retenção de microrganismos é 0,2 μm . Assim pode-se afirmar que, todos os grupos causaram uma rugosidade superficial capaz de promover retenção bacteriana, exceto o grupo Água

(controle). A especificação ISO nº 8627 (1987) apresenta uma classificação do grau de abrasividade dos dentífrícios por meio do ensaio gravimétrico (Pisani et al., 2010c), onde os dentífrícios que apresentarem perda de peso inferior a 21 mg é classificado como sendo de baixa abrasividade; perda entre 21 e 40 mg, média abrasividade e perda superior a 41 mg, alta abrasividade. Sendo assim, pode-se também afirmar que, todos os dentífrícios se classificam como produtos de alta abrasividade.

Segundo Lara e Panzeri (1998), quando se leva em consideração a complexidade de um dentífrício, ao misturarmos todos seus componentes, ocorre naturalmente uma interação entre os mesmos, o que proporciona ao produto final características individuais. Em um estudo realizado por estes autores, foi avaliada a interação entre o agente espessante e o sistema abrasivo por meio de diversas combinações entre os mesmos. Neste estudo foi feita uma classificação do grau de abrasividade, de acordo com o desgaste, em cinco categorias (em ordem crescente de abrasão) e, pôde ser observado que o sistema abrasivo Sident 20 associado ao espessante hidroxietilcelulose foi classificado em grau 3, porém quando associado ao espessante carbopol 940, sua classificação passou a ser de grau 2 e ainda associado ao espessante carboximetilcelulose, sua classificação foi para grau 5. Portanto, o grau de abrasividade não pode ser de responsabilidade única do sistema abrasivo de um dentífrício, mas sim de todo o conjunto de sistemas do produto final (Lara e Panzeri, 1998).

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. O dentifrício experimental a 10% apresentou estabilidade das características organolépticas no período analisado (90 dias);
2. Os dentifrícios experimentais, em todas as concentrações analisadas, apresentaram características físico-químicas satisfatórias, embora a formulação do dentifrício a 10% possa ser reavaliada para obtenção de maior área de histerese e consistência;
3. Pelo método do poço difusão em ágar, nenhuma das formulações experimentais apresentou ação contra *E. coli*, *C. albicans* e *C. glabrata*. Porém, pelo método de formação de biofilme, pode-se identificar ação antimicrobiana do dentifrício a 10% semelhante aos dentifrícios comerciais avaliados, inclusive contra as espécies de *Candida*.
4. Quanto à abrasividade, o dentifrício experimental a 10% apresentou alta abrasividade, bem como os dentifrícios utilizados para comparação.

Para viabilidade clínica do dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* há necessidade de alterações em sua formulação para que se obtenha o mínimo de abrasividade e melhor atividade antimicrobiana.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers. *J Prosthet Dent*. 1981;45(4):376-9.
2. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: Review of the literature. *Gerodontology*. 1985;1(5):202-6.
3. Abere DJ. Post-placement care of complete and removable partial dentures. *Dent Clin North Am*. 1979;23(1):143-51.
4. ADA . Whitening Toothpastes. *J Am Dent Assoc*. 2001;132:1146-7.
5. Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim Nova*. 2008;31(5):1224-9.
6. Andrade IM, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Pisani MX, de Andrade KM, Paranhos Hde F. Trial of experimental toothpastes regarding quality for cleaning dentures. *Int J Prosthodont*. 2012;25(2):157-9.
7. Andrade Junior ACC, Andrade MRT, Machado WAS, Fischer RG. Estudo in vitro da abrasividade de dentífricos. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1998;12(3):231-6.
8. Andruccioli MCD, Macedo LD, Panzeri A, Lara EHG, Paranhos HFO. Comparasion of two cleansing pastes for the removal of biofilm from dentures and palatal lesions in patients with athophic chronic candidiasis. *Braz Dent J*. 2004;15(3):220-4.
9. Anusavice KJ. *Phillips Materiais Dentários*. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 764p.
10. Augsburger RH, Elahi JM. Evaluation of seven proprietary denture cleansers. *J Prosthet Dent*. 1982;47(4):356-9.
11. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brecx M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol*. 2001;46(5):471-6. Errata em: *Arch Oral Biol*. 2001;46(8):780.
12. Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de Produtos Cosméticos / Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. 2a ed. Revista – Brasília: Anvisa, 2008. 12 p. ISBN 8978-85-88233-34-8.
13. Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. 1a ed. Revista – Brasília: Anvisa, 2004. 52 p. ISBN 85-88233-15-0.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 33, de 19 de abril de 2000. Brasília: ANVISA; 2000.

15. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA; 2007.
16. Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000;28(2):141-9.
17. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979;42(6):619-23.
18. Busscher HJ, Cowan MM, van der Mei HC. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiol Rev.* 1992;8(3-4):199-209.
19. Carreto CEP, Navas FAFA, Paradella IC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. 2007. Efeito do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. *Rev Odontol UNESP.* 2007;36(3):281-6.
20. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Antifungal Activity of Three Essential Oils on Candida Strains. *Rev Odontol Bras Central.* 2011;20(52):68-73.
21. Chan ECS, Iogovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, Wooley C, Klitorinos A. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Can Dent Assoc.* 1991;57(12):937-9.
22. Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Lara EHG, Moraes HP. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. *Rev Bras Pl Med.* 2006;8(4):173-82.
23. Council on Dental Materials, Instruments and Equip-ment. Denture cleansers. *J Am. Dent Assoc.* 1983;106(1):77-9.
24. Cummins D, Creeth JE. Delivery of Antiplaque Agents from Dentifrices, Gels, and Mouthwashes. *J Dent Res.* 1992;71(7):1439-49.
25. Cury JA. Dentifrícios: como escolher e como indicar. In: Cardoso RJC, Gonçalves EAN. *Odontologia: odontopediatria/prevenção.* São Paulo: Artes Médicas; 2002. p.281-95.
26. Darr A. *Tecnologia farmacêutica.* 4 ed. Acribia: Quintessence; 1981.
27. Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch. Oral Biol.* 1984;29(6):453-60.
28. Duffy CF, Power RF. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *Int J of Antimicrob Agents.* 2001;17(6):527-9.
29. Dyer D, MacDonald E, Newcombe RG, Scratcher C, Ley F, Addy M. Abrasion and stain removal by different manual toothbrushes and brush actions: studies in vitro. *J Clin Periodontol.* 2001;28(2):121-7.

30. Favero MLD. Desenvolvimento de dentifrício como veículo para o uso do digluconato de clorexidina no controle químico da placa bacteriana. Curitiba, 2004. Tese (Mestrado) Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.
31. Ferran P, Miguel JL, Bousquet A, Dubois J. Hygiène et prophylaxie en prothèse dentaire complète chez la personne âgée. *Inf Dent*. 1984;66(15):1509-15.
32. Ferreira CM, Bonifácio KC, Fröner IC, Ito IY. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigating solutions in teeth with pulpal necrosis. *Braz Dent J* 1999; 1999;10(1):15-21.
33. Ferreira CM, Rosa OPS, Torres SA, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of Endodontic Antibacterial Agents Against Selected Anaerobic Bacteria. *Braz Dent J*. 2002;13(2):118-22.
34. Fletcher M. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. New York: Wiley-Liss, 1996. p. 1-24.
35. Freitas-Pontes KM, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. Mass loss of four commercially available heat-polymerized acrylic resins after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(2):116-21.
36. Garcia LFR, Lia RCC, Lopes RA, Oliveira DA, Pires-de-Souza FCP, Santos HSL. Análise morfológica e morfométrica do tecido subcutâneo de ratos submetidos à ação de pasta de hidróxido de cálcio e óleo de *Ricinus communis*. *Cienc Odontol Bras*. 2008;11(3):47-54.
37. Green SL. Anaerobic pleuro-pulmonary infections. *Postgrad Med*. 1979;65(1):62-74.
38. Haselden CA, Hobkirk JA, Pearson GJ, Davies EH. A comparison between the wear resistance of three types of denture resin to three different dentifrices. *J Oral Rehabil*. 1998;25(5):335-9.
39. Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. *J Prosthet Dent*. 1990;64(1):48-52.
40. Höfling JF, Gonçalves RB. Microbiologia para Odontologia. [s.n]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, 2010. 628 p.
41. Hutchins DW, Parker WA. A clinical evaluation of the ability of denture cleaning solutions to remove dental plaque from prosthetic devices. *N Y State Dent J*. 1973;39(6):363-7.
42. Ito IY, Fröner IC, Mian H, Chierice GO. Castro-Oil: antimicrobial activity of detergent derived from ricinoleic acid. *J Dent Res*. 1999;78:344 (IADR – Abstract).

43. Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing-the best approach. *Br Dent J*. 1995;178(11):413-7.
44. Keng SB, Lim M. Denture plaque distribution and the effectiveness of a perborate-containing denture cleanser. *Quintessence Int*. 1996;27(5):341-5.
45. Kielbassa AM, Gillmann L, Zantner C, Meyer-Lueckel H, Hellwig E, Schulte-Mönting J. Profilometric and microradiographic studies on the effects of toothpaste and acidic gel abrasivity on sound and demineralized bovine dental enamel. *Caries Res*. 2005;39(5):380-6.
46. Kjaerheim V, Waaler SM, Röla G. Significance of choice of solvents for the clinical effect of triclosan-containing mouthrinses. *Scand J Dent Res*. 1994;102(4):202-5.
47. Kulak-Ozkan Y, Kazazolu E, Arıkan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil*. 2002;29(3):300-4.
48. Lai CP, Tsai MH, Chen M, Chang HS, Tay HH. Morphology and properties of denture acrylic resins cured by microwave energy and conventional water bath. *Dent Mater*. 2004;20(2):133-41.
49. Lara EHG, Panzeri H. Estudo da abrasividade de formulações básicas de dentifrícios. *Rev Ciênc Farm São Paulo*. 1998;19(2):207-24.
50. Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(2):179-83.
51. Lemos MMC, Miranda JL, Souza MSGS. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. *Rev Bras Patol Oral*. 2003;2(1):3-10.
52. Leonardo MR, Silva LSB, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In Vitro Evolution of the Antimicrobial Activity of a Castor Oil-Based Irrigant. *J Endodon*. 2001;27(12):717-9.
53. Leonel ECF, Mangilli PD, Ramalho LTO, Sobrinho-Andrade J. Biocompatibility's evaluation of the castor bean's polymers used as filling material in bone defects – histological study in rats. *Rev Odonto Bras Central*. 2003;12(34):55-60.
54. Mäkilä E, Taulio-Korvenmaa A. Denture and oral brush for elderly people. *Proc Finn Dent Soc*. 1988;84(3):197-200.
55. Manly RS, Wiren J, Manly PJ, Keene RC. A method for measurement of abrasion of dentin by toothbrush and dentifrice. *J Dent Res*. 1965;44:533-40.
56. Marra J. Avaliação da atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética combinada a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme. Tese (Doutorado). Araraquara: UNESP-Faculdade de Odontologia de Araraquara. 2011. 103 p.

-
57. Marsh PD, Percival RS, Challacombe SJ. The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. *J Dent Res.* 1992;71(7):1374-81.
58. Martin BJ, Corlew MM, Wood H, Olson D, Golopol LA, Wingo M, Kirmani N. The association of swallowing dysfunction and aspiration pneumonia. *Dysphagia.* 1994;9(1):1-6.
59. Mastrantonio SS, Ramalho LTO. Resposta do tecido conjuntivo de camundongos ao poliuretano vegetal de óleo de mamona. *Rev Odontol UNESP.* 2003;32(1):31-7.
60. Matthes KM. Estudo comparativo “in vitro” da abrasividade de escovas dentais e específicas para próteses sobre resinas acrílicas submetidas a diferentes métodos de polimerização. Ribeirão Preto, 2005. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 116p.
61. Matthes KM. Estudo comparativo “in vitro” da resistência de resinas acrílicas termopolimerizáveis e de dentes artificiais de resina acrílica à abrasão por escovação. Ribeirão Preto, 2003. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 82p.
62. Meneghin MP, Nomeline SMB, Souza-Neto M, Marchesan MA, França SC, Santos HSL. Morphologic and morphometric analysis of the root canal apical third cleaning after biomechanical preparation using 3.3% *Ricinus communis* detergent and 1% NaCl as irrigating solutions. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3):178-82.
63. Messetti MA, dos Santos AM, de Angelis DF, Chierice GO, Claro Neto S. Estudo do Derivado do Óleo de *Ricinus communis* L. (mamona) como Agente Biocida e Redutor da Viscosidade Produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em Indústrias Sucroalcooleiras. *Arq Inst Biol.* 2010;77(2):301-8.
64. Moran J, Addy M, Newcombe RG, Marlow I. A study to assess the plaque inhibitory action of a newly formulated triclosan toothpaste. *J Clin Periodontol.* 2001;28(1):86-9.
65. Morgan TD, Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depthfilm fermentor. *J Appl Microbiol.* 2001;91(1):47-53.
66. Moskona D, Kaplan I. Oral lesions in elderly denture wearers. *Clin Prevent Dent.* 1992;14(5):11-4.
67. Murray ID, McCabe JF, Storer R. Abrasivity of denture cleaning pastes in vitro and in situ. *Br Dent J.* 1986;161(4):137-41.
68. Murray PC, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica.* 5ª ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda., 2006. p.11-35, 187-455.
69. Nasri F. The aging population in Brazil. *Einstein.* 2008;6(Supl 1):S4-S6.

70. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont*. 1999;12(2):153-9.
71. Oliveira LV, Mesquita MF, Henriques GE, Consani RL. The effect of brushing on surface roughness of denture lining materials. *J Prosthodont*. 2007;16(3):179-84.
72. Palmer RJ Jr, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol*. 1997;5(11):435-40.
73. Panzeri H, Lara EHG, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Gugelmin MCMS, Tirapelli C, Cruz PC, Andrade IM. In vitro and clinical evolution of specific dentifrices for complete denture hygiene. *Gerodontology*. 2009;26(1):26-33.
74. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis* considerações clínicas e microbiológicas. *Rev Odontol UNESP*. 2007;36(2):163-8.
75. Paranhos HFO, Lara EHG, Panzeri H, Candido R.C, Ito IY. Capacity of denture plaque/biofilm removal and antimicrobial action of a new denture paste. *Braz Dent J*. 2000a;11(2):97-104.
76. Paranhos HFO, Lara EHG, Pardini LC, Ito IY, Panzeri H. Evaluación (em laboratório y clínica) de uma pasta específica para higienización de dentaduras completas. *Rev Fola Oral*. 2000b;Ano VI(18):76-82, Dic.
77. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas-Pontes KM, Watanabe E, Ito IY. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont*. 2009;18(5):427-31.
78. Peracini A, Andrade IM, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J*. 2010;21(3):247-52.
79. Pereira RG, Silva MVS. Comportamento Reológico de Formulações para Dentifrícios. Apresentado no: Congresso Nacional de Engenharia Mecânica – CONEM; 2000. [CD-ROM]. Natal, Rio Grande do Norte, 2000.
80. Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont*. 2010c;19(5):369-73.
81. Pisani MX, Da Silva CH, Paranhos HF, Souza RF, Macedo AP. Evaluation of experimental cleanser solution of *Ricinus communis*: effect on soft denture liner properties. *Gerodontology*. 2010a Nov 17. [Epub ahead of print].
82. Pisani MX, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO, Souza RF, Macedo AP. The Effect of Experimental Denture Cleanser Solution *Ricinus communis* on Acrylic Resin Properties. *Mat Res*. 2010b;13(3):369-73.
83. Prista LN, Bahia MF, Vilar E. *Dermofarmácia e cosmética*. 1ª ed., 2ºv. Porto: Associação Nacional de Farmácia, 1995. p.503-551.

84. Purnaveja S, Fletcher AM, Ritchie GM, Amin WM, Moradians S, Dodd AW. Compability of denture cleansers with some new self curing denture base materials. *Biomaterials*. 1982;3(4):251-2.
85. Richmond R, Macfarlane TV, McCord JF. An evaluation of the surface changes in PMMA biomaterial formulations as a result of toothbrush/dentifrice abrasion. *Dent Mater*. 2004;20(2):124-32.
86. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1599-607.
87. Rozen R, Bachrach G, Bronshteyn M, Gedalia I, Steinberg D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;195(2):205-10.
88. Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont*. 2008;17(5):348-56.
89. Samaranayake LP, Lamb AB, Lamey P-J, Macfarlane TW. Oral carriage of *Candida species* and coliforms in patients with burning mouth syndrome. *J Oral Pathol Med*. 1989;18(4):233-5.
90. Satoh Y, Ohtani K, Maejima K, Morikawa M, Matsuzu M, Nagai E, Toyoma H, Ohwa M, Ohki K, Kaketani M, Nishiyama M. Wear of artificial denture teeth by use of toothbrushes. Part 1: Abrasive wear of anterior teeth. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1990;32(4):247-58.
91. Silva RR, Ferreira GA, Baptista JA, Diniz FV. A química e a conservação dos dentes. *Química Nova na Escola*. 2001; nº13.
92. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans Candida species*. *Curr Microbiol*. 2010;61(6):534-40.
93. Silva-Lovato, C.H.; Paranhos, H.F.O.; Mello, P.C.; Cruz, P.C.; Freitas, K.M.; Macedo, L.D. Levantamento do grau de instruções e dos materiais e métodos de higiene utilizados por usuários de prótese total. *Rev Odontol UNESP*. 2006;35(2):125-31.
94. Smith JM, Sheiham A. How dental conditions handicap the elderly. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1979;7(6):305-10.
95. Smyth CJ, Matthews H, Halpenny MK, Brandis H, Colman G. Biotyping, serotyping and phage typing of *Streptococcus faecalis* isolated from dental plaque in the human mouth. *J Med Microbiol*. 1987;23(1):45-54.
96. Spolidorio DMP, Zuanon ACC, Zuanon JA. Biofilme dentário. *Rev paul odontol*. 2003;25(5):27-9.
97. Stookey GK, Muhler JC. Laboratory studies concerning the enamel and dentin abrasion properties of common dentifrices polishing agents. *J Dent Res*. 1968;47(4):524-32.

98. Tada A, Senpuku H, Motozawa Y, Yoshihara A, Hanada N, Tanzawa H. Association between commensal bacteria and opportunistic pathogens in the dental plaque of elderly individuals. *Clin Microbial Infect.* 2006;12(8):776-81.
99. Takano EH, Busso C, Gonçalves AL, Chierice GO, Guimarães-Catazarro SA, Prado-Castro MAA. 2007. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). *Cienc Rural.* 2007;37(5):1235-40.
100. Takeuchi CYG, Orbegoso Flores VH, Palma Dibb RG, Panzeri H, Lara EHG, Dinelli W. Assessing the surface roughness of a posterior resin composite: effect of surface sealing. *Oper Dent.* 2003;28(3):281-286.
101. Tam NK, Uyem NQ, Hong HA, Duc LH, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO, Cutting SM. The Intestinal Life Cycle of *Bacillus subtilis* and Close Relatives. *J Bacteriol.* 2006;188(7):2692-700.
102. Tanoue N, Matsumura H, Atsuta M. Wear and surface roughness of current prosthetic composites after toothbrush/dentifrice abrasion. *J Prosthet Dent.* 2000;84(1):93-7.
103. Teitelbaum AP. Avaliação do controle mecânico e químico do biofilme dental em pacientes portadores de síndrome de Down. Dissertação. Ponta Grossa: Programa de mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Clínica Integrada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008. 134 p.
104. Teixeira FB, Ferraz CCR, Zaia AA, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ, Oliveira DP. Remoção da smear layer dos canis radiculares utilizando o irrigante Endoquill. *Rev Bras Odontol.* 2001;58(6):424-6.
105. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006;51(8):672-80.
106. Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Rev Fac Odontol.* 2000;3(2):43-52.
107. Valderramas AC, Moura SHP, Couto M, Pasetto S, Chierice GO, Guimarães SAC, Zurron ACBP. Antiinflammatory activity of *Ricinus communis* derived polymer. *Braz J Oral Sci.* 2008;7(27):1666-72.
108. Waaler SM, Röla G, Kjaerheim V. Triclosan-containing mouthwashes – does the nature of the solvent influence their clinical effect? *Scand J Dent Res.* 1994;102(1):46-9.
109. Wahlin YB, Holm AK. Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;65(4):411-7.
110. Zamperini CA, Macgado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol.* 2010;55(10):736-70.

Apêndice

APÊNCICE - A

Tabela A1 - Ensaio do comportamento reológico do dentifrício experimental a 1% (dentifrício 1).

Amostra: Dentrifrício 1

Associação para leitura: BIIC S1

Data: 13/09/11

Velocidade	α	$t=\alpha z$	D	$m=t/D \times 100$
1	7	391,30	0,1800	217388,88889
2	9	503,10	0,3240	155277,77778
3	10	559,00	0,5400	103518,51852
4	12	670,80	0,9720	69012,34568
5	14	782,60	1,6200	48308,64198
6	18	1006,20	2,9160	34506,17284
7	21	1173,90	4,8600	24154,32099
8	28	1565,20	8,7480	17892,08962
9	32	1788,80	14,5800	12268,86145
10	39	2180,10	26,2400	8308,30793
11	44	2459,60	43,7400	5623,22817
12	55	3074,50	78,7200	3905,61484
11	40	2236,00	43,7400	5112,02561
10	31	1732,90	26,2400	6604,03963
9	24	1341,60	14,5800	9201,64609
8	18	1006,20	8,7480	11502,05761
7	15	838,50	4,8600	17253,08642
6	13	726,70	2,9160	24921,12483
5	10	559,00	1,6200	34506,17284
4	9	503,10	0,9720	51759,25926
3	8	447,20	0,5400	82814,81481
2	5	279,50	0,3240	86265,43210
1	4	223,60	0,1800	124222,22222
z=55,9				

Tabela A2 - Ensaio do comportamento reológico do dentifrício experimental a 2% (dentifrício 2).

Amostra: Dentifrício 2

Associação para leitura: BIIC S1

Data: 13/09/11

Velocidade	α	$t = \alpha x z$	D	$m = t/D \times 100$
1	18	1006,20	0,1800	559000,00000
2	19	1062,10	0,3240	327808,64198
3	20	1118,00	0,5400	207037,03704
4	25	1397,50	0,9720	143775,72016
5	30	1677,00	1,6200	103518,51852
6	35	1956,50	2,9160	67095,33608
7	40	2236,00	4,8600	46008,23045
8	46	2571,40	8,7480	29394,14723
9	52	2906,80	14,5800	19936,89986
10	56	3130,40	26,2400	11929,87805
11	61	3409,90	43,7400	7795,83905
12	75	4192,50	78,7200	5325,83841
11	53	2962,70	43,7400	6773,43393
10	39	2180,10	26,2400	8308,30793
9	29	1621,10	14,5800	11118,65569
8	22	1229,80	8,7480	14058,07042
7	16	894,40	4,8600	18403,29218
6	13	726,70	2,9160	24921,12483
5	11	614,90	1,6200	37956,79012
4	8	447,20	0,9720	46008,23045
3	6	335,40	0,5400	62111,11111
2	5	279,50	0,3240	86265,43210
1	4	223,60	0,1800	124222,22222
z=55,9				

Tabela A3 - Ensaio do comportamento reológico do dentifrício experimental a 5% (dentifrício 3).

Amostra: Dentifrício 3

Associação para leitura: BII C S1

Data: 13/09/11

Velocidade	α	$t=\alpha x z$	D	$m=t/D \times 100$
1	4	223,60	0,1800	124222,22222
2	5	279,50	0,3240	86265,43210
3	7	391,30	0,5400	72462,96296
4	10	559,00	0,9720	57510,28807
5	12	670,80	1,6200	41407,40741
6	15	838,50	2,9160	28755,14403
7	18	1006,20	4,8600	20703,70370
8	21	1173,90	8,7480	13419,06722
9	24	1341,60	14,5800	9201,64609
10	30	1677,00	26,2400	6391,00610
11	35	1956,50	43,7400	4473,02241
12	43	2403,70	78,7200	3053,48069
11	32	1788,80	43,7400	4089,62048
10	25	1397,50	26,2400	5325,83841
9	18	1006,20	14,5800	6901,23457
8	14	782,60	8,7480	8946,04481
7	10	559,00	4,8600	11502,05761
6	8	447,20	2,9160	15336,07682
5	6	335,40	1,6200	20703,70370
4	5	279,50	0,9720	28755,14403
3	4	223,60	0,5400	41407,40741
2	2	111,80	0,3240	34506,17284
1	1	55,90	0,1800	31055,55556
z=55,9				

Tabela A4 - Ensaio do comportamento reológico do dentifrício experimental a 10% (dentifrício 4).

Amostra: Dentifrício 4

Associação para leitura: BIIC S1

Data: 13/09/11

Velocidade	α	$t=\alpha x z$	D	$m=t/D \times 100$
1	1	55,90	0,1800	31055,55556
2	2	111,80	0,3240	34506,17284
3	3	167,70	0,5400	31055,55556
4	4	223,60	0,9720	23004,11523
5	6	335,40	1,6200	20703,70370
6	8	447,20	2,9160	15336,07682
7	10	559,00	4,8600	11502,05761
8	13	726,70	8,7480	8307,04161
9	17	950,30	14,5800	6517,83265
10	20	1118,00	26,2400	4260,67073
11	25	1397,50	43,7400	3195,01600
12	32	1788,80	78,7200	2272,35772
11	23	1285,70	43,7400	2939,41472
10	17	950,30	26,2400	3621,57012
9	13	726,70	14,5800	4984,22497
8	9	503,10	8,7480	5751,02881
7	8	447,20	4,8600	9201,64609
6	7	391,30	2,9160	13419,06722
5	6	335,40	1,6200	20703,70370
4	4	223,60	0,9720	23004,11523
3	3	167,70	0,5400	31055,55556
2	2	111,80	0,3240	34506,17284
1	1	55,90	0,1800	31055,55556
z=55,9				

Tabela A5 - UFC/espécime (em log) dos 07 microrganismos avaliados para cada dentifrício, água e controles positivo e negativo.

Microrganismos (UFC/espécime em log)							
Grupos	S. aureus	E. coli	C. albicans	C. glabrata	B. subtilis	S. mutans	E. faecalis
Controle negativo	0	0	0	0	0	0	0
Controle positivo	6,53	4,77	4,01	6,54	1,00	7,78	4,54
	6,15	4,09	3,78	6,03	2,78	7,78	5,46
	6,40	3,56	4,09	6,37	4,20	7,75	4,11
	6,27	3,20	4,08	5,74	2,60	7,78	4,39
	6,77	3,58	4,19	6,22	0,00	7,78	4,37
	5,97	3,64	3,48	6,09	3,30	7,78	4,03
	4,76	4,08	4,07	5,76	2,78	7,78	5,17
	6,33	4,03	4,04	5,96	2,30	7,78	4,65
	5,87	4,20	3,26	6,15	0,00	7,78	5,95
	5,97	4,19	4,90	6,47	0,00	7,78	4,53
Média (DP)	6,10 (±0,55)	3,93 (±0,44)	3,99 (±0,44)	6,13 (±0,27)	1,90 (±1,53)	7,77 (±0,01)	4,72 (±0,62)
Escovação com água	5,48	3,00	2,60	4,62	2,30	7,71	3,66
	4,72	3,41	3,68	5,26	0,00	7,44	4,33
	4,64	2,30	3,66	4,98	2,90	7,37	3,41
	4,47	3,68	3,75	6,45	0,00	7,78	3,79
	4,18	0,00	3,20	4,77	0,00	7,78	2,30
	5,16	0,00	2,90	4,67	0,00	7,78	4,58
	5,55	3,60	4,54	5,31	0,00	7,64	4,34
	4,88	4,15	2,78	5,70	0,00	7,78	3,45
	4,89	3,26	4,18	5,64	0,00	7,43	3,97
	4,66	0,00	2,78	5,44	0,00	7,06	4,63
Média (DP)	4,86 (±0,43)	2,34 (±1,68)	3,41 (±0,66)	5,28 (±0,56)	0,52 (±1,11)	7,58 (±0,24)	3,85 (±0,70)
Escovação Colgate	4,94	0,00	2,78	3,48	2,78	5,15	3,91
	5,16	4,30	4,12	4,21	0,00	5,48	5,45
	5,31	2,60	3,76	3,20	3,64	3,94	3,96
	5,08	3,90	3,08	4,25	2,30	5,66	3,96
	3,86	0,00	3,82	4,20	0,00	6,42	2,60
	3,34	2,78	5,43	3,97	0,00	5,15	3,20
	4,43	3,34	3,96	3,81	0,00	4,42	4,16
	5,26	0,00	4,16	4,16	0,00	4,95	2,90
	5,68	0,00	3,73	4,26	0,00	6,46	4,57
	4,78	3,08	2,78	2,90	0,00	5,26	3,51
Média (DP)	4,78 (±0,72)	2,00 (±1,79)	3,76 (±0,78)	3,84 (±0,49)	0,87 (±1,44)	5,29 (±0,79)	3,82 (±0,83)
Escovação Experimental	4,68	3,15	3,26	4,58	0,00	6,46	4,06
	5,35	0,00	3,08	3,89	0,00	7,78	3,45
	4,05	0,00	3,79	5,20	3,20	7,78	3,00
	5,52	0,00	4,46	3,56	4,26	6,62	3,73
	4,61	0,00	4,36	3,70	0,00	6,51	3,82

	4,56	2,60	3,56	4,04	2,30	7,78	4,35
	5,39	3,30	4,03	3,51	2,30	7,78	2,60
	5,01	2,78	3,91	3,70	0,00	7,78	4,30
	4,98	3,48	4,82	3,87	3,51	6,35	3,94
	5,77	0,00	4,51	3,56	0,00	7,78	3,38
Média	4,99	1,53	3,98	3,96	1,56	7,26	3,66
(DP)	(±0,53)	(±1,63)	(±0,57)	(±0,54)	(±1,73)	(±0,67)	(±0,56)
	3,48	1,60	3,08	3,38	1,90	4,66	2,58
	3,15	0,00	3,11	2,56	2,20	5,04	2,08
	3,04	2,20	3,30	3,14	0,00	4,41	3,56
	4,26	0,00	3,45	2,45	2,62	4,05	3,42
Escovação Dentu	3,13	1,60	3,26	3,49	0,00	4,55	4,23
Creme	2,90	2,26	3,18	2,93	1,30	4,71	2,30
	4,46	2,78	3,51	2,82	0,00	5,01	1,78
	3,41	0,00	3,46	2,62	2,62	4,97	3,39
	4,14	0,00	3,28	2,89	0,00	3,02	2,00
	3,13	0,00	2,72	3,15	1,90	5,24	3,08
Média	3,51	1,04	3,23	2,94	1,25	4,57	2,84
(DP)	(±0,57)	(±1,15)	(±0,23)	(±0,35)	(±1,14)	(±0,65)	(±0,81)
	4,21	1,90	3,51	3,34	1,30	6,78	2,95
	4,59	0,00	4,38	3,50	0,00	4,66	2,41
	3,95	1,30	1,60	2,94	1,90	6,78	3,42
	5,23	1,78	3,03	3,31	1,90	5,24	3,26
Escovação Trihydrall	4,70	1,30	3,08	3,93	1,30	3,94	3,21
	2,79	1,30	3,60	2,86	2,97	4,30	3,01
	3,48	1,30	2,85	2,20	0,00	4,56	3,60
	3,61	1,60	3,11	4,03	2,20	3,45	3,93
	3,08	2,45	3,47	4,09	2,15	6,78	2,51
	2,66	1,78	3,15	3,31	1,30	6,78	3,02
Média	3,83	1,47	3,18	3,35	1,50	5,33	3,13
(DP)	(±0,86)	(±0,64)	(±0,70)	(±0,59)	(±0,94)	(±1,33)	(±0,46)

Tabela A6 - Média (DP) dos pesos (seco, úmido estável - PU e após escovação - PE), em g e da diferença de peso dos espécimes antes e após escovação com os dentifrícios comerciais e o dentifrício experimental a 10%.

	Peso seco	PU	PE	PE-PU
Água	9,4903	9,5826	9,5827	-0,0001
	9,2264	9,3185	9,3183	0,0002
	9,8978	9,9951	9,9951	0
	9,2725	9,3624	9,3635	-0,0011
	9,4126	9,5068	9,5045	0,0023
	9,2178	9,3085	9,3082	0,0003
Média	9,4196	9,5123	9,5121	0,0003
(DP)	($\pm 0,2582$)	($\pm 0,2606$)	($\pm 0,2606$)	($\pm 0,0011$)
Experimental	9,7028	9,8037	9,7614	0,0423
	8,9502	9,0425	9,0025	0,04
	9,3151	9,4106	9,3638	0,0468
	8,8463	8,9353	8,8962	0,0391
	9,1014	9,1983	9,152	0,0463
	8,8427	8,9328	8,8893	0,0435
Média	9,1264	9,2205	9,1775	0,0430
(DP)	($\pm 0,3342$)	($\pm 0,3384$)	($\pm 0,3374$)	($\pm 0,0032$)
Dentu Creme	8,7278	8,8145	8,7723	0,0422
	9,4798	9,571	9,5285	0,0425
	8,949	9,037	8,9979	0,0391
	9,733	9,8295	9,7863	0,0432
	8,7256	8,8135	8,7705	0,043
	9,0725	9,1602	9,1156	0,0446
Média	9,1146	9,2043	9,1619	0,0424
(DP)	($\pm 0,4113$)	($\pm 0,4147$)	($\pm 0,4143$)	($\pm 0,0018$)
Trihydrall	9,4248	9,5186	9,4792	0,0394
	9,4175	9,5107	9,4671	0,0436
	9,342	9,4334	9,3934	0,04
	9,2455	9,337	9,2954	0,0416
	8,6388	8,7274	8,6905	0,0369
	9,5978	9,7001	9,6596	0,0405
Média	9,2777	9,3712	9,3309	0,0403
(DP)	($\pm 0,3338$)	($\pm 0,3373$)	($\pm 0,3358$)	($\pm 0,0022$)
Colgate	9,1203	9,2073	9,1526	0,0547
	8,9867	9,076	9,0185	0,0575
	9,3621	9,4595	9,4083	0,0512
	9,8754	9,9765	9,9358	0,0407
	9,2156	9,3094	9,2514	0,058
	8,8036	8,8947	8,838	0,0567
Média	9,227	9,321	9,2674	0,0531
(DP)	($\pm 0,371$)	($\pm 0,375$)	($\pm 0,3812$)	($\pm 0,0066$)

Tabela A7 - Média (DP) da rugosidade superficial (Ra) obtidos antes da escovação (RI), após a escovação dos espécimes (RF) com água e com os dentífrícios comerciais e o experimental a 10%, bem como a diferença entre as médias (RF – RI).

	RI	RF	RF - RI
Água	0,013	0,01	-0,003
	0,017	0,01	-0,007
	0,01	0,017	0,007
	0,017	0,023	0,007
	0,023	0,02	-0,003
	0,017	0,013	-0,003
Média	0,016	0,016	0,000
(DP)	(±0,004)	(±0,005)	(±0,006)
Colgate	0,017	11,49	11,473
	0,013	15,34	15,327
	0,013	17,72	17,707
	0,017	17,01	16,993
	0,013	21,567	21,553
	0,023	16,407	16,383
Média	0,016	16,589	16,573
(DP)	(±0,004)	(±3,281)	(±3,282)
Experimental	0,01	19,247	19,237
	0,013	16,147	16,133
	0,013	19,563	19,55
	0,013	13,55	13,537
	0,013	16,82	16,807
	0,017	18,703	18,687
Média	0,013	17,338	17,325
(DP)	(±0,002)	(±2,302)	(±2,302)
Dentu Creme	0,013	6,593	6,58
	0,03	10,15	10,12
	0,013	10,237	10,223
	0,013	10,74	10,727
	0,017	9,707	9,69
	0,037	11,343	11,307
Média	0,021	9,795	9,775
(DP)	(±0,010)	(±1,666)	(±1,661)
Trihydrall	0,013	11,71	11,697
	0,027	7,093	7,067
	0,017	9,197	9,18
	0,017	9,963	9,947
	0,017	2,299	2,282
	0,017	2,38	2,363
Média	0,018	7,107	7,089
(DP)	(±0,005)	(±3,979)	(±3,980)

Figura A1 - Teste poço-difusão em Agar com *C. albicans* (C.a). Observa-se (seta) uma diminuição na concentração de colônias de C.a ao redor do poço contendo o dentifrício experimental.

Figura A2 - Teste poço-difusão em Agar com *C. glabrata* (C.g). Observa-se (setas) uma diminuição na concentração de colônias de C.a ao redor do poço contendo o dentifrício experimental.

Figura A3 – Teste microbiológico de formação de biofilme do microrganismo *S. mutans* (S.m). **3.1** – Grupo Controle negativo; **3.2** – Grupo Controle positivo; **3.3** – Grupo Água; **3.4** – Grupo Colgate; **3.5** – Grupo Experimental; **3.6** – Grupo Dentu Creme e **3.7** – Grupo Trihydrall.

Figura A4 – Teste microbiológico de formação de biofilme do microrganismo *C. glabrata* (C.g). **4.1** – Grupo Controle negativo; **4.2** – Grupo Controle positivo; **4.3** – Grupo Água; **4.4** – Grupo Colgate; **4.5** – Grupo Experimental; **4.6** – Grupo Dentu Creme e **4.7** – Grupo Trihydrall.

Figura A5 – Teste microbiológico de formação de biofilme do microrganismo *E. faecalis* (E.f). **5.1** – Grupo Controle negativo; **5.2** – Grupo Controle positivo; **5.3** – Grupo Água; **5.4** – Grupo Colgate; **5.5** – Grupo Experimental; **5.6** – Grupo Dentu Creme e **5.7** – Grupo Trihydrall.