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

VANESSA MARIA FAGUNDES LEITE

**ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DENTIFRÍCIOS EXPERIMENTAIS À BASE
DE *Ricinus communis* (ÉSTER DO ÁCIDO RICINOLÉICO), TRICLOSAN E
CLORAMINA-T PARA HIGIENE DE PRÓTESES TOTAIS.**

RIBEIRÃO PRETO

2015

VANESSA MARIA FAGUNDES LEITE

**ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DENTIFRÍCIOS EXPERIMENTAIS À BASE
DE *Ricinus communis* (ÉSTER DO ÁCIDO RICINOLÉICO), TRICLOSAN E
CLORAMINA-T PARA HIGIENE DE PRÓTESES TOTAIS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor, 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

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
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

Estudo *in vitro* e *in vivo* de dentifrícios experimentais à base de *Ricinus communis* (éster do ácido ricinoléico), Triclosan e Cloramina-T para higiene de próteses totais. Ribeirão Preto, 2015.

158p. : il. ; 30cm

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

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa

Orientadora: Silva-Lovato, Cláudia Helena

1. Higiene bucal.
2. Prótese total.
3. Dentifrício.
4. Biofilme.
5. Agentes antimicrobianos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

VANESSA MARIA FAGUNDES LEITE

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

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Data da defesa: ____/____/2015.

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**, força que sustenta minha alma, fonte de energia que me encoraja a cada dia seguir em frente, por me presentear com minha família, meus amigos e colegas, por permitir que eu chegasse até aqui!

Aos meus pais **Vitor** e **Elisa** meus amores, exemplo de vida, de força, de amor, de humildade e de amizade, por todo incentivo, confiança, dedicação e suporte. Vocês sempre acreditaram em mim e nunca mediram esforços para me apoiar, vibraram comigo em cada sucesso alcançado e me abraçaram e me levantaram a cada caída ou tropeço da vida. A vocês mamãe e papai, todo meu amor, admiração, respeito e eterna gratidão. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos **Vitor** e **Vinícius**, por todo amor, carinho, incentivo e apoio. Vocês sempre estiveram comigo. Amo vocês!

Ao meu esposo **Flávio**, por todo amor, carinho e paciência, por compreender os momentos difíceis e a necessidade da distância. Te amo muito!

Às minhas cunhadas **Mayra** e **Ellen** pelas palavras de carinho, incentivo e por fazerem parte de mais essa etapa em minha vida. Amo vocês meninas!

Agradecimento Especial

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Helena Lovato da Silva, mestre e pessoa exemplar, com quem tive a oportunidade de conviver, aprender e me inspirar. Agradeço toda dedicação e confiança depositada em mim, agradeço o carinho e amizade. A Sra sempre será minha referência, esteve comigo durante toda minha vida acadêmica. A você, minha querida orientadora, todo meu respeito, admiração e gratidão.

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 doutorado.

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** e **Prof.^a Dr.^a Rossana Pereira de Almeida Antunes**, por proporcionar um Programa de qualidade a esta Unidade e pela competência na busca por melhorias.

À **CAPES** (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e **CNPq** (Conselho Nacional de Pesquisa), pelas bolsas concedidas durante o meu Doutorado.

Aos **Funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, pela paciência e dedicação em nos orientar.

Aos **Funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, pelos anos de convivência e todo auxílio e apoio prestados durante minha permanência na FORP.

Às Secretárias **Ana Paula Xavier**, **Regiane de C. Tirado Damasceno** e **Fernanda Talita de Freitas**, pela convivência prazerosa, carinho, apoio e paciência nos momentos de correria e atrasos.

Ao Funcionário **Luíz Sérgio Soares**, pelo incentivo, carinho e apoio.

Ao Funcionário **Hermano Teixeira Machado**, pelos excelentes serviços de fotografia prestados.

Aos Técnicos do Laboratório de Apoio Clínico, pelo apoio e ajuda em momentos de grande necessidade.

Aos Técnicos do Laboratório de Apoio Clínico – Prótese Parcial Removível – Prótese Parcial Fixa, pelo apoio e auxílio nos momentos de dificuldade.

Aos Técnicos, Edson Volta, Ana Paula Macedo, Viviane de Cássia Oliveira e Ricardo S. Antunes, por toda colaboração na realização da parte prática deste trabalho, vocês foram fundamentais.

À Viviane de Cássia Oliveira, por todo ensinamento, companheirismo, apoio, incentivo e principalmente paciência nos momentos de desespero.

À Cláudia Macedo, por todo conhecimento essencial à finalização deste trabalho, pelo apoio, paciência e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Cássio do Nascimento por todo apoio, incentivo e pelos conhecimentos compartilhados que foram importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao Técnico Emerson de Souza Santos pelo conhecimento compartilhado e essencial para a conclusão do trabalho.

Aos Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pela boa convivência e colaboração durante o minha pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Heitor Panzeri (em memória) por todo conhecimento compartilhado que foi essencial para a realização deste trabalho, pelo incentivo e dedicação.

Ao Prof. Dr. Evandro Watanabe e a Prof.^a Dr.^a Renata Fonseca Vianna Lopez, pelo apoio, dedicação e ensinamentos importantes para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice pelos ensinamentos transmitidos e por ceder gentilmente o gel do ácido ricinoléico, para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Moacir Marin por ceder gentilmente o Laboratório de Genética e, colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior por ceder gentilmente o Laboratório de Imunogenética Molecular.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa por ceder gentilmente o Laboratório de Biologia Molecular para a realização de parte de este trabalho.

À Fabíola Singaretti de Oliveira e Milla Sprone Tavares, pelo apoio, incentivo e conhecimentos transmitidos.

À Prof.^a Dr.^a Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza por nos ceder gentilmente equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

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

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

Ao Prof. Dr. Valdir Muglia e a Prof.^a Dr.^a Camila Tirapelli pela participação na banca de qualificação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu Grupo de Pesquisa, **Juliana, Maurício, Viviane, Marina, Prof.^a Dr.^a Cláudia, Prof.^a Dr.^a Helena, Prof. Dr. Raphael e Prof. Dr. Evandro** por todo auxílio prestado, pois sem vocês jamais teria conseguido, por todo incentivo e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Reabilitação Oral, **Viviane, Maria Paula, Tatiana, Adriana, Juliana, Luciano, Marcela, Marina, Danilo, Maurício, Flávia, Cláudia, Luciana, Daniela, Carolina, Natália, Juliane, Tabata e Raniel**, pela troca de conhecimentos, troca de angústias e alegrias, pelos momentos compartilhados durante os trabalhos laboratoriais e os momentos de distração.

Às companheiras, **Juliana, Marcelinha, Flávia, Dani e Natália** pelos momentos de aprendizagem, carinho e apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas do mestrado ao doutorado, **Tatiana, Maria Paula, Juliana, Nathália, Isabela, Lourenço, Danilo, Carla, Marcelo**, pelos momentos de correria, desespero, mas também de muita alegria.

A todos os colegas da pós-graduação do Programa de Reabilitação Oral pela companhia nesta jornada.

Aos alunos de Iniciação Científica, **Juliane 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.

Aos **participantes voluntários** da pesquisa, pela compreensão, colaboração, carinho e dedicação.

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, por todo carinho, apoio, incentivo e muito aprendizado.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por acreditarem em mim, por fazerem parte da minha vida, pelo apoio, incentivo e carinho.

Aos meus avós, Heloisa, Manuel, Expedita e José (em memória), por todo amor, compreensão, apoio, carinho, incentivo e paciência.

À minha segunda família, Chiquinho, Lucienne, Guga, Claudinha, Pedrinho, Clarinha, Iquinho, Fabiana, Dudinha, Gabriel, Miltinho e Rejane, pelo apoio, incentivo e carinho.

Às flores do meu jardim Glauce, Paula Dariana, Paula Pastana, Mariellen, Thaís, Marília, Luciana, Maria Beatriz e Tati por todo apoio, incentivo, carinho, força e momentos compartilhados.

Às companheiras de república, Cíntia, Mary Elly, Lídia, Tainã, Marcela, Camila, Maressa, Stefany, Tatiana, Mayra, Glauce, Cláudia e Angélica pela convivência, apoio, incentivo, paciência, compreensão e por compartilharem momentos inesquecíveis.

Aos meus outros amigos, Cristiane, Ingrid, Marina, Gabriela, Juliana, Cinthia, Mary Elly, Michelli, Maressa, Mayra, Ellen, Maristela, Marcelo, Lenin, Meiryane, Miliane, Jaqueline e Fabiana pelo incentivo, carinho, amizade, compreensão, apoio, por compartilharem comigo os momentos de alegria, mas também os de tristeza.

Resumo

LEITE, VMF. **Estudo *in vitro* e *in vivo* de dentifrícios experimentais à base de *Ricinus communis* (éster do ácido ricinoléico), Triclosan e Cloramina-T para higiene de próteses totais.** Ribeirão Preto, 2015. 158p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Foram avaliados dentifrícios experimentais à base de Triclosan (D1), *Ricinus communis* (D3) e Cloramina-T (D4) para higiene de próteses totais, tendo como controle dentifrício sem agente antimicrobiano (D2) e água. Para análise *in vitro* foram realizados ensaios físico-químicos (medida da densidade, pH, consistência e características reológicas); ensaio de rugosidade de superfície (Ra), realizado em 30 espécimes de resina acrílica antes e após a escovação artificial (250 min) e análise microbiológica (UFC) com a formação de biofilme multiespécies (*S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*) sobre espécimes em resina acrílica. Estes, após contaminação, foram escovados por 60s com D1, D2, D3, D4 e água (n=10). Foram empregados controles positivo (contaminado e não escovado) e negativo (sem contaminação). Para análise *in vivo*, seguiu-se o modelo “crossover” com “washout” de 7 dias. Os voluntários escovaram suas próteses superiores 3 vezes ao dia por 07 dias. A capacidade de remoção do biofilme foi avaliada empregando evidencição, fotografia e quantificação com software Image Tool 3.0 e, expressa em porcentagem. Na avaliação antimicrobiana (UFC), o biofilme foi desprendido da prótese por escovação com PBS e a suspensão resultante, semeada em meios de cultura específicos para *Candida spp*, *S. mutans*, *S. aureus* e bactérias Gram-negativas. As espécies de *Candida* foram identificadas pelo meio de cultura Chromagar e pela PCR (Polymerase Chain Reaction). Na avaliação dos dentifrícios pelos participantes foi aplicado questionário de satisfação. Os resultados das características organolépticas e físico-químicas foram informados em tabelas autoexplicativas. Os dados de rugosidade foram analisados por ANOVA e os dados da ação antimicrobiana *in vitro*, pelo teste de Kruskal-Wallis. Para os dados das variáveis clínicas (*in vivo*), empregou-se teste de Friedman e o teste de Cochran. Os testes estatísticos foram realizados com $p < 0,05$. Os dentifrícios não apresentaram diferença quanto à rugosidade de superfície (D2=0,264±0,098; D3=0,236±0,236; D1=0,265±0,116; D4=0,203±0,105), porém promoveram aumento da rugosidade comparado à água (0,027±0,004). Frente às espécies de *Candida*, *in vitro*, o D1 foi o mais eficaz ($p=0,00$; m (mediana)=1,30) seguido do D4 ($m=2,6$), D2 ($m=3,26$) e D3 ($m=3,59$). Para o *S. mutans* houve diferença entre a água ($m=3,86$) e os dentifrícios ($p=0,001$), porém não entre estes (D2: $m=0$; D3: $m=2,3$ e D4: $m=0$). D1 inibiu o crescimento de *S. mutans*. Quanto à capacidade de remoção do biofilme, não houve diferença entre os dentifrícios ($p=0,055$; D2: $m=7,39$; D3: $m=7,94$; D1: $m=10,16$; D4: $m=8,14$), porém houve redução do biofilme comparando ao “Baseline” ($m=16,53$). Os dentifrícios não apresentaram diferença antimicrobiana, *in vivo*, contra *Candida spp*. ($p=0,495$), *S. mutans* ($p=0,497$), *S. aureus* ($p=0,845$) e bactérias Gram-negativas ($p=0,425$). Na identificação das espécies de *Candida* pelo Chromagar não houve diferença quanto ao seu aparecimento independente do dentifrício ($p=0,466$). O resultado pela PCR foi semelhante à identificação convencional e as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram mais prevalentes, respectivamente. Na avaliação dos dentifrícios pelos participantes não houve diferença ($p > 0,05$) entre eles para nenhuma questão. Os dentifrícios apresentaram resultados satisfatórios, apresentando potencial para uso clínico e controle do biofilme de próteses totais.

Palavras-chave: Higiene bucal, Prótese total, Dentifrício, Biofilme, Agentes antimicrobianos.

Abstract

LEITE, VMF. *In vitro* and *in vivo* study of experimental dentifrices based *Ricinus communis* (ester ricinoleic acid), Triclosan and Chloramine-T for hygiene of dentures. Ribeirão Preto, 2015. 158p. Thesis (Doctoral in Oral Rehabilitation). Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo.

ABSTRACT

This study evaluated experimental dentifrices based on Triclosan (D1), *Ricinus communis* (D3), and Cloramina-T (D4) for complete denture cleaning, and as control a dentifrice without antimicrobial agent (D2) and water. To *in vitro* analysis were performed physicochemical tests (measurement of density, pH, consistency and rheological characteristics); surface roughness test (Ra) performed in 30 acrylic resin specimens before and after artificial brushing (250 minutes) and microbiological analysis (CFU) with multi-species biofilm formation (*Streptococcus mutans*, *C. albicans* and *C. glabrata*) on the specimens of acrylic resin. This specimens were manually brushed for 60 seconds with D1, D2, D3, D4 and water (n = 10). Positive controls were used (contaminated and not brushed) and negative (no contamination). To *in vivo* analysis the study followed the crossover model with washout of 7 days. The volunteers brushed their upper dentures 3 times daily for 07 days. The removal of biofilm capacity was evaluated employing evidenciation, photography and quantification with Image Tool 3.0 software and expressed in percentage. For the evaluation of antimicrobial activity (CFU), the biofilm was removed from the denture by brushing with PBS and the suspension was seeded in culture media specific for *Candida spp*, *S. mutans*, *S. aureus* and Gram-negative bacteria. The *Candida* species were identified by culture medium Chromagar and PCR method (Polymerase Chain Reaction). One satisfaction questionnaire was used for the dentifrices evaluation by the participants. The results of physicochemical characteristics were informed in self-explanatory tables. The roughness data were analyzed by ANOVA and antimicrobial activity *in vitro* data by the Kruskal-Wallis test. To the data of the clinical variables (*in vivo*) was used Friedman test and Cochran test. Statistical tests were performed with $p < 0.05$. The dentifrices showed no difference in the abrasiveness (D2=0.264 $\pm$ 0.098, D3=0.236 $\pm$ 0.236, D1=0.265 $\pm$ 0.116, D4=0.203 $\pm$ 0.105), but promoted increased roughness when compared to water (0.027 $\pm$ 0.004). To *Candida* species, *in vitro*, the D1 was the most effective ($p=0.00$, m (median)=1.30) followed by D4 ($m=2.6$), D2 ($m=3.26$) and D3 ($m=3.59$). To *S. mutans* there was difference between the water ($m=3.86$) and dentifrices ($p=0.001$), but these did not showed difference from each other (D2: $m=0$; D3: $m=2.3$ and D4: $m=0$). D1 inhibited the growth of *S. mutans*. There was no difference among the dentifrices for biofilm removal ($p=0.055$; D2: $m=7.39$; D3: $m=7.94$; D1: $m=10.16$; D4: $m=8.14$), but the biofilm decreased when compared to Baseline ($m=16.53$). The dentifrices showed no difference antimicrobial, *in vivo*, against *Candida spp*. ($p=0.495$), *S. mutans* ($p=0.497$), *S. aureus* ($p=0.845$) and Gram-negative bacteria ($p=0.425$). In the identification of *Candida* species by Chromagar there was no difference in the appearance of their independent dentifrices ($p=0.466$). The result by PCR was similar conventional identification, and the species of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* were more prevalent, respectively. In the evaluation of dentifrices by the participants there was no difference ($p > 0.05$) among them to any question. The dentifrices showed satisfactory results with potential for its specificity.

Key words: Oral hygiene, Dentures, Dentifrices, Biofilm, Anti-infective agents.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Inserção do gel na misturadora a vácuo.....	62
Figura 2 -	Dentifrício sendo manipulado na misturadora a vácuo.....	62
Figura 3 -	Envase dos dentifrícios.....	62
Figura 4 -	Seringa preparada para o ensaio de densidade.....	64
Figura 5 -	Leitura do pH por meio de peagâmetro.....	64
Figura 6 -	Ensaio de consistência: A e B - Peso de 300 g sobre o conjunto placas de vidro e dentifrício; C – Mensuração do diâmetro do dentifrício com régua milimetrada.....	65
Figura 7 -	Ensaio de reologia por meio do Reômetro. A: parte do equipamento onde o material é depositado (seta) e sofre cisalhamento; B: parte do equipamento onde são realizadas as leituras.....	66
Figura 8 -	Rugosímetro, corpo de prova e mesa posicionadora.....	66
Figura 9 -	Espécime de resina acrílica pré-fabricada em Plex Glass.....	67
Figura 10 -	Máquina de escovação artificial.....	68
Figura 11 -	Escova após remoção do cabo.....	68
Figura 12 -	Matrizes metálicas.....	69
Figura 13 -	Muflas preparadas. A- matrizes no molde de silicone; B – molde em silicone sem as matrizes.....	69
Figura 14 -	Preparo dos espécimes. A – Manipulação da resina acrílica para base de dentadura; B - Inserção da resina nos molde de silicone.....	70
Figura 15 -	Muflas posicionadas em prensa hidráulica.....	70
Figura 16 -	Espécimes após remoção do excesso de resina.....	70
Figura 17 -	Espécimes na placa de Petri para serem esterilizados.....	71
Figura 18 -	Micro-ondas para esterilização dos espécimes.....	71
Figura 19 -	Distribuição dos espécimes estéreis na placa de cultura celular.....	73
Figura 20 -	Inserção de meio de cultura inoculado nos poços.....	73
Figura 21 -	Incubação das placas de cultura celular em microaerofilia.....	73
Figura 22 -	Lavagem dos espécimes e poços com PBS.....	73
Figura 23 -	Escovação do espécime contaminado com escova e dentifrício.....	74
Figura 24 -	Dentifrícios dispensados em bisnagas brancas esmaltadas e identificados por números.....	76
Figura 25 -	Sabonete líquido dispensado em recipiente adequado para dosagem do participante...	76
Figura 26 -	Representação da aplicação do Índice Aditivo.....	78
Figura 27 -	Lavagem da prótese com água corrente por 5 segundos.....	79
Figura 28-	Evidenciação do biofilme. A- Prótese evidenciada com auxílio de cotonete; B- Remoção do excesso de evidenciador com água corrente.....	79
Figura 29 -	Registro do biofilme evidenciado da superfície interna da prótese.....	79
Figura 30 -	Eliminação do biofilme.....	79
Figura 31 -	Escova Denture e um dos dentifrícios experimentais que compuseram o Kit.....	81

Figura 32 -	Instruções de higienização das próteses. A- Deposição do dentífrico sobre as cerdas da escova; B- Conjunto de menor número de cerdas utilizado para escovar a região interna da prótese referente ao rebordo alveolar; C e D- Conjunto de maior número de cerdas para escovar demais regiões da superfície interna e toda a superfície externa da prótese.....	81
Figura 33 -	Calibração da unidade “cm” com auxílio da régua milimetrada.....	83
Figura 34 -	Início da delimitação do contorno da área total da superfície interna (seta).....	83
Figura 35 -	Término da delimitação do contorno da área total.....	83
Figura 36 -	Delimitação da área de biofilme (área corada) indicada pela seta.....	83
Figura 37 -	Coleta do biofilme da superfície interna das próteses com auxílio de escova e pinça estéreis.....	84
Figura 38 -	Curva obtida do ensaio de reologia do dentífrico Branco.....	94
Figura 39 -	Curva obtida do ensaio de reologia do dentífrico de <i>R. communis</i>	95
Figura 40 -	Curva obtida do ensaio de reologia do dentífrico de Triclosan.....	95
Figura 41 -	Curva obtida do ensaio de reologia do dentífrico de Cloramina-T.....	96
Figura 42 -	Comparação entre os grupos para as espécies de <i>Candida</i>	98
Figura 43 -	Comparação entre os dos grupos para <i>S. mutans</i>	99
Figura 44 -	Fluxograma da evolução da amostra clínica.....	100
Figura 45 -	Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme no “Baseline”.....	102
Figura 46 -	Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentífrico Branco.....	102
Figura 47 -	Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentífrico <i>R. communis</i>	103
Figura 48 -	Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentífrico Triclosan.....	103
Figura 49 -	Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentífrico Cloramina-T.....	104
Figura 50 -	Comparação da porcentagem de biofilme após o uso dos dentífricos experimentais. D1- Dentífrico de Triclosan; D2- Dentífrico Branco; D3- Dentífrico de <i>R. communis</i> e D4- Dentífrico de Cloramina-T.....	105
Figura 51 -	Comparação dos dentífricos frente à espécie <i>Candida</i> . D1- Dentífrico de Triclosan; D2- Dentífrico Branco; D3- Dentífrico de <i>R. communis</i> e D4- Dentífrico de Cloramina-T.....	112
Figura 52 -	Comparação dos dentífricos frente ao <i>S. mutans</i> . D1- Dentífrico de Triclosan; D2- Dentífrico Branco; D3- Dentífrico de <i>R. communis</i> e D4- Dentífrico de Cloramina-T.....	112
Figura 53 -	Comparação dos dentífricos frente ao <i>Staphylococcus aureus</i> . D1- Dentífrico de Triclosan; D2- Dentífrico Branco; D3- Dentífrico de <i>R. communis</i> e D4- Dentífrico de Cloramina-T.....	113

Figura 54 -	Comparação dos dentifrícios frente às bactérias Gram-negativas. D1- Dentifrício de Triclosan; D2- Dentifrício Branco; D3- Dentifrício de <i>R. communis</i> e D4- Dentifrício de Cloramina-T.....	113
Figura 55 -	Comparação dos dentifrícios frente à espécie <i>C. albicans</i> . D1- Triclosan; D2- Branco; D3- <i>R. communis</i> ; e D4- Cloramina-T.....	115
Figura 56 -	Comparação dos dentifrícios frente à espécie <i>C. tropicallis</i> . D1- Triclosan; D2- Branco; D3- <i>R. communis</i> ; e D4- Cloramina-T.....	116
Figura 57 -	Comparação dos dentifrícios frente à espécie <i>C. glabrata</i> . D1- Triclosan; D2- Branco; D3- <i>R. communis</i> ; e D4- Cloramina-T.....	116
Figura 58 -	Comparação dos dentifrícios frente a outras espécies de <i>Candida</i> . D1- Triclosan; D2- Branco; D3- <i>R. communis</i> ; e D4- Cloramina-T.....	117

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Agentes antimicrobianos para formulação dos dentifrícios.....	61
Tabela 2-	Composição básica dos dentifrícios.....	61
Tabela 3-	Meios de cultura.....	71
Tabela 4-	Tabela de aleatorização.....	76
Tabela 5-	Características organolépticas dos dentifrícios experimentais.....	93
Tabela 6-	Valores de densidade, pH e consistência dos dentifrícios experimentais.....	93
Tabela 7-	Comportamento reológico dos dentifrícios experimentais (viscosidade e área de histerese).....	96
Tabela 8-	Comparação das médias e DP dos grupos antes (Rugosidade Inicial) e após (Rugosidade Final) a escovação.....	97
Tabela 9 -	Comparação das medianas e IC dos grupos contra as espécies de <i>Candida</i> e valor de <i>p</i>	97
Tabela 10 -	Comparação das medianas e IC dos grupos contra as espécies <i>S. mutans</i> e valor de <i>p</i>	98
Tabela 11-	Dados sociais dos participantes da pesquisa.....	100
Tabela 12 -	Porcentagem de biofilme sobre a superfície interna das próteses superiores, no “Baseline” e após o uso dos dentifrícios.....	101
Tabela 13 -	Estatística descritiva da porcentagem de biofilme sobre a superfície interna das próteses totais superiores no “Baseline” e após a utilização dos dentifrícios.....	104
Tabela 14-	Contagem das UFC (Log ₁₀) de <i>Candida spp</i>	106
Tabela 15 -	Contagem das UFC (Log ₁₀) de <i>S. mutans</i>	107
Tabela 16 -	Contagem das UFC (Log ₁₀) do <i>S. aureus</i>	108
Tabela 17-	Contagem das UFC (Log ₁₀) das bactérias Gram-negativas.....	109
Tabela 18-	Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente às espécies de <i>Candida</i>	110
Tabela 19-	Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente ao <i>S. mutans</i>	110
Tabela 20-	Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente ao <i>Staphylococcus aureus</i>	111
Tabela 21-	Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente às bactérias Gram-negativas.....	111
Tabela 22 -	Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de <i>C. albicans</i> após a utilização dos dentifrícios.....	114
Tabela 23 -	Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de <i>C. tropicalis</i> após a utilização dos dentifrícios.....	114
Tabela 24 -	Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de <i>C. glabrata</i> após a utilização dos dentifrícios.....	114
Tabela 25 -	Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de outras espécies de <i>Candida</i> após a utilização dos dentifrícios.....	115
Tabela 26-	Comparação dos métodos de identificação das espécies de <i>Candida</i>	117

Tabela 27-	Resultado do questionário de satisfação do paciente e valor de p para cada questão.....	118
-------------------	---	------------

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	45
2. PROPOSIÇÃO	55
3. MATERIAL E MÉTODO	59
3.1 Manipulações dos dentifrícios	61
3.2 Análises <i>in vitro</i>	62
3.2.1 Controle de qualidade por meio das características organolépticas	62
3.2.2 Ensaio físico-químico	63
3.2.3 Avaliação da rugosidade de superfície	66
3.2.4 Avaliação microbiológica	68
3.3 Análises <i>in vivo</i>	75
3.3.1 Avaliação da capacidade de remoção do biofilme	82
3.3.2 Análise da ação antimicrobiana dos dentifrícios contra os microrganismos presentes no biofilme das próteses totais	84
3.3.3 Identificação das espécies de <i>Candida</i>	85
3.3.4 Análise dos dentifrícios pelos participantes	88
3.4 Análises dos Dados	89
4 RESULTADOS	91
4.1. Análises <i>in vitro</i>	93
4.1.1 Controle de qualidade por meio das características organolépticas	93
4.1.2 Ensaio físico-químico	94
4.1.3 Avaliação da rugosidade	96
4.1.4 Avaliação microbiológica	97
4.2. Análises <i>in vivo</i>	99
4.2.1 Avaliação da capacidade de remoção do biofilme	100
4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	105
4.2.3 Identificação das espécies de <i>Candida</i>	114
4.2.4 Avaliação dos dentifrícios pelos participantes da pesquisa	117
5 DISCUSSÃO	119
5.1 Análises <i>in vitro</i>	122
5.2 Análises <i>in vivo</i>	126
6 CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS	135
APÊNDICE	147

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida tem causado um crescimento da população idosa acima de 65 anos (Nasri, 2008) e segundo os dados obtidos do Ministério da Saúde (2011) no ano de 2010, 92,7% da população brasileira, na faixa etária de 65 a 74 anos, faziam uso de algum tipo de prótese dentária, sendo que 63,1% correspondiam à prótese total superior e 37,5% correspondiam à prótese total inferior. Este fato aumenta a preocupação por parte dos profissionais da área da saúde na busca por melhorias da condição e manutenção da saúde desta população.

A higiene bucal é essencial para a manutenção da saúde dos tecidos de assentamento de próteses totais. A realização inadequada da higiene leva ao acúmulo de biofilme, podendo este ser prejudicial tanto à saúde bucal quanto à saúde geral do indivíduo (Budtz-Jørgensen, 1979). A aspiração do biofilme bucal pode causar Pneumonia Aspirativa, (Raghavendran et al., 2007; DiBardino e Wunderink, 2014) doença que geralmente acomete indivíduos com o sistema imunológico comprometido (DiBardino e Wunderink, 2014), sendo a sua maior prevalência em idosos (Scannapieco e Shay, 2014). E ainda, segundo Azevedo e Cerca (2012) pode ocorrer uma dispersão do biofilme e consequentemente, uma colonização à distância, como por exemplo, Endocardite bacteriana. Quanto à saúde bucal, o biofilme é um fator etiológico de muitos processos patológicos bucais (Almeida et al., 2008) e, é considerado um fator importante da Candidíase Atrófica Crônica (Paranhos et al., 2009), caracterizada por alterações inflamatórias como eritema e edema (Budtz-Jørgensen, 1974), embora haja outros fatores causais, pois segundo Lemos et al. (2003), a Candidíase é multifatorial. Azevedo e Cerca (2012), relatam que a maioria das infecções orais é de origem fúngica, causadas por espécies do gênero *Candida*, cuja instalação pode ser favorecida pela presença de aparelhos protéticos (Lemos et al., 2003) que somado a inadequada higiene das próteses favorece o acúmulo de biofilme e potencializam a colonização por leveduras. Já há algum tempo que estudos relacionam a presença de leveduras (espécies de *Candida*) e uso de próteses totais, em mucosa inflamada e normal e relatam que a ocorrência de *Candida spp* é maior em usuários que apresentam inflamação na mucosa (Budtz-Jørgensen, 1974). Kulak-Ozkan et al. (2002) verificaram a existência de relação entre a Candidíase e a higienização precária, onde houve maior incidência da doença nos participantes que apresentaram higienização deficiente das próteses. Segundo Azevedo e Cerca (2012), a patogenicidade de espécies de *Candida* está relacionada com sua capacidade de adesão em superfícies abióticas.

A cavidade bucal pode ser considerada como um ecossistema polimicrobiano quanto à espécie e distribuição dos microrganismos. Todo o microrganismo possui capacidade de

adesão a superfícies, seja ela biótica ou abiótica. No entanto, o que realmente importa é a capacidade de adesão a outros microrganismos, uma vez que esta propriedade é responsável pela formação do biofilme (Azevedo e Cerca, 2012). Spolidorio et al. (2003), em sua revisão de literatura definem o biofilme como sendo uma comunidade estratégica de sobrevivência dos microrganismos, uma vez que essa população se adere a superfícies rígidas não descamativas quando na presença de umidade e, é envolvida por matriz orgânica de origem extracelular. Além disso, os autores relatam a diversidade de microrganismos encontrados no biofilme bucal, o qual pode ser constituído de bactérias, fungos, protozoários e até mesmo vírus. De acordo com Scannapieco (2013), a microflora de um indivíduo com boa higiene oral apresenta-se composta por cocos Gram-positivos e negativos e bacilos e, um indivíduo com má higiene oral apresenta uma microbiota mais diversificada e complexa, apresentando quantidade significativa de bactérias anaeróbicas Gram-negativas.

O biofilme pode ser dividido em dois processos de formação. O primeiro compreende a adsorção do microrganismo à película adquirida e o segundo compreende a coadesão dos microrganismos uns aos outros (Rosan e Lamont, 2000). A película adquirida se constitui em uma camada de lipomucoproteína e é fundamental para a formação do biofilme. Essa camada é formada pelo condicionamento da superfície, por meio de solução aquosa e adsorção de sais, proteínas e lipídeos da saliva (Rosan e Lamont, 2000; Azevedo e Cerca, 2012). De acordo com Azevedo e Cerca (2012), os microrganismos podem aderir à película por meio de ligações não específicas e reversíveis ou por meio de ligações específicas e irreversíveis. As ligações específicas ocorrem quando o microrganismo apresenta adesinas em sua superfície, as quais se ligam aos receptores da película, como os estreptococos. Após a adesão inicial de alguns microrganismos, ocorre adesão entre eles. Alguns microrganismos se aderem mais facilmente a uns que a outros e, assim, o biofilme se desenvolve. Com o aumento da biomassa, ocorre também, a síntese e degradação de polímeros, que promovem a organização estrutural do biofilme, cujas funções são proteger a comunidade contra agentes nocivos e promover a retenção de nutrientes. A formação do biofilme de dentadura ocorre de forma semelhante à formação do biofilme dental (Neill, 1968; Edgerton e Levine, 1992), sendo que a adesão dos componentes da saliva sobre a superfície da prótese depende das condições do tecido de suporte do aparelho protético, ou seja, a falta de retenção da prótese, presença de trauma na mucosa e, de proteases microbianas favorecem a adsorção de proteínas à resina acrílica das próteses (Edgerton e Levine, 1992). A capacidade de formar biofilme confere aos microrganismos a vantagem de manter sua população na cavidade bucal, uma vez que sem essa estrutura, os mesmos poderiam ser facilmente removidos por meio da mastigação,

deglutição e fluidos salivares (Azevedo e Cerca, 2012). Sendo assim, fica afirmada a fundamental importância da higiene bucal e a preocupação por parte dos profissionais desta área.

Estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o grau de instrução dos usuários de próteses, bem como a frequência de higienização das mesmas. Segundo de Castelluci Barbosa et al. (2008), considerando uma amostra de 150 indivíduos usuários de prótese total, nenhum dos participantes, conheciam ou sabiam da existência de escovas específicas para os aparelhos protéticos que usavam. Além disso, 64% dos participantes dormiam com as próteses, 62,7% higienizavam as próteses três vezes ou mais, diariamente e 76,8% faziam uso do aparelho há mais de cinco anos. Peracini et al. (2010a), também realizaram um estudo com 106 participantes e observaram que 51,89% deles não haviam recebido orientações para higiene de seus aparelhos protéticos, 58,49% dormiam com eles e 73,8% higienizavam seus aparelhos três vezes ou mais. Tanto de Castelluci Barbosa et al. (2008) e Peracini et al. (2010a) puderam concluir, segundo as limitações de seus estudos (amostra representar uma pequena parte da população), que os usuários apresentam conhecimento limitado quanto a higienização e manutenção da saúde dos tecidos bucais. Ercalik-Yalcin e Ozcan (2014) realizaram um estudo com 400 participantes usuários de próteses removíveis totais e parciais e, observaram que 64,5% dormiam com os aparelhos protéticos, 29,5% higienizavam as próteses três vezes ao dia e 41,3% faziam uso do aparelho há mais de cinco anos. Além disso, 23% dos participantes apresentaram uma higiene regular dos aparelhos, cujo parâmetro de classificação da higiene regular foi a presença de biofilme e/ou cálculos em 1/3 da prótese e, 35% dos participantes apresentaram higiene satisfatória (menos de 1/3 da prótese coberta por biofilme e/ou cálculo). Os autores relataram a necessidade de programas com objetivo de instruir o usuário de como fazer o bom uso de seus aparelhos protéticos.

Para a higienização e manutenção das próteses removíveis existem dois métodos: mecânico, por meio da escovação com dentífrico ou sabão neutro e por meio do ultrassom; químico constituído por agentes de imersão, como hipocloritos alcalinos, peróxidos alcalinos, desinfetantes, ácidos diluídos e enzimas (Budtz-Jorgensen, 1979; Council on Dental Materials, Instruments and Equipment, 1983; Jagger e Harrison 1995). O método de higiene mais difundido, simples, barato e eficaz na remoção do biofilme é o método mecânico de escovação (Dills et al., 1988; Jagger e Harrison, 1995; Panzeri et al., 2009), com a utilização de escovas dentais e o auxílio de dentífricos ou sabão neutro.

Estudos comprovam a difusão do método mecânico de escovação. De Castelluci Barbosa et al. (2008) relataram que 94% dos participantes de sua pesquisa fazem uso do

método de escovação, sendo 88,7% com dentífrico. Peracini et al. (2010a) relataram que 100% dos participantes faziam uso do método mecânico e 84,9% com dentífrico e ainda, Ercalik-Yalcinkaya e Ozcan (2014) declararam que 95,3% dos participantes faziam uso do método mecânico, sendo 85,8% com dentífrico ou sabão. Embora, na literatura (Andrucioli et al., 2004; Hutchins e Parker, 1973; Lee et al., 1985; Nikawa et al., 1999) haja a recomendação da associação do método mecânico e químico, Paranhos et al., (2009) relatam a eficácia similar entre a associação dos dois métodos e o método mecânico. Este último é caracterizado como um método efetivo (Budtz-Jorgensen, 1979; Dills et al., 1988) e importante na redução do biofilme (Pellizzaro et al., 2012). No entanto, a literatura traz a abrasividade como sendo uma desvantagem do uso do dentífrico, uma vez que um produto com alta abrasividade pode causar danos ao material do aparelho protético, ou seja, resina acrílica (Neill, 1968; Pellizzaro et al., 2012). Porém, Salles et al. (2007) e Paranhos et al. (2013) compararam, por meio de estudo clínico, a escovação com sabão neutro e dentífrico e relataram a maior eficácia da escovação com o dentífrico. Segundo Pellizzaro et al (2012) o recomendado é o uso de um dentífrico menos abrasivo e, isto vai ao encontro dos resultados de Salles et al. (2007) e Paranhos et al. (2013). Pois, se a escovação com dentífrico é mais eficaz que com o sabão neutro, a abrasividade apesar de deletéria à resina acrílica, auxilia na maior remoção do biofilme. Outra limitação do método mecânico de escovação relaciona-se a usuários de dentadura com algum tipo de deficiência ou diminuição da destreza manual (Budtz-Jorgensen, 1979; Dills et al., 1988). Sendo assim, a complementação com o método químico de higiene torna-se uma alternativa (Budtz-Jorgensen, 1979).

O método químico se caracteriza por sua capacidade de remoção de manchas e dissolução do biofilme (Budtz-Jorgensen, 1979; Council on Dental Materials, Instruments and Equipment, 1983; Dills et al., 1988). No entanto, se não forem utilizados conforme as recomendações dos fabricantes podem causar efeitos deletérios ao material da prótese como, alteração da dureza, rugosidade, cor e corrosão (Jagger e Harrison, 1995; Peracini et al., 2010b; Pisani et al., 2010b; Felipucci et al., 2011; Paranhos et al., 2014; Cakan et al., 2015). Em se tratando do Brasil, dentre os agentes químicos mais acessíveis à população, estão o hipoclorito de sódio, geralmente recomendado pelos cirurgiões dentistas devido ao baixo custo, e os peróxidos alcalinos. Porém, estes últimos são escassos no país e alguns devem ser importados e de alto custo, quando comparado ao hipoclorito de sódio. Embora o hipoclorito de sódio apresente como característica a capacidade de dissolver a matéria orgânica do biofilme, e apresentar elevada capacidade de remoção de manchas, apresenta a desvantagem de causar corrosão em metais e seu uso inadequado pode causar descoloração das próteses. Os

peróxidos alcalinos são compostos por detergentes, para a redução da tensão superficial, e de perborato de sódio, para a liberação de bolhas de oxigênio, promovendo certa ação mecânica na remoção do biofilme (Budtz-Jorgensen, 1979; Council on Dental Materials, Instruments and Equipment, 1983). Contudo, a efetividade dos higienizadores químicos pode ser aumentada com a aplicação do método mecânico de escovação (Council on Dental Materials, Instruments and Equipment, 1983; Paranhos et al., 2009; Pellizzaro et al., 2012).

A falta de materiais específicos e acessíveis para higiene de próteses totais no mercado brasileiro ainda é um fator que dificulta o controle da higiene dos aparelhos protéticos. Segundo Panzeri et al. (2009), novos dentifrícios para próteses totais devem ser desenvolvidos com o objetivo de remover o biofilme, promover a desinfecção da superfície sem causar danos ao aparelho protético tal como aumento da rugosidade da resina acrílica, que é um dos responsáveis pelo acúmulo de biofilme (Harrison et al., 2004). De acordo com Keng e Lim (1996) as irregularidades da superfície da resina acrílica somada à temperatura da boca (aproximadamente 37°C), tornam-se um meio ambiente favorável à formação de biofilme.

Estudos laboratoriais e clínicos (Panzeri et al., 2009; Andrade et al., 2012; Leite et al., 2014) têm sido realizados com o intuito de avaliar o emprego de dentifrícios com ação antimicrobiana no controle do biofilme de próteses totais.

Em que se pese à necessidade de dentifrícios eficazes para higiene de próteses totais que apresente qualidade e custo acessível, o desenvolvimento de dentifrícios contendo agentes antimicrobianos merece ser estudado. Segundo Jagger e Harrison (1995) os produtos para a higiene dos aparelhos protéticos devem ser de fácil manuseio, efetivo na remoção de manchas e de matéria orgânica e inorgânica, ser compatível ao material da prótese, não ser tóxico ao usuário, apresentar ação antimicrobiana, deixar o mínimo de gosto residual e ser de baixo custo, como forma de incentivo ao seu uso.

Na revista da literatura, em busca de produtos que pudessem ser usados como agentes antimicrobianos podem ser encontrados o éster do ácido ricinoléico, o Triclosan e a Cloramina-T.

Derivados de *Ricinus communis* tem sido estudados e empregados em diferentes campos profissionais como indústria (Bertoletti, 2008), biologia (Takano et al., 2007) e área da saúde (Meneghin et al., 2006; Valderramas et al., 2008; Leite et al., 2014; Segundo et al., 2014). Ito et al. (1999) avaliaram um detergente derivado de seu óleo e encontraram a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e leveduras, podendo ser usado como desinfetante e antisséptico. Apresenta efetividade contra fitopatógenos, microrganismos causadores de doença em plantas, (Takano et al., 2007) e, além disso, o poliuretano de *R.*

communis apresentou ação anti-inflamatória, por meio da inibição da enzima fosfolipase A (Valderramas et al., 2008). Outros estudos avaliaram a biocompatibilidade da poliuretana, obtendo resultados satisfatórios (Pascon et al., 2000; Mastrantonio e Ramalho, 2003). Na odontologia, têm sido avaliados na reconstrução óssea e reparo de defeitos ósseos (Meneghin et al., 2006), como um detergente para irrigação de canais radiculares (Leonardo et al., 2001; Teixeira et al., 2001; Ferreira et al., 2002), na remoção de debris dos canais radiculares após a instrumentação (Meneghin et al., 2006) e smear layer (Dametto et al., 2001), como solução higienizadora para próteses totais (Pisani et al., 2010a; Pisani et al., 2012; de Andrade et al., 2014; Segundo et al., 2014) e na formulação de dentifrício específico (Leite et al., 2014), apresentando resultados satisfatórios e promissores.

O Triclosan é um agente antimicrobiano, de amplo espectro (Ciancio e Panagakos, 2010), que pode ser utilizado com diferentes apresentações, inclusive como componente de antissépticos bucais e dentifrícios para higiene de dentes naturais (kjærhein et al., 1994; Haraszthy et al., 2010; Singh et al., 2010). No entanto, para prótese total este agente ainda não foi avaliado. Estudos avaliaram suas propriedades em formulações de dentifrícios, em que o Triclosan apresentou boa atividade na redução do biofilme e, deposição de cálculos, quando na composição de enxaguatório bucal (Shim et al., 2012; Kumar et al., 2013). De Rossi et al. (2014) avaliaram uma formulação de dentifrício de Triclosan, que apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e levedura. Além disso, estudos revelaram que o Triclosan apresenta ação anti-inflamatória, por meio da redução da biossíntese aumentada de prostaglandina (Modéer et al., 1996; Mustafa et al., 2005), característica que poderia contribuir para o controle ou remissão de Candidíase. Ainda, é um auxiliar no controle da halitose, inibindo a formação de compostos sulfurados voláteis e reduzindo as bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio (gás sulfídrico) (Pilch et al., 2005).

A Cloramina-T é um agente antimicrobiano de amplo espectro que age como um produto nanoparticulado com grande capacidade de penetração ao agir sobre paredes celulares e tecidos afetados. Tem sido utilizada como princípio ativo na composição de dentifrícios e antissépticos bucais. Pitten e Kramer (1999) avaliaram a ação antimicrobiana de vários antissépticos bucais e dentre eles um contendo Cloramina-T, cujo resultado foi satisfatório. Seu uso na formulação de dentifrícios, também, apresentou resultados promissores, como na redução do biofilme (Panzeri et al., 2009; Andrade et al., 2012) e na eficácia clínica, por meio da redução do índice de biofilme e índice de sangramento gengival (Tirapelli et al., 2010).

Apesar do avanço de pesquisas na área da odontologia e da existência de vários estudos sobre higiene de próteses totais, ainda não temos protocolos bem estabelecidos e

aplicáveis para orientação e uso dos usuários de próteses totais. Faltam estudos que nos levem a aquisição de produtos nacionais específicos para a higiene de dentadura. Não há, no mercado brasileiro, produtos com essa especificidade que corresponda à situação financeira que se encontram a maioria dos usuários de próteses totais. Em sua maior parte, os produtos específicos são importados e de custo elevado.

O objetivo deste estudo foi obter uma formulação de dentifrício que preencha os requisitos de um produto com indicação específica para higiene de prótese total, ou seja, que promova adequada remoção do biofilme e manchas, que tenha ação antimicrobiana e não seja deletério ao material do aparelho protético.

2. PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O estudo teve como objetivo geral, formular e avaliar dentifrícios a base de *Ricinus communis*, Triclosan e Cloramina-T para higiene de prótese total, por meio de análises *in vitro* e *in vivo*.

Como objetivos específicos, o estudo teve:

1. Formulação de três dentifrícios a base de *Ricinus communis*, Triclosan e Cloramina-T;
2. Controle de qualidade dos dentifrícios por meio da avaliação de cor, odor, sabor e aspecto;
3. Avaliação físico-química: pH, densidade, consistência, características reológicas;
4. Avaliação da rugosidade de superfície;
5. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos dentifrícios experimentais, frente ao biofilme multi-espécie de *S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*;
6. Avaliação *in vivo* da efetividade de remoção do biofilme e atividade antimicrobiana dos dentifrícios experimentais, frente aos microrganismos: *Candida spp*, *S. mutans*, *S. aureus* e bactérias Gram-negativas;
7. Identificação das espécies de *Candida* por meio do meio de cultura Chromagar e pela Polymerase Chain Reaction;
8. Avaliação dos dentifrícios pelos participantes por meio de questionário de satisfação.

3. MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Manipulação dos dentifrícios

Foram manipulados três dentifrícios (dentifrício de *R. communis* – DR; dentifrício de Cloramina-T – DC e dentifrício de Triclosan – DT) com agentes antimicrobianos (Tabela 1) e um dentifrício sem agente antimicrobiano (dentifrício branco – DB), cuja composição básica se apresenta na tabela 2.

Tabela 1- Agentes antimicrobianos para formulação dos dentifrícios.

Agente	Forma de apresentação	Fabricante
<i>Ricinus communis</i>	Éster do ácido ricinoléico em forma de gel	IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil.
Cloramina-T	Cloramina-T em pó	Panreac Química S.A.U., Barcelona, Espanha.
Triclosan	Triclosan em pó	Mix das essências, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Tabela 2- Composição básica dos dentifrícios.

Componentes	Fabricante	Função
Hidroxietilcelulose	Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA	Espessante
Glicerina	Labsynth Prod. para Laborat. Ltda, Diadema, SP, Brasil	Umectante
EDTA	Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda	Quelante
Sacarina sódica	Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda	Flavorizante
Agente antimicrobiano	Ver tabela 1	Antimicrobiano
Sílica (Sident 9)	Evonik Degussa GmbH, Dusseldórfia, Renânia do Norte-Vestfália Alemanha	Abrasivo
Sílica (Sident 22S)	Evonik Degussa GmbH	Abrasivo
Dióxido de titânio	Evonik Degussa GmbH	Pigmento (branco)
Mentol e morango ou uva	Firmenich, Meyrin, Genebra, Suíça	Flavorizante
Metilparabeno	Sigma-Aldrich	Conservante
Lauril sulfato de sódio	Sigma-Aldrich	Tensoativo
Água destilada	-----	Veículo

Esta etapa do estudo foi realizada com base nas técnicas de desinfecção e antissepsia preconizadas para manipulações farmacêuticas (Brasil - ANVISA, 2000). Para a obtenção dos dentifrícios os agentes espessante, umectante, quelante, conservante, tensoativo, o veículo e a sacarina foram pesados em balança digital (Mod. BG400, Ind. e Com. Eletro-Eletrônica GEHAKA Ltda, São Paulo, SP, Brasil), homogeneizados manualmente e aquecidos em

banho-maria ($70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) até a formação do gel. Após o resfriamento do gel, os demais componentes (agentes antimicrobianos, abrasivos, pigmento e flavorizante) foram pesados e, gradativamente, foram acrescentados e homogeneizados em um misturador a vácuo (Turbomix, EDG, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) para evitar a formação de espuma e bolhas (Figuras 1 e 2). Após a obtenção de um dentifrício homogêneo, foi realizado o armazenamento em bisnagas brancas de alumínio esmaltadas (GP Pharma embalagens, São José do Rio Preto, SP, Brasil) com capacidade para 60 g (Figuras 3). Os dentifrícios foram identificados por números, por um pesquisador diferente daquele que realizou os ensaios posteriores com os mesmos, buscando desta forma, a eliminação de viés.

Figura 1 - Inserção do gel na misturadora a vácuo.

Figura 2 - Dentifrício sendo manipulado na misturadora a vácuo.

Figura 3 - Envase dos dentifrícios.

3.2 Análises *in vitro*

3.2.1 Controle de qualidade por meio das características organolépticas:

As características organolépticas foram avaliadas seguindo as orientações da ANVISA de 2007 (Brasil - ANVISA, 2007). Uma alíquota de 20 g das amostras foi observada quanto ao aspecto, cor, odor e sabor, imediatamente após a obtenção dos dentifrícios (inicial) e após 15, 30, 60 e 90 dias.

a) Aspecto:

O aspecto foi avaliado visualmente quanto à separação de fases, precipitação e turvação e teve como parâmetro o aspecto inicial, logo após a manipulação. A amostra foi classificada segundo os seguintes critérios:

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

b) Cor:

A análise da cor foi realizada por método visual com fonte de luz branca e/ou natural e teve como parâmetro a cor inicial, logo após a manipulação.

c) Odor:

A amostra teve seu odor comparado ao flavorizante utilizado, e foi avaliado através do olfato.

d) Sabor:

O sabor da amostra foi comparado ao sabor inicial, logo após a manipulação, por meio do paladar, tendo como base o flavorizante utilizado.

As características de cor, odor e sabor foram avaliadas da seguinte forma:

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

3.2.2 Ensaios físico-químicos

Os ensaios físico-químicos permitem a detecção de problemas que possam comprometer a estabilidade e qualidade do produto, contribuindo para o aperfeiçoamento da formulação (Brasil - ANVISA, 2007).

a) Medida da densidade aparente

A determinação da densidade teve como base o Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos (Brasil - ANVISA, 2008). Para realização desse ensaio, foram utilizados 5 mL da amostra, quantidade obtida por meio de uma seringa hipodérmica, cuja parte terminal

foi removida (Figura 4). Para a obtenção deste volume, o êmbolo foi retraído até a marca, previamente padronizada, de 5 mL e, com o auxílio de uma espátula, o material foi depositado no interior da seringa. Uma lâmina reta foi apoiada e passada nas bordas da seringa para remoção de eventuais excessos. Em seguida, o material foi depositado em um recipiente apropriado, cujo peso foi descontado, e pesado em balança eletrônica com sensibilidade de 0,1 mg e capacidade de 210 g (Ohaus, Explorer, Barueri, SP, Brasil). Para obtenção do valor da densidade, foi utilizada a relação $D = m/v$, onde D = densidade aparente em g/ml; m = massa da amostra em gramas; v = volume final em mililitros.

Figura 4 - Seringa preparada para o ensaio de densidade.

b) Medida do pH

Essa análise foi realizada por meio de um peagâmetro (PHTEK - PHS-3E, Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil) (Figura 5), com eletrodo de vidro. O aparelho foi calibrado empregando soluções padrões (pH 4,7 e 9). Em um béquer, 5 mL da amostra foi suspensa em 15 mL de água destilada e, após agitação suave, foram realizadas três leituras de cada amostra para obtenção de um valor médio.

Figura 5 - Leitura do pH por meio de peagâmetro.

c) Determinação da consistência

A medida da consistência teve como base o escoamento da amostra, a qual foi submetida a uma carga constante por tempo determinado. Sobre uma placa de vidro, foram depositados 5 mL da amostra e, sobre eles, outra placa de vidro de peso conhecido. A esse conjunto foi colocada uma massa necessária para completar 300 g, por um período de 10 minutos. Transcorridos o período da aplicação da carga, foram realizadas três medidas do diâmetro formado pelo escoamento da amostra entre as duas placas de vidro, com o auxílio de uma régua milimetrada. Ao final, foi obtido um valor médio, expresso em milímetro (Figura 6A, B e C).

Figura 6 - Ensaio de consistência: A e B - Peso de 300 g sobre o conjunto placas de vidro e dentifrício; C – Mensuração do diâmetro do dentifrício com régua milimetrada.

d) Avaliação das características reológicas

A avaliação reológica permite obter a caracterização das propriedades de escoamento e deformação dos produtos sob a influência de forças externas (Brasil - ANVISA, 2008) por meio de ensaios rotativos, os quais permitem a obtenção do fluxo da amostra (viscosidade), seu comportamento (tixotropia) e a área de histerese.

A análise foi realizada em reômetro (Rheotest 2.1 – VEB-MLW-DDR, Lúpsia, Saxônia, Alemanha) (Figura 7A e B) com base na seleção de cilindros específicos para materiais de média viscosidade e tensão de cisalhamento, variando a velocidade em 12 níveis. Uma amostra de 25 mL foi depositada no interior de um dos cilindros. No primeiro momento a velocidade foi aumentada de forma crescente em 12 níveis e, no segundo momento, foi decrescente nos mesmos níveis. A cada nível de velocidade foi realizada uma leitura. Os dados obtidos foram utilizados para a construção do gráfico de curvas, no software Origin 8 (Electronic Arts Inc, Redwood City, California, EUA), e para análise do comportamento dos dentifrícios.

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

Figura 7 - Ensaio de reologia por meio do Reômetro. A: parte do equipamento onde o material é depositado (seta) e sofre cisalhamento; B: parte do equipamento onde são realizadas as leituras.

3.2.3 Avaliação da rugosidade de superfície

Espécimes em resina acrílica foram submetidos à escovação mecânica artificial e a rugosidade foi mensurada em micrometros por meio de um Rugosímetro portátil (Surtronic-25, Taylor Hobson Brasil, São Paulo, SP, Brasil) com um Cutt off de 0,8 mm e um percurso de 4,0 mm durante cada leitura. Os espécimes foram colocados sobre a mesa posicionadora do aparelho (Figura 8), a qual permite a movimentação dos espécimes tanto para a direita quanto para a esquerda. A primeira leitura foi tomada no centro do espécime e a segunda e terceira a 0,5 cm do centro. A partir das três leituras, uma média de rugosidade foi atribuída a cada espécime. As leituras foram realizadas antes (RI) e após (RF) a escovação.

Figura 8 - Rugosímetro, corpo de prova e mesa posicionadora.

Os espécimes foram distribuídos em 05 grupos com n=6, e submetidos à escovação artificial:

1. Grupo DB: suspensão do dentífrico sem agente antimicrobiano (Branco);
2. Grupo DR: suspensão do dentífrico de *R. communis*;
3. Grupo DT: suspensão do dentífrico de Triclosan;
4. Grupo DC: suspensão do dentífrico de Cloramina-T.
5. Grupo controle: água destilada;

a) Espécimes

Como espécimes foram utilizadas placas acrílicas pré-fabricadas (Plex Glass, polimetilmetacrilato, Day Brasil S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Panzeri et al., 2009) na dimensão de 90 mm de comprimento, 30 mm de largura e 4 mm de espessura, tamanho padrão para adaptação nas cubas da máquina de escovação (Figura 9).

Figura 9 - Espécime de resina acrílica pré-fabricada em Plex Glass.

b) Escovação dos espécimes

A escovação mecânica foi realizada em uma máquina do tipo Pepsodent (MAVTEC – Com. Peças, Acess. e Serv. Ltda. ME, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 10), a qual permite a escovação com velocidade de 356 rotações por minuto e um curso percorrido pela escova de 3,8 cm. Foram utilizadas escovas macias (Tek, Johnson & Johnson Industrial Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil), sendo uma para cada espécime. As escovas tiveram seus cabos cortados (Figura 11) para encaixe e fixação à máquina e, sobre elas um peso de 200 g foi colocado, simulando a força aplicada durante a escovação.

Figura 10 - Máquina de escovação artificial.

Figura 11 - Escova após remoção do cabo.

Um volume de 12 mL de água destilada ou de suspensões de dentifrício foi vertido nas cubas do aparelho sobre os espécimes. As suspensões foram preparadas na proporção de 1:1 com água destilada em volume suficiente para a realização dos ensaios. O tempo de escovação foi de 250 minutos (89000 ciclos), que correspondem, aproximadamente, a cinco anos de exposição à escovação por um indivíduo saudável (Vieira e Phillips, 1962; Freitas e Paranhos, 2006; Pisani et al., 2010b). As suspensões foram substituídas a cada 50 minutos e as escovas, a cada 100 minutos.

3.2.4 Avaliação microbiológica

Para a avaliação microbiológica foi utilizado o método de formação de biofilme multiespécies sobre resina acrílica, com base no protocolo de Panariello (2013), com o objetivo de obter uma condição próxima da realidade bucal, uma vez que o biofilme é uma estrutura complexa cujo desenvolvimento e patogenicidade depende da associação de diferentes microrganismos.

a) Obtenção dos espécimes

Foram obtidos 70 espécimes 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 matrizes metálicas (Figura 12) em muflas metálicas, gesso pedra tipo III e silicone de condensação densa (Zetalabor, Zermack, S.p.A., Labordental Ltda, São Paulo, SP, Brasil) (Figuras 13 A e B). Os materiais foram manipulados conforme a recomendação dos fabricantes. Após a presa do gesso, as muflas foram abertas e as matrizes metálicas removidas, para inserção da resina acrílica nos moldes de silicone (Figuras 14 A e B). Na sequência, o conjunto mufla e resina acrílica foram levados a uma prensa hidráulica de

bancada (Prensa Hidráulica Protecni, Protecni Equip. Med., Araraquara, SP, Brasil) (Figura 15), para compactação da resina por 30 minutos a 1250 Kgf. Os espécimes foram polimerizados pelo método convencional em polimerizadora automática (Termocicler 100, Oficina de Precisão, Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil), a 65 °C por 1 hora, seguido por período de 30 minutos a 100 °C. Após a polimerização da resina e resfriamento das muflas em temperatura ambiente, os espécimes foram removidos e imersos em água destilada a 50 °C por 24 horas para eliminação do monômero residual. Os excessos de resina foram removidos com fresa (Maxi-cut, Malleifer AS, Ballaigues, Vaud, Suíça), porém não foi realizado acabamento com lixa, para que se pudesse simular a face interna das próteses totais (Figura 16).

Figura 12 - Matrizes metálicas.

Figura 13 - Muflas preparadas. A- matrizes no molde de silicone; B – molde em silicone sem as matrizes.

Figura 14 - Preparo dos espécimes. A – Manipulação da resina acrílica para base de dentadura; B - Inserção da resina nos molde de silicone.

Figura 15 - Muflas posicionadas em prensa hidráulica.

Figura 16 - Espécimes após remoção do excesso de resina.

b) Análise Microbiológica

Para análise da ação antimicrobiana dos dentífricos, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 07 grupos (n=10), sendo dois para controle do teste microbiológico (1 e 2) e 5 para a análise da atividade antimicrobiana e formação do biofilme pelas cepas padrão dos microrganismos: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida glabrata* (ATCC 2001).

- 1) Controle negativo: sem contaminação e sem higienização por escovação;
- 2) Controle positivo: com contaminação e sem higienização por escovação;
- 3) Escovação com dentífrico sem agente antimicrobiano (D2);
- 4) Escovação com dentífrico de *Ricinus communis* a 10% (D3);
- 5) Escovação com dentífrico de Triclosan (D1);
- 6) Escovação com dentífrico de Cloramina-T (D4);

7) Escovação com água (C).

Com o objetivo de eliminar erros de viés, a formação de biofilme multiespécie foi realizada em dias alternados (duplicata) com a utilização de 5 espécimes, por grupo, em cada ensaio. Assim, ao final do teste microbiológico cada grupo obteve o $n = 10$.

b1) Esterilização dos espécimes

Os espécimes foram acondicionados em placas de Petri contendo água destilada e foram submetidos à esterilização em forno de micro-ondas (Panasonic do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), a uma potência de 650 W, por 6 minutos (Neppelenbroek et al., 2003) (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Espécimes na placa de Petri para serem esterilizados.

Figura 18 - Micro-ondas para esterilização dos espécimes.

b2) Meios de cultura.

A tabela 3 apresenta os meios de cultura que foram utilizados para padronização do inóculo e crescimento microbiano.

Tabela 3 - Meios de cultura.

Meio de cultura	Fabricante
<i>Mitis Salivarius Agar</i> e Bacitracina (MSB).	HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Maharashtra, Índia.
<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> e Cloranfenicol (SDA).	
<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (BHI).	
<i>Sabouraud Dextrose</i> (SDB)	
<i>Lethen Broth</i> (LB).	Difco, Detroit, Michigan, EUA.
<i>Chromagar</i> (CH).	

b3) Preparo dos inóculos e contaminação dos espécimes

Os inóculos selecionados foram semeados em meios de cultura específicos. Para o *S. mutans* foi utilizado o meio de cultura MSB com incubação em estufa microbiológica (De Leo – Equipamentos para Laboratório, Porto Alegre, RS, Brasil) a 37 °C em microaerofilia (condição obtida por meio de uma vela acesa dentro da cuba de anaerobiose) por 48 horas. Para as leveduras (*C. albicans*, *C. glabrata*) foi empregado o meio de cultura SDA e incubação a 37 °C por 48 horas, em aerobiose. Após o período de incubação, uma alçada dos microrganismos foi transferida, com o auxílio de alça bacteriológica de 10 µL, para tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido: 10 mL de BHI para *S. mutans* e 10 mL de SDB, para as leveduras. A incubação foi realizada em estufa microbiológica a 37 °C por 18 horas em microaerofilia para o *S. mutans* e 21 horas para as leveduras em aerobiose. Em seguida, as células foram centrifugadas (5430R, Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Alemanha) por 5 minutos a 5000 rpm e lavadas com PBS estéril (NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,2), por duas vezes, sob agitação e centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. As células lavadas foram resuspendidas em 10 mL de BHI estéril. A padronização dos inóculos foi realizada por meio do espectrofotômetro. Para *S. mutans*, a leitura da absorbância foi de 0,2 e comprimento de onda de 600 nm, obtendo 10⁸ UFC/mL. Para as leveduras, a absorbância foi de 0,3 para *C. glabrata* e 0,8 para *C. albicans* a 520 nm, obtendo 10⁷ UFC/mL. A padronização dos microrganismos foi confirmada por meio de semeadura de uma alíquota padronizada em meio Agar.

Assepticamente, em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, São Paulo, Brasil), 5 espécimes de cada grupo foram distribuídos em placas de cultura celular de 12 poços (Figura 19).

Cada poço recebeu 1,5 mL de meio da suspensão padrão (Figura 20), sendo 0,5 mL correspondente a cada microrganismo, com exceção do grupo controle negativo, o qual recebeu meio de cultura estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 h e 30 minutos sob agitação de 75 rpm (Incubadora Shaker, CE-320 Cienlab – Equipamentos Científicos, Campinas, SP, Brasil) em microaerofilia para aderência dos microrganismos aos espécimes (Figura 21). Após esse período, cada espécime e poço foram lavados duas vezes com PBS estéril (Figura 22) para a remoção dos microrganismos não aderidos.

Na sequência, 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 em microaerofilia para a maturação do biofilme. Após esse período os espécimes foram submetidos à higiene por escovação de acordo com os grupos.

Figura 19 - Distribuição dos espécimes estéreis na placa de cultura celular.

Figura 20 - Inserção de meio de cultura inoculado nos poços.

Figura 21 - Incubação das placas de cultura celular em microaerofilia.

Figura 22 - Lavagem dos espécimes e poços com PBS.

b4) Procedimento de escovação

A escovação dos espécimes contaminados foi realizada em Câmara de fluxo laminar sempre pelo mesmo pesquisador, houve cegamento em relação aos dentifrícios, uma vez que os mesmos foram identificados por número. As cerdas da escova Tek foram umedecidas com água destilada estéril e sobre elas foi dispensado 5 mm de dentifrício. Com auxílio de pinça estéril, cada espécime foi retirado da placa de cultura celular e todas as superfícies foram escovadas por 20 segundos, totalizando 60 segundos (Figura 23). Em seguida, os espécimes foram lavados com 50 mL de água destilada estéril, com auxílio de uma seringa hipodérmica estéril, para eliminação do dentifrício, e colocados em tubos de ensaios contendo 10 mL de meio LB.

Figura 23 - Escovação do espécime contaminado com escova e dentífrício.

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

b5) Semeadura do meio de cultura para avaliação da ação antimicrobiana dos dentífrícios

O conjunto tubo de ensaio/espécime foi levado a uma cuba de ultrassom (Altsonic, Clean 9CA, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 minutos para o desprendimento dos microrganismos que não foram removidos pela escovação.

Meios de cultura específicos foram utilizados para a semeadura da suspensão obtida em placa de Petri, de forma que permitiu a contagem das UFC dos microrganismos, isoladamente. Sendo assim, foram empregados: MSB para o *S. mutans* e CH para as leveduras. Para a diluição seriada da suspensão, os tubos foram agitados, individualmente, 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 PBS, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Depois, 50 µL desta diluição (10^{-1}) foram transferidos a outro eppendorf contendo mesmo volume de PBS. Esse procedimento foi realizado até a obtenção da diluição 10^{-3} . Uma alíquota de 50 µL da suspensão concentrada e de cada diluição foi semeada em placa de Petri sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 48 horas em estufa microbiológica. Para o *S. mutans*, a incubação foi realizada em microaerofilia.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem, por meio de uma lupa microscópica (Mod. SQZ-DS4, Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil), e o 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 0 a 300 colônias e foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Onde n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3) e q equivale à quantidade em mL, 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 espécimes foram incubados a 37 °C por um período de 48 horas a 28 dias em estufa microbiológica. A turvação do meio de cultura foi avaliada e comparada à presença ou ausência do crescimento de microrganismos nas placas semeadas, onde a turvação foi indicativa de crescimento microbiano.

3.3 Análises *in vivo*

a) *Delineamento do estudo*

O estudo foi desenvolvido com base em um modelo de estudo clínico cruzado, randomizado e controlado. Os grupos foram cruzados com o objetivo de eliminar a ampla variação existente entre indivíduos em resposta a um tratamento, uma vez que todos os tratamentos foram atribuídos a todos os indivíduos. Isso também proporciona a redução do número de indivíduos necessários para se testar diferentes tratamentos. Um período de “wash out” foi estabelecido de modo que, todo efeito residual do tratamento anterior (efeito “carry over”) pudesse ser eliminado quando da utilização do tratamento seguinte. Cada participante fez uso de todos os dentifrícios por um período de 07 dias com um “wash out” de 07 dias entre eles.

b) *Controle de vieses*

Com o intuito de minimizar os vieses, os dentifrícios foram dispensados em bisnagas brancas esmaltadas e, identificados por números (Figura 24), por um colaborador que não esteve envolvido em nenhuma fase operacional do estudo. Assim, os participantes e os pesquisadores permaneceram cegos aos tratamentos aplicados. Ainda, cada etapa do estudo foi realizada por um pesquisador previamente definido. Também, o sabonete líquido neutro foi dispensado em recipiente que permitiu ao paciente dosá-lo em quantidades controladas e suficientes (Figura 25).

Figura 24 - Dentifrícios dispensados em bisnagas brancas esmaltadas e identificados por números.

Figura 25 - Sabonete líquido dispensado em recipiente adequado para dosagem do participante.

Os participantes receberam os produtos de forma aleatória. Um pesquisador P1, não envolvido em nenhuma etapa deste estudo, realizou a aleatorização no programa Microsoft Excel 2010, gerando uma lista com quatro possibilidades de sequência de uso dos produtos (dentifrícios) (Tabela 4). Outro pesquisador, P5, de posse da lista de aleatorização, realizou a distribuição dos produtos, orientação e aplicação dos questionários aos participantes. Enquanto isso, o pesquisador P3 recolhia as próteses e levava-as ao laboratório. O pesquisador P2 era responsável por realizar o procedimento de evidenciação do biofilme da superfície interna das próteses, bem como pela tomada de registro fotográfico das mesmas. Na sequência, as próteses eram encaminhadas ao pesquisador P4, que era responsável pela coleta do biofilme (por meio da dissolução) e, também, pela quantificação do biofilme pelo programa Image Tool. Após a coleta, as próteses eram encaminhadas ao pesquisador P3 para a eliminação do biofilme e entrega das mesmas aos seus usuários.

O pesquisador P4 não foi envolvido com o fornecimento das instruções, entrega dos dentifrícios aos participantes e manuseio das próteses para a evidenciação e fotografia do biofilme.

Tabela 4- Tabela de aleatorização.

NÚMERO DO EQUIPO	NOME DO PACIENTE	SEMANAS			
		1	2	3	4
1	p1 -2	2	3	4	1
2	p2 -4	4	1	2	3
3	p3 -1	1	2	3	4
4	p4 -3	3	4	1	2

c) Seleção da amostra

Este estudo teve início somente após análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (C.A.A.E.: 17836713.0.0000.5419).

Para esta pesquisa foram avaliados 106 participantes das clínicas da disciplina de Prótese Total desta Faculdade, no segundo semestre do ano de 2013 e primeiro semestre do ano de 2014. Os indivíduos que satisfaziam aos critérios de inclusão foram convidados a participar e somente após a compreensão da natureza deste protocolo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizado o recrutamento dos participantes.

Como critérios de inclusão foram considerados: participantes com boa saúde geral, que faziam uso prévio e regular de próteses totais superiores, com base e dentes artificiais confeccionados em resina acrílica; próteses com uso mínimo de um ano e em condições adequadas.

A evidência de problemas na adaptação, reembasamento, reparos ou fraturas foram considerados critérios de exclusão.

Ainda como fator de inclusão, as próteses totais superiores dos participantes foram avaliadas quanto à presença de biofilme visível na superfície interna. Para a quantificação do biofilme foi aplicado o Índice Aditivo (Ambjørnsen et al., 1982) da seguinte forma:

- a. As próteses totais foram removidas da cavidade bucal dos participantes e enxaguadas em água corrente por 5 segundos para remoção do excesso de saliva e secas com um jato de ar por 10 segundos;
- b. A superfície interna foi dividida em cinco áreas: papila incisiva (1); duas áreas localizadas lateralmente a 1 cm da linha mediana (2 e 3) e área posterior de ambas as tuberosidades (4 e 5) (Figura 26);
- c. Cada área foi visualmente limitada com uma área de 1 cm² e o exame foi realizado sob iluminação do refletor de luz do equipamento odontológico;
- d. A quantificação do biofilme das próteses totais foi realizada por meio da atribuição de escores para cada área, os quais variaram de 0 a 3: - escore 0: sem biofilme; - escore 1: biofilme visível ao raspar a superfície com instrumento rombo; - escore 2: acúmulo de biofilme moderado, visível na presença de luz; - escore 3: acúmulo abundante de biofilme.
- e. Foram selecionadas as próteses com escore igual ou maior que um (01) para cada área.

Figura 26 - Representação da aplicação do Índice Aditivo.

Os participantes receberam orientações para que mantivessem a higienização habitual de suas próteses até o recebimento de instruções e dos materiais de higiene selecionados para este estudo.

d) Registro do “Baseline”: área de biofilme e contagem microbiológica.

Previamente à aplicação do método de higienização, o biofilme presente na superfície interna da prótese total superior foi registrado (“Baseline”), coletado para contagem de UFC e as próteses foram higienizadas de forma a promover a total remoção do biofilme.

Para registro da área coberta pelo biofilme, foram realizados os seguintes procedimentos:

- As próteses foram removidas da cavidade bucal do paciente, enxaguadas em água corrente por 5 segundos e secas com jato de ar por 10 segundos (Figura 27);
- A superfície interna da prótese total superior foi inteiramente corada com Vermelho neutro a 1% com auxílio de cotonete e, em seguida, as próteses foram enxaguadas por 5 segundos para remoção do excesso de evidenciador e secas por 10 segundos (Figuras 28 A e B);
- A prótese com o biofilme corado foi fotografada com uma câmera fotográfica digital (Canon EOS Digital Rebel EF-S 18-55, Canon Inc., Tokyo, Japão) e flash (Canon MR-14 EX, Canon Inc., Tokyo, Japão) com distância, foco e tempo de exposição padronizada, com o posicionamento da máquina fotográfica em estativa (CS-4 Copy Stand, Testrite Inst. Co., Inc., Newark, NJ, USA). As próteses eram posicionadas em ângulo de 45° em relação à lente com o auxílio de uma mesa angulada (Figura 29). Na região anterior das próteses era posicionada uma régua milimetrada para calibração da unidade de medida (cm²);
- As próteses foram higienizadas por meio de escovação com escovas Denture (Condor S.A., São Bento do Sul, SC, Brasil) e sabão neutro líquido (Pleasant – Perol Coml. e Indl. Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 30) pelo pesquisador e devolvidas adequadamente limpas aos participantes.

Dessa forma, foi possível garantir que todos os aparelhos protéticos tivessem uma condição padrão de higiene (biofilme eliminado) imediatamente antes de iniciar os procedimentos de higienização com os dentífrícios preconizados. Assim, após cada período de 7 dias de tratamento (dentífrícios e “wash out”) o biofilme era eliminado.

Figura 27 - Lavagem da prótese com água corrente por 5 segundos.

Figura 28 - Evidenciação do biofilme. A- Prótese evidenciada com auxílio de cotonete; B- Remoção do excesso de evidenciador com água corrente.

Figura 29 - Registro do biofilme evidenciado da superfície interna da prótese.

Figura 30 - Eliminação do biofilme.

Para coleta do biofilme e contagem das UFC, foi realizado o seguinte procedimento:

Após a obtenção das fotografias, o pesquisador P4 colocou as próteses coradas em placas de Petri, em zona asséptica. Cada prótese teve sua superfície interna levemente escovada com escovas de cerdas macias Tek estéreis e 10 mL de PBS para o desprendimento do biofilme. Para a apreensão das próteses foram utilizadas pinças estéreis (Panzeri et al., 2009). Para cada prótese foi utilizada uma única escova e pinça.

A escovação foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador, a fim de se obter a padronização do tempo, força e frequência dos movimentos durante o procedimento. A suspensão obtida com o biofilme foi transferida, com auxílio de pipeta estéril, para um tubo de ensaio estéril contendo pérolas de vidro, o qual foi fechado em condições assépticas e identificado de acordo com a numeração dada ao participante naquele dia da coleta.

Ao final de cada coleta, o biofilme das próteses foi totalmente removido conforme já descrito anteriormente (item d).

e) Intervenção - Aplicação do método de higienização preconizado

Como dito anteriormente, os participantes foram distribuídos em quatro grupos de acordo com os dentifrícios e em momentos diferentes de forma aleatória.

Dentifrício 1: dentifrício de Triclosan;

Dentifrício 2: dentifrício sem agente antimicrobiano (Branco);

Dentifrício 3: dentifrício de *Ricinus communis*;

Dentifrício 4: dentifrício de Cloramina-T.

No primeiro dia de intervenção da pesquisa, cada participante recebeu um kit (Figura 31) contendo uma escova específica para higiene de próteses totais (Denture), um dentifrício experimental, de acordo com a sequência de aleatorização, e a orientação de como usar o produto por escrito. Para os períodos de “wash out”, os participantes recebiam sabonete líquido neutro e a orientação de como utilizá-lo.

Os participantes foram orientados a escovar suas próteses com escova específica para próteses totais com os dentifrícios ou sabonete líquido neutro por 3 minutos após as refeições (café da manhã, almoço e jantar) e manter as próteses em recipiente com água limpa durante o período do sono.

Figura 31 - Escova Denture e um dos dentifrícios experimentais que compuseram o Kit.

Além disso, os participantes foram orientados quanto a escovação propriamente dita: segurar o aparelho protético na palma da mão sobre um pia cheia de água, para prevenir danos ao aparelho em caso de queda. Quando da utilização do sabão, utilizar duas gotas de sabonete neutro e quando da utilização do dentifrícios, depositar uma quantidade pequena de dentifrício (aproximadamente 1cm) sobre as cerdas da escova; escovar a região referente ao rebordo alveolar do aparelho protético com o conjunto de menor número de cerdas da escova e, nas demais regiões da superfície interna e da superfície, escovar com o conjunto de maior número de cerdas (Figuras 32 A, B, C e D).

Figura 32 - Instruções de higienização das próteses. A- Deposição do dentifrício sobre as cerdas da escova; B- Conjunto de menor número de cerdas utilizado para escovar a região interna da prótese referente ao rebordo alveolar; C e D- Conjunto de maior número de cerdas para escovar demais regiões da superfície interna e toda a superfície externa da prótese.

Durante todo o período de execução do estudo, nenhum dos pesquisadores envolvidos com a distribuição dos produtos, evidênciação e coleta dos dados, bem como os participantes, sabiam a identificação dos dentifrícios. Portanto, o estudo foi duplo cego. O período experimental total foi de 07 semanas.

3.3.1 Avaliação da capacidade de remoção do biofilme

Para avaliar a eficácia dos dentifrícios quanto à remoção do biofilme, foi empregado o método de quantificação computadorizado (Paranhos e Silva-Lovato, 2004), para o qual foram necessários os seguintes procedimentos:

a) Evidênciação do Biofilme e Fotografia das Próteses

A cada retorno dos participantes, após 07 dias da utilização dos dentifrícios, as próteses eram removidas da cavidade bucal e acondicionadas em recipientes plásticos descartáveis, devidamente individualizados e identificados. Em seguida, eram levadas ao laboratório para registro da área coberta por biofilme e posterior mensuração. Inicialmente, as próteses foram enxaguadas com água (5 segundos) e secas por um jato de ar (10 segundos). A superfície interna da prótese total superior foi evidenciada e fotografada conforme já descrito anteriormente (item d).

b) Quantificação propriamente dita

As fotografias foram transferidas para um computador (Intel Pentium T4 300, Emachines by Acer, Taipei Hsien, Taiwan, China) e a mensuração do biofilme foi realizada pelo programa Image Tool (Windows, versão 3.0, The University of Texas Health Science Center in San Antonio). As medidas da área total da superfície interna e da área corada contendo biofilme foram realizadas e calculada em porcentagem.

A mensuração das áreas era realizada em cm^2 após a calibração do software. Para isso, uma régua milimetrada foi posicionada na região anterior da prótese durante a fotografia (Figura 33). Inicialmente, obteve-se a área total da prótese, por meio da delimitação da área da superfície interna, que foi iniciada na região direita logo após o sulco hamular (Figura 34), seguindo para os flancos bucal e labial direito, depois flancos labial e bucal esquerdo, sulco hamular esquerdo, região posterior, sulco hamular direito, fechando a área total (Figura 35).

Figura 33 - Calibração da unidade “cm” com auxílio da régua milimetrada.

Figura 34 - Início da delimitação do contorno da área total da superfície interna (seta).

Figura 35 - Término da delimitação do contorno da área total.

Cada área evidenciada, ou seja, que apresentava biofilme foi medida e registrada para posteriormente serem somadas, caracterizando a área total do biofilme (Figura 36).

Figura 36 - Delimitação da área de biofilme (área corada) indicada pela seta.

Obtidas as áreas (total e biofilme), a porcentagem de biofilme (X) foi calculada como a relação entre a área do biofilme multiplicado por 100 e área da superfície total da base interna da prótese (Andruciolli et al., 2004; Paranhos et al., 2007; Salles et al., 2007).

$$X = \frac{\text{área da superfície recoberta pelo biofilme}}{\text{área da superfície total da base interna da prótese}} \times 100$$

3.3.2 Análise da ação antimicrobiana dos dentifrícios contra os microrganismos presentes no biofilme das próteses totais

Após a obtenção das fotografias, o pesquisador P4 coletou o biofilme para contagem das UFC após o uso dos dentifrícios pelos participantes como descrito no item d, ou seja, pela dissolução do biofilme (Figura 37).

Figura 37 - Coleta do biofilme da superfície interna das próteses com auxílio de escova e pinça estéreis

a) Quantificação das espécies de Microrganismos identificados

O pesquisador P4 levou a suspensão coletada a um agitador de tubos de ensaio para fragmentar o biofilme. Em seguida, uma alíquota de 50 µL da suspensão do tubo foi transferida a um eppendorf contendo 450 µL de PBS obtendo-se uma diluição de 10^{-1} . Depois, 50 µL desta diluição (10^{-1}) foram transferidos a outro eppendorf contendo mesmo volume de PBS para obtenção de 10^{-2} . Esse procedimento foi realizado mais uma vez para obtenção da diluição 10^{-3} . Uma alíquota de 50 µL, da suspensão inicial e de cada diluição foi semeada em placas de Petri de 16 x 60 mm com auxílio de alça de Drigalsky, contendo os meios de cultura específicos para o crescimento dos microrganismos de interesse, sendo: *Chromagar* (Difco) para contagem e identificação das espécies de *Candida*; *Mitis Salivarius* (HiMedia

Laboratories Pvt. Ltda) acrescido de 0,004 mg/mL de bacitracina para contagem dos *Streptococcus mutans*; *Agar Manitol* salgado (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda) para contagem de *Staphylococcus aureus*; e *McOnkay* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda) para contagem de bactérias Gram-negativas.

Em seguida, as placas foram submetidas à incubação a 37°C por 48 horas em estufa microbiológica. A incubação das espécies do grupo *mutans* foi realizada em microaerofilia a 37°C por 48h. Os meios de cultura foram preparados conforme as recomendações do fabricante. Os microrganismos foram selecionados com base nas características de prevalência (*Candida spp*, *S. aureus*), virulência (*Candida spp*, *S. aureus* e bactérias Gram-negativas) e o *S. mutans* por ser precursor do biofilme.

As colônias com coloração e morfologia indicativa das espécies avaliadas foram identificadas e contadas. A contagem foi realizada da mesma forma como já descrita anteriormente (tópico 3.2.4, item b5).

3.3.3 Identificação das espécies de *Candida*

a) Por meio do meio de cultura *Chromagar*

A identificação das espécies de *Candida* nos permitiu avaliar o potencial individual dos agentes antimicrobianos contidos nos dentifrícios sobre as espécies identificadas.

O *CHROMagar* é um meio de cultura que serve para isolamento e identificação ou diferenciação de fungos, especialmente de algumas espécies de *Candida*, por conter substratos cromogênicos. Assim, quando as leveduras metabolizam o meio, estes substratos fazem com que as colônias se desenvolvam de cores diferentes, por liberarem compostos de várias cores numa sequência de degradação de enzimas específicas. Essa diferenciação permite a identificação de determinadas espécies ou de determinados grupos de microrganismos.

A identificação das espécies de *Candida* foi realizada com base nas especificações dos fabricantes, sendo:

- *C. albicans*: verde claro a verde médio;
- *C. tropicalis*: azul esverdeada a azul metalizado;
- *C. krusei*: rosa claro de aspecto rugoso e com rebordo esbranquiçado;
- *C. glabrata*: rosa ou malva claro a escuro.

Após o período de incubação das placas, as colônias das espécies de *Candida* foram contadas e identificadas conforme a indicação acima.

As colônias de *Candida* que, cresceram e foram identificadas nesta etapa do estudo, tiveram a identificação das espécies confirmada pelo método de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Para isso, uma colônia de cada cor de cada

participante foi armazenada isoladamente em microtubos de polipropileno, com 500 µL de meio de cultura ágar *Saboraud Dextrose*.

b) Confirmação pela técnica de Polymerase Chain Reaction

Para a identificação das espécies pela técnica de PCR foi realizada a extração do DNA de todas as espécies encontradas, a amplificação pelos *primers* específicos e a digestão com enzimas de restrição. O mesmo procedimento foi realizado para as cepas *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. parapsilosis* (ATCC 90018), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. dubliniensis* (ATCC 7987) para comparação do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). As espécies que não foram identificadas dentre estas, a comparação foi realizada com base nos resultados encontrados no estudo de Cornet et al. (2011).

b1) Extração do DNA das leveduras

Foi obtida uma alíquota das *Candidas* a partir das colônias armazenadas na etapa anterior, com auxílio de uma alça de plástico descartável estéril (Ø 2 mm), a qual foi semeada em estrias múltiplas em placa de petri com ágar *Saboraud Dextrose*. Após 24 horas de crescimento, uma colônia foi transferida a um tubo de ensaio com 10 mL de caldo *Saboraud Dextrose*. Após 24 horas de crescimento, os tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 3 200 g. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 500 µL de tampão de lise [200 mM de Tris-HCl (Sigma-Aldrich); 250 mM de NaCl (Sigma-Aldrich); 25 mM de EDTA (Sigma-Aldrich) 0,5% de Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Sigma-Aldrich)], com pH 8,5 e transferido para um microtubo de 2 mL. Ainda, a esse tubo foi adicionado 500 µL de pérolas de vidro, de 425-600 µm de diâmetro, lavadas previamente com ácido clorídrico (Sigma-Aldrich). As amostras foram levadas ao agitador de tubos e homogeneizadas vigorosamente por 10 minutos. Todo o lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e a ele foi adicionado o mesmo volume (500 µL) de fenol-clorofórmio (1:1) (Sigma-Aldrich). Em seguida, os tubos foram novamente agitados, em agitador de tubos, por 10 minutos e depois, centrifugados por 10 minutos a 20 000 g. A fase aquosa obtida desta centrifugação (interfase superior), foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e a ela foi adicionado 1 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich), para que ocorresse a precipitação do DNA. Seguiu-se centrifugação por 5 minutos à velocidade máxima. O sobrenadante obtido foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol a 70% (Sigma-Aldrich) gelado e submetido à centrifugação por 5 minutos à velocidade máxima. O *pellet* obtido foi seco à temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensionadas em 50 µL de água ultra pura e submetidas a um tratamento com 20 µg/ml de RNase (Sigma-Aldrich) em banho-maria à 37°C por 30 minutos.

Após o tratamento, 1 µL de cada amostra foi diluída em 49 µL de água e quantificada em espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Nagaokakyo, Quioto, Japão). A medida da absorbância foi feita a 260 nm e 280 nm e a razão 260/280 determinou a pureza da amostra. A integridade do DNA foi avaliada aplicando-se as amostras em gel de agarose (Agargen, Laboratorios Espanagar, Torrejon de Ardoz, Madri, Espanha). O gel foi preparado a 1% pela solidificação da agarose fundida em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0). O gel foi acondicionado em cuba de eletroforese (Major Science, Saratoga, Califórnia, EUA) 10x10 cm com tampão TE e em cada poço do gel foi colocado uma mistura de 1 µL de tampão de carregamento (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), 1 µL de corante Gel Red (Biotium Inc., Hayward, Califórnia, EUA) diluído 50x e 2 µL da amostra. A corrida seguiu a 100 V por 30 minutos. O gel foi visualizado e analisado em fotodocumentador E-BOX VX5 (Fisher Biotech, Perth, Austrália Ocidental, Austrália) e após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas a -20°C.

b2) Seleção do Primer e amplificação da PCR

A seleção dos *primers* teve como base o estudo de Cornet et al. (2011). Sendo assim, foi selecionado um par de *primers* (Sigma-Aldrich) de amplificação parcial do IGS (IGS2), 5'-TTAACTACAGTTGATCGGAC-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) para as espécies de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Outro par de *primers* (Sigma-Aldrich) de amplificação total do IGS 5'-CGATCTGCTGAGATTAAG-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) foi selecionado para a espécie de *C. parapsilosis*. Embora, a seleção tenha sido de dois *primers forward*, todas as amostras foram primeiramente amplificadas com o *primer* IGS2, uma vez que não conhecíamos qual espécie se tratava àquelas cepas. As amostras que não amplificaram com o *primer* IGS2 tiveram o protocolo de amplificação repetido para o *primer* IGS. Para amplificação, uma mistura contendo 10 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 5 nmol de dNTP (Qiagen, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), 1,5 U Taq polymerase (Sigma-Aldrich), 10% de tampão da Taq polymerase (Sigma-Aldrich), e 50 ng de DNA, em um volume final de 25 µL, foi submetida a ciclagem térmica. A ciclagem foi realizada em um aparelho Ampliterm (termociclador) (Thermal Cyclers, Madison, Wisconsin, EUA) com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C, 2 minutos e 30 segundos a 72°C e um passo de elongação final de 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, uma alíquota de 4 µL do produto do PCR foi confirmada em gel de agarose 1% a 100 V por 40 minutos. O produto de PCR confirmado foi submetido à digestão por meio de enzimas de restrição, com o objetivo de obtermos o polimorfismo no

comprimento dos fragmentos de restrição necessários para a identificação das espécies de *Candida*. Para isso, foi selecionada a enzima NlaIII (New England BioLabs, Hitchin, Hertfordshire, Inglaterra) para o IGS2 ou a enzima AluI (Invitrogen) para o IGS. A enzima de restrição NlaIII foi selecionada para o primer IGS2 pelo fato da sequências de IGS2 apresentar mais sítios NlaIII (CATG) do que as AluI (AGCT).

Para a reação de digestão foi utilizado 10 µL de produto de PCR, 1,5 U de uma das enzimas (NlaIII ou AluI), 2 µL do tampão em um volume final de 20 µL. A mistura foi levada ao termociclador por 90 minutos a 37°C, seguido de inativação da enzima por 20 minutos a 65°C. Os subfragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 2% a 80 V por 80 minutos, para verificar a separação das bandas.

Cada matriz de gel conteve amostras de todas as cepas de referência (ATCC). A análise de cada matriz de gel foi realizada por meio de comparação visual dos padrões de bandas das cepas que foram identificadas com as cepas de referência ou do estudo de Cornet et al., 2011

3.3.4 Análise dos dentifrícios pelos participantes

A cada período de uso dos dentifrícios, os participantes responderam a um questionário, que continha nove perguntas com o objetivo de avaliar os dentifrícios segundo a visão dos usuários dos produtos, bem como, sua aceitação.

Questionário:

1. Você acha que o produto utilizado esta semana limpou sua prótese?
☐ sim ☐ não
2. Você achou o cheiro do produto agradável?
☐ sim ☐ não
3. Você acha que o produto deixou sabor em sua prótese?
☐ sim ☐ não
4. Você achou o produto fácil de ser usado?
☐ sim ☐ não
5. Você acha que a quantidade de espuma formada durante a escovação foi suficiente?
☐ sim ☐ não
6. Você achou que o produto se espalha bem sobre a prótese?
☐ sim ☐ não
7. Depois da escovação, você achou que o produto foi fácil de sair da prótese?
☐ sim ☐ não

8. Você usaria o produto diariamente?
() sim () não
9. Você indicaria o produto para algum amigo?
() sim () não

3.4 Análise dos Dados

Os resultados das análises de Medida da Densidade, Medida do pH, Determinação da Consistência, Avaliação das Características Reológicas e das Características organolépticas foram informados em tabelas auto explicativas e discutidos.

Para a análise da rugosidade foram considerados como fatores de variação os dentífricos e o tempo. Verificada a distribuição normal (Shapiro-Wilks) e homogênea (Levene) dos dados, empregou-se análise de variância. Os dados obtidos para a análise microbiológica *in vitro* foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando um fator de variação (dentífricos).

O teste estatístico de Friedman foi aplicado em todas as análises *in vivo* deste estudo, devido à distribuição não normal dos dados. Para a avaliação da capacidade de remoção do biofilme e ação antimicrobiana pelos dentífricos foi considerado um fator de variação (dentífricos) e os participantes foram considerados repetições. A análise dos dados para a identificação das espécies de *Candida* seguiu os mesmos princípios para a análise microbiológica *in vitro*. Para a análise da avaliação dos dentífricos pelos participantes, foi aplicado o teste de Cochran.

Para a análise microbiológica *in vitro* os dados foram expressos em UFC/10 mL e para a análise microbiológica *in vivo*, em UFC, porém os dados de ambas foram transformados em $\log_{10}$.

Os testes estatísticos foram realizados com $p = 0,05$, pelo pesquisador P1.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1. Análises *in vitro*

4.1.1 Controle de qualidade por meio das características organolépticas

Na tabela 5 pode-se observar que o dentifrício de *R. communis* foi o único a apresentar alterações, sendo elas na cor, odor e sabor. No entanto, as alterações mostraram-se semelhantes às características da matéria prima, ou seja, o gel do ácido ricinoléico.

Tabela 5- Características organolépticas dos dentifrícios experimentais.

Características		15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Dentifrício branco	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 de <i>R. communis</i>	Aspecto	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Cor	normal, sem alteração	levemente alterada	modificada	normal, sem alteração
	Odor	levemente alterado	modificado	normal, sem alteração	normal, sem alteração
	Sabor	modificado	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração
Dentifrício de Triclosan	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 de Cloramina-T	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

Tabela 6- Valores de densidade, pH e consistência dos dentifrícios experimentais.

	Branco	<i>Ricinus communis</i>	Triclosan	Cloramina-T
Densidade (g/mL)	1,12	1,12	1,17	1,19
pH	6,33	8,04	6,12	7,14
Consistência (mm)	80,84	83,67	78,67	89,5

4.1.2 Ensaios físico-químicos

a) Densidade aparente, pH e consistência

A tabela 6 apresenta os resultados dos ensaios de densidade, pH e consistência dos dentifrícios experimentais. Todos os dentifrícios apresentaram densidade semelhante. Os dentifrícios de Cloramina-T e *R. communis* apresentaram pH alcalino. Quanto à consistência, o dentifrício de Cloramina-T apresentou o maior diâmetro, correspondendo, portanto à menor consistência.

b) Avaliação das características reológicas

Os gráficos (Figuras 38, 39, 40 e 41) obtidos a partir dos dados (Tabelas A1, A2, A3 e A4 – Apêndice A) coletados durante o ensaio de reologia indicaram que todos os dentifrícios apresentaram comportamento tixotrópico. A tabela 7 apresenta a área de histerese e os valores de viscosidade e dos dentifrícios experimentais.

Figura 38 - Curva obtida do ensaio de reologia do dentifrício Branco.

Figura 39 - Curva obtida do ensaio de reologia do dentifrício de *R. communis*.

Figura 40 - Curva obtida do ensaio de reologia do dentifrício de Triclosan.

Figura 41 - Curva obtida do ensaio de reologia do dentifrício de Cloramina-T.

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

Dentifrício	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T
Dados				
Viscosidade (cps)	*25304,52675	*23004,11523	*26454,73251	*18403,29218
	**24154,32099	**21853,90947	**26454,73251	**18403,29218
Área de Histerese (cm ²)	0,34	0,44	1,76	0,82

Legenda: * viscosidade da curva ascendente; ** viscosidade de curva descendente; cps – centipoise.

O dentifrício de Triclosan apresentou maior viscosidade, bem como a maior área de histerese. Embora o dentifrício Branco tenha apresentado o segundo maior valor de viscosidade, apresentou a menor área de histerese.

4.1.3 Avaliação da rugosidade de superfície

A tabela A5 (Apêndice A) apresenta os valores da rugosidade da superfície dos espécimes antes (RI) e após (RF) a escovação e a tabela A6 (Apêndice A) apresenta a análise de variância dos dados obtidos.

A análise de variância indicou interação entre os fatores (grupo/tempo) com $p=0,000$. Os dentifrícios não apresentaram diferenças entre si, mas todos promoveram um aumento da rugosidade se comparado ao grupo escovado com água. Em relação à rugosidade inicial, a escovação com os dentifrícios promoveu diferença significativa. A tabela 8 apresenta a comparação das médias e desvio padrão (DP).

Tabela 8- Comparação das médias e DP dos grupos antes (Rugosidade Inicial) e após (Rugosidade Final) a escovação.

Grupos	Rugosidade Inicial (Ra)	Rugosidade Final (Ra)
Branco	0,019 Aa (±0,004)	0,264 Ba (±0,098)
<i>R. communis</i>	0,022 Aa (±0,007)	0,236 Ba (±0,052)
Triclosan	0,010 Aa (±0,001)	0,264 Ba (±0,116)
Cloramina-T	0,027 Aa (±0,006)	0,203 Ba (±0,105)
Água	0,025 Aa (±0,005)	0,027 Ab (±0,004)

Letras iguais representam igualdade estatística. Letras maiúsculas indicam comparação entre colunas; letras minúsculas indicam comparação entre linhas.

Tabela 9 - Comparação das medianas e IC dos grupos contra as espécies de *Candida* e valor de *p*.

Grupos	Mediana	IC	<i>p</i>	Comparação
Água	4,13	3,92 - 4,35	0,00	A
<i>R. communis</i>	3,59	3,19 - 3,79		AB
Branco	3,26	2,91 - 3,71		AB
Cloramina T	2,6	1,37 - 3,24		BC
Triclosan	1,3	0,33 - 2,43		C

4.1.4 Avaliação microbiológica

Foi realizada a análise da turvação do meio de cultura dos tubos de ensaio contendo os espécimes que foram submetidos ao procedimento de escovação, após o período de incubação. Todos os tubos apresentaram turvação do meio, indicando crescimento microbiano, com exceção dos tubos correspondentes ao grupo controle negativo, os quais permaneceram, em incubação, até 28 dias, para confirmação da ausência de crescimento microbiano. Sendo assim, a ausência de turvação comprovou a esterilidade dos espécimes.

A contagem das UFC/10 mL das espécies de *Candida* e *S. mutans* para cada dentifrício e água foram apresentados nas Tabelas A7 e A8 (Apêndice A).

Para as espécies de *Candida*, o dentifrício de Triclosan foi o mais eficaz, seguido pelo dentifrício de Cloramina T. No grupo da água houve a maior quantidade de UFC e os dentifrícios de *R. communis* e o Branco apresentaram atividade intermediária entre a água e Cloramina-T (Tabela 9 e Figura 42) frente às espécies de *Candida*.

Figura 42 - Comparação entre os grupos para as espécies de *Candida*.

Para o *S. mutans*, pode ser observado que houve diferença entre o grupo controle e os dentifrícios, e estes apresentaram atividade antimicrobiana semelhante. O grupo escovado com o dentifrício de Triclosan não apresentou crescimento de colônias de *S. mutans*, mostrando uma maior atividade antimicrobiana, quando comparado aos demais. A tabela 10 e a figura 43 apresentam a comparação dos grupos.

Tabela 10 - Comparação das medianas e IC dos grupos contra as espécies *S. mutans* e valor de *p*.

Grupos	Mediana	IC	<i>p</i>	Comparação
Branco	0	-0,21 – 2,72	0,001	B
<i>R. communis</i>	2,3	0,57 – 2,62		B
Cloramina T	0	-0,43 – 1,90		B
Água	3,86	3,56 – 4,02		A

Figura 43 - Comparação entre os dos grupos para *S. mutans*.

As figuras A1 e A2 (Apêndice A) apresentam alguns exemplos do crescimento dos microrganismos estudados, após a escovação com água e com os dentifrícios experimentais.

4.2. Análises *in vivo*

Todos os participantes ($n = 106$) das clínicas da disciplina de Prótese Total, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, receberam informações a respeito de como seria realizada a pesquisa e foram convidados para participarem da avaliação. Dentre os indivíduos que atenderam aos critérios de inclusão, 44 aceitaram participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. No entanto, 41 participantes, sendo 09 do sexo masculino e 32 do sexo feminino, finalizaram a pesquisa. O fluxograma (Figura 44) apresenta a evolução da amostra durante o período de execução da pesquisa e a tabela 11 apresenta as características sociais dos participantes da pesquisa.

Figura 44 - Fluxograma da evolução da amostra clínica.

Tabela 11- Dados sociais dos participantes da pesquisa.

Gênero		Idade média	Estado Civil		Profissão	
Feminino	Masculino	65	Casados	23	Do lar	19
32	9		Solteiros	2	Doméstica	5
			Divorciados	4	Eletricista	1
			Amasiados	3	Pedreiro	2
			Viúvos	9	Luthier	1
					Serviços gerais	1
					Aposentados	12

4.2.1 Avaliação da capacidade de remoção do biofilme

A quantificação do biofilme da superfície interna dos aparelhos protéticos superiores, realizadas no “Baseline” e após o uso dos dentifrícios, foi expressa em porcentagem, como mostra a tabela 12.

Tabela 12 - Porcentagem de biofilme sobre a superfície interna das próteses superiores, no “Baseline” e após o uso dos dentifrícios.

N= 41	Baseline	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T
1	4,06	2,90	2,00	3,56	2,10
2	16,52	8,72	10,72	11,81	10,46
3	7,11	1,93	3,01	2,56	2,42
4	8,62	6,65	0,11	5,68	8,39
5	28,93	19,43	23,86	25,05	14,15
6	12,37	6,38	6,06	5,41	4,73
7	9,31	4,16	6,31	4,33	3,96
8	9,60	7,40	5,90	5,01	4,50
9	12,98	5,48	5,54	8,07	8,87
10	19,96	2,63	5,96	2,82	4,72
11	25,22	10,40	12,22	11,45	12,07
12	1,58	0,07	0,07	1,38	2,45
13	19,89	7,39	10,67	18,89	7,72
14	24,46	12,74	17,68	11,17	8,42
15	13,09	10,74	16,18	16,50	11,44
16	40,53	28,41	26,96	33,82	31,27
17	7,25	4,83	4,27	1,56	2,72
18	42,02	27,38	27,42	27,15	21,95
19	38,64	1,51	37,20	31,65	29,27
20	6,35	5,89	3,15	1,08	2,16
21	5,65	6,00	6,05	5,44	5,76
22	12,32	6,28	7,94	6,28	6,64
23	29,73	15,49	9,95	8,23	4,96
24	10,69	9,21	7,59	10,83	7,24
25	43,48	4,62	32,30	19,89	8,14
26	43,72	33,23	16,20	29,12	26,63
27	7,36	5,99	7,17	7,35	6,80
28	15,85	10,56	11,20	12,73	12,97
29	2,12	6,95	7,67	5,10	3,25
30	27,89	23,93	24,39	23,31	18,94
31	40,55	16,29	3,73	17,53	12,18
32	26,32	17,99	10,74	20,84	12,80
33	56,76	1,39	2,35	2,61	3,24
34	8,58	2,77	6,93	3,62	6,97
35	31,00	8,61	10,53	10,16	15,77
36	16,82	18,95	21,47	12,66	18,69
37	38,49	16,49	10,69	12,40	9,23
38	7,37	0,12	0,16	0,72	0,04
39	31,40	19,32	17,32	15,24	17,27
40	0,35	2,68	3,61	3,69	5,76
41	51,62	26,91	28,43	27,47	28,39

As figuras 45, 46, 47, 48 e 49 apresentam a frequência dos participantes em função da porcentagem da área de biofilme sobre a superfície interna das próteses, antes (“Baseline”) e após o uso dos dentifrícios. Nota-se que a frequência de indivíduos com porcentagem entre 0 e 10 aumentou após o início de uso dos dentifrícios e que indivíduos com biofilme acima de 40% desapareceram.

Figura 45 - Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme no “Baseline”.

Figura 46 - Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentifrício Branco.

Figura 47 - Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentifrício *R. communis*.

Figura 48 - Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentifrício Triclosan.

Figura 49 - Frequência de participantes em função da porcentagem do biofilme após o uso do dentifrício Cloramina-T

A tabela 13 apresenta a estatística descritiva da porcentagem de biofilme no “Baseline” e após o uso dos dentifrícios.

Tabela 13 - Estatística descritiva da porcentagem de biofilme sobre a superfície interna das próteses totais superiores no “Baseline” e após a utilização dos dentifrícios.

Descritiva	Baseline	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloaramina-T
Média	20,892	10,459	11,505	11,809	10,377
Desvio padrão	15,155	8,565	9,432	9,331	8,034
Erro padrão	2,367	1,338	1,473	1,457	1,255
Mínimo	0,350	0,070	0,070	0,720	0,040
Máximo	56,760	33,230	37,200	33,820	31,270
Quartil (75%)	31,200	16,390	16,790	18,210	13,560
Mediana (50%)	16,520	7,390	7,940	10,160	8,140
Quartil (25%)	7,970	4,390	4,900	4,010	4,610
Intervalo de Confiança	16,108	7,755	8,528	8,864	7,841
	25,675	13,163	14,482	14,754	12,912

Comparando a porcentagem de biofilme da superfície interna das próteses superiores após o uso dos dentifrícios experimentais nota-se que não houve diferença significativa entre eles (Teste de Friedman, $p = 0,055$) (Figura 50).

Figura 50 - Comparação da porcentagem de biofilme após o uso dos dentifrícios experimentais. D1- Dentifrício de Triclosan; D2- Dentifrício Branco; D3- Dentifrício de *R. communis* e D4- Dentifrício de Cloramina-T.

4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

As tabelas 14, 15, 16 e 17 apresentam a contagem das UFC, em Log, para as espécies de *Candida*, *S. mutans*, *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-negativas, respectivamente.

Tabela 14- Contagem das UFC (Log_{10}) de *Candida spp.*

Baseline	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T
5,19	2,90	2,96	4,64	1,91
4,92	5,72	4,98	5,37	5,11
4,44	4,54	4,12	4,11	4,10
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	1,32	0,00	0,00	0,00
5,35	5,01	1,61	3,08	4,73
5,94	2,70	3,21	2,66	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,79	5,23	6,08	4,47	2,91
1,32	1,32	2,72	1,61	4,06
2,91	3,89	4,19	3,50	3,60
6,34	4,76	4,40	4,73	4,56
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,13	3,66	4,03	3,31	4,05
2,15	3,44	3,31	2,76	2,30
4,83	4,02	4,24	4,15	3,95
0,00	0,00	0,00	4,08	3,51
5,65	0,00	4,27	3,73	4,05
3,64	2,30	4,25	4,26	3,58
0,00	0,00	0,00	3,16	1,79
2,15	2,76	2,00	2,15	2,00
6,43	4,70	4,25	2,15	3,65
5,42	4,13	1,32	3,74	3,58
5,09	4,13	3,75	3,35	3,55
6,40	3,66	5,19	5,63	6,69
3,82	2,83	2,94	3,70	3,42
5,43	5,28	4,85	5,44	6,25
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,48	3,53	3,76	3,23	3,02
4,47	3,66	3,43	4,55	4,05
3,45	3,72	3,75	2,53	0,00
5,20	4,96	5,21	5,96	4,92
4,49	5,05	4,89	4,34	4,71
5,45	4,69	4,71	5,00	4,67
5,34	5,03	5,61	4,59	4,60
5,68	5,26	5,28	4,82	5,30
5,42	5,23	4,67	3,45	3,83
0,00	0,00	0,00	0,00	2,58
2,15	4,20	3,57	4,26	4,69
3,87	2,21	2,99	3,44	2,00

Tabela 15 - Contagem das UFC (Log₁₀) de *S. mutans*.

Baseline	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T
3,477	2,507	0,000	0,000	0,000
3,580	4,408	4,358	5,301	2,303
3,681	2,624	3,380	3,260	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4,380	0,000	5,270	2,749	6,778
5,716	6,134	4,748	5,193	4,236
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,322	0,000	2,207	0,000	0,000
0,000	0,000	1,613	2,083	1,322
2,925	4,380	4,033	2,258	4,651
2,820	5,114	4,017	5,380	3,435
6,288	6,017	3,080	5,220	3,954
0,000	1,613	4,719	0,000	0,000
3,699	5,914	5,301	4,681	5,270
0,000	1,908	1,322	0,000	0,000
6,778	5,869	6,009	3,881	6,706
0,000	0,000	1,322	0,000	0,000
6,114	0,000	0,000	0,000	4,301
3,474	4,914	6,380	3,778	4,643
4,079	0,000	0,000	5,477	0,000
0,000	0,000	2,004	0,000	3,881
6,220	3,415	2,733	0,000	3,236
4,539	3,220	1,322	3,256	2,083
6,049	5,820	5,747	4,033	6,649
6,210	3,683	0,000	4,663	5,283
5,465	2,507	4,935	3,270	5,188
5,778	6,534	6,474	6,566	6,505
5,892	5,441	5,711	5,064	6,134
6,314	6,346	6,778	6,230	4,204
5,107	5,502	5,049	5,438	5,759
5,903	3,121	0,000	3,556	5,405
4,366	3,732	3,532	2,149	2,581
5,301	3,869	2,507	3,532	2,779
6,033	6,778	6,778	6,236	6,100
6,342	4,892	5,246	6,778	5,973
6,236	6,182	6,778	6,380	6,230
6,072	6,500	3,354	3,343	2,004
6,301	6,778	6,778	6,358	6,292
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5,369	4,716	5,575	5,412	6,422
4,107	2,764	4,188	3,653	2,955

Tabela 16 - Contagem das UFC (Log_{10}) do *S. aureus*.

Baseline	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T
2,258	1,908	1,613	1,785	0,000
1,322	1,908	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	2,004	1,613	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	1,322
1,613	0,000	1,613	0,000	1,322
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,322	0,000	0,000	0,000	0,000
1,785	0,000	0,000	2,558	0,000
0,000	0,000	2,083	0,000	0,000
1,785	0,000	0,000	2,004	0,000
2,004	3,398	3,009	0,000	2,717
1,613	0,000	2,083	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,613	0,000	1,322	0,000	1,908
0,000	0,000	0,000	1,785	0,000
2,207	1,785	0,000	0,000	2,149
2,344	0,000	0,000	1,322	1,322
3,256	2,624	3,505	2,603	1,322
0,000	0,000	1,322	0,000	0,000
2,417	0,000	2,083	1,613	1,908
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2,624	3,000	2,344	2,581	0,000
1,908	0,000	0,000	1,613	0,000
2,149	0,000	2,207	0,000	1,322
1,322	0,000	0,000	0,000	1,613
0,000	0,000	0,000	0,000	1,322
2,083	2,258	1,613	1,785	0,000
0,000	1,322	0,000	0,000	0,000
1,613	1,785	0,000	0,000	0,000
1,785	3,775	1,613	0,000	2,881
1,322	0,000	0,000	1,322	2,004
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,000	1,908	0,000	0,000	1,322
1,613	2,992	2,083	0,000	0,000
0,000	2,083	1,322	1,322	1,322
2,149	2,807	0,000	1,785	0,000
2,083	0,000	0,000	0,000	0,000
1,322	0,000	1,322	1,322	1,322
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,322	0,000	1,322	1,613	0,000
0,000	0,000	1,908	1,322	1,322

Tabela 17- Contagem das UFC (Log₁₀) das bactérias Gram-negativas

Baseline	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T
2,258	0,000	0,000	2,303	0,000
2,004	0,000	3,065	0,000	2,417
1,322	0,000	3,301	1,785	3,331
0,000	0,000	2,149	3,000	0,000
2,644	3,000	3,146	0,000	2,964
2,664	3,764	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	3,857	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	3,681	0,000
0,000	3,146	1,322	1,613	0,000
1,322	0,000	0,000	0,000	1,785
0,000	0,000	2,682	1,322	0,000
1,785	0,000	2,664	0,000	0,000
0,000	0,000	1,613	0,000	1,322
1,322	0,000	1,322	1,613	0,000
0,000	1,322	0,000	0,000	2,083
3,034	2,303	2,764	0,000	1,613
0,000	1,322	1,322	0,000	2,258
1,322	3,748	3,556	4,182	0,000
0,000	0,000	0,000	1,322	0,000
3,204	2,858	4,193	2,479	3,080
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,322	0,000	0,000	2,004	1,908
0,000	2,207	1,613	0,000	2,303
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,322	0,000	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3,000	3,778	2,417	1,322	0,000
3,301	2,974	3,450	1,908	1,322
0,000	1,613	0,000	0,000	1,785
2,083	0,000	0,000	0,000	1,613
0,000	0,000	0,000	1,322	0,000
1,908	0,000	0,000	0,000	2,749
1,613	2,004	0,000	0,000	3,327
2,004	2,258	3,327	2,417	2,764
2,207	0,000	0,000	1,322	1,613
1,785	2,083	2,764	1,613	1,322
2,935	3,350	0,000	0,000	0,000
3,670	2,344	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,000	1,322	3,094	2,764	0,000
2,149	0,000	1,322	0,000	2,558

A comparação da eficácia dos dentifrícios contra as espécies avaliadas (Teste de Friedman; $p < 0,05$) não indicou diferença na atividade antimicrobiana dos dentifrícios independente do microrganismo avaliado.

As tabelas 18, 19, 20 e 21 apresentam a estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente às espécies de *Candida*, *S. mutans*, *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-negativas, respectivamente, bem como os valores de p .

Tabela 18- Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente às espécies de *Candida*.

Descritiva	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T	p
Média	3,069	3,086	3,218	3,115	0,497
Desvio padrão	1,943	1,928	1,756	1,873	
Erro padrão	0,303	0,301	0,274	0,293	
Mínimo	0,000	0,000	0,000	0,000	
Máximo	5,720	6,080	5,960	6,690	
Mediana	3,660	3,750	3,500	3,580	
Intervalo de confiança	2,456	2,478	2,664	2,524	
	3,682	3,695	3,773	3,706	

Tabela 19- Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente ao *S. mutans*.

Descritiva	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T	p
Média	3,493	3,494	3,297	3,494	0,497
Desvio padrão	2,423	2,350	2,347	2,453	
Erro padrão	0,378	0,367	0,367	0,383	
Mínimo	0,000	0,000	0,000	0,000	
Máximo	6,778	6,778	6,778	6,778	
Mediana	3,732	4,017	3,556	3,954	
Intervalo de confiança	2,728	2,752	2,556	2,720	
	4,257	4,235	4,038	4,269	

Tabela 20- Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente ao *Staphylococcus aureus*.

Descritiva	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T	<i>p</i>
Média	0,818	0,887	0,730	0,693	0,845
Desvio padrão	1,220	1,044	0,922	0,894	
Erro padrão	0,191	0,163	0,144	0,140	
Mínimo	0,000	0,000	0,000	0,000	
Máximo	3,775	3,505	2,603	2,881	
Mediana	0,000	0,000	0,000	0,000	
Intervalo de confiança	0,433 1,203	0,558 1,217	0,439 1,021	0,410 0,975	

Tabela 21- Estatística descritiva da atividade antimicrobiana dos dentifrícios frente às bactérias Gram-negativas.

Descritiva	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T	<i>p</i>
Média	1,107	1,340	0,926	1,076	0,425
Desvio padrão	1,381	1,470	1,196	1,208	
Erro padrão	0,216	0,230	0,187	0,189	
Mínimo	0,000	0,000	0,000	0,000	
Máximo	3,778	4,193	4,182	3,331	
Mediana	0,000	1,322	0,000	0,000	
Intervalo de confiança	0,671 1,543	0,876 1,804	0,549 1,304	0,695 1,457	

As figuras 51, 52, 53 e 54 apresentam a comparação entre os dentifrícios para cada microrganismo avaliado.

Figura 51 - Comparação dos dentifrícios frente à espécie *Candida* (UFC). D1- Dentifrício de Triclosan; D2- Dentifrício Branco; D3- Dentifrício de *R. communis* e D4- Dentifrício de Cloramina-T.

Figura 52 - Comparação dos dentifrícios frente ao *S. mutans* (UFC). D1- Dentifrício de Triclosan; D2- Dentifrício Branco; D3- Dentifrício de *R. communis* e D4- Dentifrício de Cloramina-T.

Figura 53 - Comparação dos dentifrícios frente ao *Staphylococcus aureus* (UFC). D1- Dentifrício de Triclosan; D2- Dentifrício Branco; D3- Dentifrício de *R. communis* e D4- Dentifrício de Cloramina-T.

Figura 54 - Comparação dos dentifrícios frente às bactérias Gram-negativas (UFC). D1- Dentifrício de Triclosan; D2- Dentifrício Branco; D3- Dentifrício de *R. communis* e D4- Dentifrício de Cloramina-T.

As figuras B1 a B4 (Apêndice B) apresentam alguns exemplos do crescimento dos microrganismos coletados de um dos participantes de cada etapa do estudo.

4.2.3 Identificação das espécies de *Candida*

a) *Comparação dos dentifrícios para cada espécie de Candida identificada pelo Chromagar*

As tabelas 22, 23, 24 e 25 apresentam a mediana e IC das espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e outras espécies, respectivamente, para cada dentifrício experimental utilizado, bem como o resultado do teste de Friedman. Como pode ser observado, não houve diferença a significantes entre os dentifrícios, independente das espécies de *Candida* identificadas.

Tabela 22 - Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de *C. albicans* após a utilização dos dentifrícios.

Dentifrícios	Mediana	IC	<i>p</i>
Branco	4,069	3,268 – 4,226	0,466
<i>R. communis</i>	3,940	3,218 – 4,135	
Triclosan	3,602	3,169 – 3,884	
Cloramina-T	3,622	3,188 – 4,017	

Tabela 23 - Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de *C. tropicalis* após a utilização dos dentifrícios

Dentifrícios	Mediana	IC	<i>p</i>
Branco	3,535	0,533 – 6,360	0,562
<i>R. communis</i>	2,429	-0,663 – 5,159	
Triclosan	2,353	-0,717 – 4,951	
Cloramina-T	3,085	1,344 – 4,568	

Tabela 24 - Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de *C. glabrata* após a utilização dos dentifrícios

Dentifrícios	Mediana	IC	<i>p</i>
Branco	2,602	0,840 – 3,472	0,338
<i>R. communis</i>	3,422	2,389 – 4,144	
Triclosan	3,322	2,417 – 3,979	
Cloramina-T	3,380	2,021 – 4,150	

Tabela 25 - Comparação das contagens de UFC (Mediana e IC) de outras espécies de *Candida* após a utilização dos dentifrícios

Dentifrícios	Mediana	IC	<i>p</i>
Branco	2,342	0,798 – 3,982	0,200
<i>R. communis</i>	3,415	0,930 – 4,842	
Triclosan	4,778	1,811 – 5,871	
Cloramina-T	4,146	2,099 – 5,970	

As figuras 55, 56, 57 e 58 apresentam a comparação entre os dentifrícios para as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e outras espécies não identificadas, respectivamente.

Figura 55 - Comparação dos dentifrícios frente à espécie *C. albicans*. D1- Triclosan; D2- Branco; D3- *R. communis*; e D4- Cloramina-T.

Figura 56 - Comparação dos dentifrícios frente à espécie *C. tropicalis*. D1- Triclosan; D2- Branco; D3- *R. communis*; e D4- Cloramina-T.

Figura 57 - Comparação dos dentifrícios frente à espécie *C. glabrata*. D1- Triclosan; D2- Branco; D3- *R. communis*; e D4- Cloramina-T.

Figura 58 - Comparação dos dentifrícios frente a outras espécies de *Candida*. D1- Triclosan; D2- Branco; D3- *R. communis*; e D4- Cloramina-T.

b) Comparação das espécies de *Candida* identificadas pelo Chromagar e PCR

Na tabela 26 encontra-se o resultado da confirmação da identificação das espécies de *Candida*. Pode-se observar que houve correspondência na identificação das espécies de *C. albicans*, *C. Tropicalis* e *C. glabrata*, no entanto o ensaio de PCR permitiu a identificação de mais espécies.

Tabela 26- Comparação dos métodos de identificação das espécies de *Candida*.

Espécies identificadas	Identificação em PCR (%)	Identificação em ChromAgar (%)
<i>C. albicans</i>	n = 31 (40,79)	n = 32 (42,10)
<i>C. tropicalis</i>	n = 18 (23,68)	n = 19 (25,00)
<i>C. glabrata</i>	n = 14 (18,42)	n = 13 (17,10)
<i>C. norvegensis</i>	n = 1 (1,31)	n = 0 (0)
<i>C. dubliniensis</i>	n = 3 (3,95)	n = 0 (0)
Outras espécies	n = 9 (11,84)	n = 12 (15,79)
TOTAL	76	76

4.2.4 Avaliação dos dentifrícios pelos participantes da pesquisa

Na tabela 27 encontram-se os valores de *p* indicados pelo teste de Cochran para a comparação dos dentifrícios em cada uma das perguntas da pesquisa de satisfação. Não houve diferença estatística significativa entre eles para nenhuma das questões.

Tabela 27- Resultado do questionário de satisfação do paciente e valor de p para cada questão.

Dentifrícios	Questão 1		Questão 2		Questão 3		Questão 4		Questão 5		Questão 6		Questão 7		Questão 8		Questão 9	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
D2	40	1	36	5	10	31	40	1	38	3	40	1	40	1	38	3	39	2
D3	41	0	34	7	6	35	41	0	32	9	38	3	38	3	38	3	38	3
D1	40	1	37	4	3	38	41	0	36	5	37	4	39	2	39	2	39	2
D4	41	0	37	4	5	36	41	0	36	5	40	1	40	1	39	2	39	2
Valor de p	0,572		0,651		0,690		0,392		0,143		0,190		0,532		0,881		0,896	

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O biofilme bucal se caracteriza como uma comunidade microbiológica variada e organizada, na qual bactérias, fungos, protozoários e vírus (Rozen et al., 2001) se interagem produzindo metabólitos que servem como nutrientes ou fonte de energia, e eliminando substâncias com potencial tóxico do ambiente (Azevedo e Cerca, 2012).

Dentre os microrganismos que compõem o biofilme bucal de indivíduos desdentados podemos destacar as espécies de *Candida* por apresentarem capacidade de adesão em células do hospedeiro e em superfícies abióticas. Esta característica pode ser exacerbada por fatores como idade avançada, longo período de uso de próteses totais e parciais, porosidade do material protético e o uso noturno das próteses totais, uma vez que estes propiciam o acúmulo de biofilme (Azevedo e Cerca, 2012) e pode favorecer a instalação de Candidíase Atrófica Crônica.

A manutenção da saúde bucal, a prevenção de doenças bucais e a maior longevidade dos aparelhos protéticos são fatores obtidos com o controle do biofilme e o uso adequado de produtos de higiene bucal e protética. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar três dentifrícios experimentais específicos para higiene de próteses totais, com o intuito de unir o método de higienização mais difundido entre os usuários de próteses e de menor custo (Peracini et al., 2010), ou seja a escovação com o método químico, por meio da adição de agentes antimicrobianos aos dentifrícios.

Foram idealizados e formulados três dentifrícios experimentais com diferentes agentes antimicrobianos (*Ricinus communis*, Triclosan e Cloramina-T), cuja seleção foi baseada na disponibilidade da matéria prima no país e nos resultados de eficácia conhecidos. O *R. communis* é um agente natural e abundante em nosso país, que quando empregado na forma de éster do ácido ricinoléico apresenta atividade antimicrobiana (Ito et al., 1999; Leite et al., 2014). Os outros dois agentes são conhecidos no mercado como o Triclosan, utilizado no dentifrício da Colgate Total 12 (Colgate-Palmolive Divisão da Kolynos do Brasil, Osasco, SP, Brasil) e a Cloramina-T no dentifrício Trihydral (Perland Pharmacos Ltda, Cornélio Procopio, PR, Brasil), e apresentam resultados importantes no controle da microbiota.

A formulação de um dentifrício é complexa, uma vez que apresenta inúmeros ingredientes, cada qual com sua função e com certo grau de influência uns sobre os outros (Stovell et al; 2013). Essa influência pode ser desde a redução ou inibição da função de componentes (Moran et al., 2001) até ao aumento da substantividade e atividade clínica (Kjaerhein et al., 1994; Waaler et al., 1994). Sendo assim, a avaliação das características físico-químicas torna-se importante.

5.1 Análises *in vitro*

Segundo Pader (1993), a qualidade organoléptica de um produto bucal é um dos fatores importantes na motivação do seu uso, bem como na adesão dos indivíduos aos hábitos de higiene bucal. Foram avaliadas as características organolépticas dos dentifrícios experimentais, por meio da análise do aspecto, cor, odor e sabor, por um período total de 90 dias. Nenhum dos dentifrícios experimentais apresentou alteração em suas características, com exceção do dentifrício de *R. communis*. Este apresentou estabilidade em seu aspecto durante os 90 dias, porém a cor manteve-se estável até 30 dias quando apresentou alterações que continuaram até 60 dias, tornando-se estável novamente. Também, apresentou alteração do odor, com acentuação do cheiro característico do *R. communis* até 30 dias, apresentando posterior estabilidade. O sabor sofreu alteração até o período de 15 dias, alcançando também estabilidade depois. Essas alterações podem estar relacionadas com a possibilidade do éster do ácido ricinoléico não se estabilizar na formulação, havendo a necessidade de alterações na fórmula. As alterações resultantes podem ser classificadas como extrínsecas (quando causadas por fatores externos) ou intrínsecas (causadas por fatores da própria formulação) (Brasil-Anvisa, 2004). Como todos os dentifrícios foram submetidos às mesmas condições externas, podemos supor que estas alterações sejam intrínsecas ao princípio ativo. Uma hipótese é a de que tenha havido uma reação de hidrólise, uma vez que o éster do ácido ricinoléico em presença de água pode provocar reação de hidrólise (Brasil-Anvisa, 2004).

Quanto à análise da densidade aparente, todos os dentifrícios apresentaram densidades semelhantes (Tabela 6) e não há na literatura valores ideais recomendados. Esta propriedade está relacionada com a dispensação do produto quando da sua utilização, bem como com a veiculação dos princípios ativos. Pode ser considerada a propriedade que auxilia na determinação da “dose” do produto (Pedrazzi et al., 1999), ou seja, dentifrícios com baixa densidade precisaria de um volume maior, para que tivesse uma mesma ação, quando comparado a um dentifrício com alta densidade. Com base em nossos resultados, o uso dos dentifrícios estudados deve ser indicado em dosagens semelhantes.

Com relação aos valores de pH, os resultados indicaram pH levemente ácido para o dentifrício Branco (6,33) e de Triclosan (6,12) e pH alcalino para os dentifrícios de *R. communis* e de Cloramina-T (Tabela 6). De acordo com Pedrazzi et al. (1999), produtos com sílicas apresentam pH levemente ácido. Porém, todos os dentifrícios tiveram uma mesma formulação variando somente os agentes antimicrobianos, sendo assim, uma hipótese para essa diferença pode estar na interação dos agentes antimicrobianos com os demais

componentes da formulação. Segundo Alves et al. (2007), a obtenção de dentifrícios com pH alcalino seria o ideal, uma vez que favorece o controle do pH da cavidade bucal, proporcionando um ambiente não favorável para as bactérias acidúricas formadoras de biofilme. Um dentifrício com pH ácido pode potencializar a ação abrasiva da escovação e, conseqüentemente causar mais danos à superfície dos aparelhos protéticos (Alves et al., 2007). Relacionando estes achados com o ensaio de rugosidade, não encontramos relação entre os resultados, uma vez que os dentifrícios não causaram diferença significativa na rugosidade dos espécimes.

Quanto à consistência, não existe um valor ideal e esta propriedade está relacionada à sensação e julgamento dos usuários do produto. No entanto, segundo Stovell et al. (2013) os dentifrícios devem apresentar uma consistência equilibrada, no que diz respeito à facilidade de remoção do produto de sua embalagem para a escova, bem como sua manutenção sem escoar ou cair da mesma. Pader (1993) afirma a relação da consistência com a viscosidade e a tixotropia, relatando que a tixotropia é a alteração da consistência dependente do tempo por meio do aumento da viscosidade de uma amostra em repouso, após ser submetida a uma força. O dentifrício de Cloramina-T apresentou a menor consistência, sendo que os demais não apresentaram grandes diferenças de valores entre si. No entanto, com base em nossa percepção e comparação, como usuários, de dentifrícios disponíveis no mercado, para nós todos os dentifrícios apresentaram uma consistência baixa. Segundo Pader (1993), o agente abrasivo age também como um agente espessante, sendo assim, uma hipótese para a obtenção da consistência baixa, esteja no fato de termos diminuído a quantidade de agente abrasivo, geralmente utilizada nas formulações de dentifrícios, com o objetivo de obtermos um produto menos abrasivo. Cabe ressaltar, porém que, apesar destas observações, os usuários gostaram dos dentifrícios e a consistência baixa pode ter colaborado com o espalhamento dos mesmos sobre a superfície da prótese.

A análise reológica avalia o comportamento dos dentifrícios, ou seja, a capacidade de alteração de sua viscosidade, diminuindo-a quando submetido a uma força externa e recuperando-a após cessar a força (Pader, 1993; Pereira e Silva, 2000; Panzeri et al., 2009). A viscosidade é a propriedade que caracteriza um produto por meio de sua capacidade de resistir ao escoamento (Pereira e Silva, 2000) e está relacionada com a percepção do usuário. A alteração da viscosidade pode ser observada pelas curvas ascendentes e descendentes dos gráficos do ensaio de reologia, as quais, em nosso estudo, indicaram que os dentifrícios apresentaram comportamento tixotrópico, porém com uma reorganização estrutural rápida, observada por meio da quase sobreposição das curvas em alguns pontos (Pereira e Silva,

2000). Podemos considerar que os dentifrícios experimentais apresentaram baixa viscosidade quando submetidos à força de cisalhamento, a qual associada à consistência obtida pode representar uma vantagem, de acordo com a proposta de especificidade dos dentifrícios experimentais, uma vez que podem facilitar a remoção do produto da embalagem e seu espalhamento sobre a superfície dos aparelhos protéticos.

Ainda, o estudo da reologia nos fornece a área de histerese, ou seja, área entre as curvas ascendente e descendente, a qual é estabelecida como a energia necessária para a quebra da estrutura em rede. Por meio desta desestruturação da formulação é possível obtermos a ação dos princípios ativos. Quanto maior a desorganização, maior a liberação dos princípios ativos dos produtos, ou seja, quanto maior a área de histerese maior será a liberação (Pereira e Silva, 2000). Os dentifrícios experimentais apresentaram área de histerese entre $0,34 \text{ cm}^2$ e $1,76 \text{ cm}^2$, sendo que o dentifrício de Triclosan foi o que apresentou a maior área, quando comparado aos demais, e isto deve ter favorecido a liberação do princípio ativo, uma vez que apresentou os melhores resultados na avaliação da atividade antimicrobiana. Isso nos permite supor que alguns ajustes na formulação dos dentifrícios possa aumentar a área de histerese para que os dentifrícios tenham uma maior liberação do princípio ativo e, consequentemente, uma maior atividade antimicrobiana.

Para a avaliação da abrasividade foi empregado somente o método de análise da rugosidade superficial. Foi possível observar o efeito abrasivo dos dentifrícios, quando comparados ao grupo controle (água), no entanto não houve diferença estatística significativa entre eles, embora o dentifrício experimental Branco e de Triclosan tenham apresentado pH ácido, como citado anteriormente. Quando comparamos a abrasividade dos dentifrícios comerciais aos valores obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que os dentifrícios experimentais apresentam uma abrasividade mais baixa. O estudo de Sorgini et al. (2012) permite essa comparação, uma vez que ao avaliarem a abrasividade empregaram o mesmo método (avaliação por meio da rugosidade), mesmo tempo de escovação (250 min) e tipo de espécime (Plex glass). Os autores encontram valores de rugosidade entre 10,4 e 17,4 (Ra). A baixa abrasividade diminui o risco de danos ao material dos aparelhos protéticos, além disso, uma superfície mais polida ou menos rugosa facilita a manutenção da limpeza e diminui a retenção de biofilme (Sexton e Phillips, 1951). No entanto, os dentifrícios experimentais apresentaram valores de rugosidade ligeiramente acima do que é clinicamente aceitável ($0,2 \mu\text{m}$) (Bollen et al., 1997). Porém, de acordo com Sexton e Phillips (1951) o movimento das escovas, no ensaio de escovação por meio da máquina artificial, é realizado sempre em uma mesma área e isso pode promover sulcos ou riscos maiores e/ou mais profundos, ou seja,

maior abrasão quando comparado à escovação realizado por um indivíduo, uma vez que os movimentos realizados, por este, na escovação são amplos e envolvem toda a área da prótese.

Segundo Pisani et al. (2010b) os métodos de análise da abrasividade utilizado com maior frequência são o gravimétrico (alteração do peso), rugosidade superficial, radiação e microscopia eletrônica. Liljebog et al. (2010) ressaltam a importância de realizar análises quantitativa e qualitativa. Talvez uma limitação deste estudo, tenha sido não ter realizado o ensaio gravimétrico, uma vez que este permite classificar a abrasividade em alta, baixa ou média. Bem como uma análise qualitativa, como microscopia eletrônica que pode fornecer uma imagem detalhada da rugosidade da superfície dos espécimes.

Para a análise antimicrobiana *in vitro* foi empregado o método de formação de biofilme multiespécies sobre resina acrílica, por meio de agitação (Panariello, 2013). A escolha deste protocolo teve o intuito de realizar um ensaio mais próximo à realidade, uma vez, que o biofilme é composto por vários microrganismos vivendo em comunidade (Palmer e White, 1997).

Os resultados indicaram que o dentifrício de Triclosan apresentou a maior atividade contra as espécies de *Candida* e a água, a menor efetividade, com o maior número de UFC. Os dentifrícios de Cloramina-T, *R. communis* e Branco apresentaram valores intermediários, sendo o de Cloramina T mais eficiente que os demais. Contra *S. mutans*, os dentifrícios Branco, de *R. communis* e de Cloramina-T apresentaram ação semelhante entre si e diferente da água. O dentifrício de Triclosan foi 100% efetivo, ou seja, não houve aparecimento de UFC para este grupo. O *Ricinus communis* tem sido estudado na odontologia quanto ao seu potencial antimicrobiano e característica de biocompatibilidade na área de endodontia (Pascon et al., 2000; Leonardo et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Medici and Fröner, 2006; Meneghin et al., 2006; Camargo et al., 2010), na área de cirúrgica (Barros et al., 2003; Boëck-Neto et al., 2005) e na área de higiene protética como solução higienizadora (Pisani et al., 2012; Salles, 2013; Andrade et al., 2014), dentifrício (Leite et al., 2014) e também, para o controle da Estomatite de Dentadura (Badaró, 2013; Pinelli et al., 2013), apresentando resultados favoráveis. Não se encontra muito bem estabelecido, na literatura, qual o meio de ação do *R. communis* sobre as bactérias e leveduras, mas há a hipótese de que o éster do ácido ricinoléico atua transferindo água para as molécula de glicose com a consequente ruptura da ligação glicosídica (hidrólise) e morte celular da bactéria (Messetti et al., 2010). Takano et al. (2007) relata a possibilidade da associação da ação do detergente do éster do ácido ricinoléico com danos à parede de fungos fitopatogênicos e consequente morte celular, por meio de perda de componentes do citoplasma.

O Triclosan, segundo o levantamento bibliográfico realizado por Torres et al. (2000), se comporta como um agente antimicrobiano de amplo espectro, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos. É muito empregado na Odontologia como componente em dentifrícios e colutórios (Torres et al., 2000; Prasanth et al., 2011). Esse agente antimicrobiano age sobre os microrganismos desorganizando suas membranas e causando inibição de enzimas inespecíficas das membranas levando à morte celular (Torres et al., 2000; Ciancio, 2010). Embora seja muito estudado para uso em indivíduos dentados, não há relatos quanto seus efeitos sobre o biofilme de próteses totais, bem como sobre a resina acrílica.

A Cloramina-T é um composto clorado aniônico capaz de causar a morte celular dos microrganismos por apresentar reações de oxidação e hidrólise de proteínas (Arnitz et al., 2009; Tirapelli et al., 2010). Os íons de oxigênio e cloro liberados durante a reação de oxidação reagem com a matéria orgânica de bactérias Gram-positivas e negativas, fungos, leveduras na sua forma esporulada, micobactérias e até vírus (Tirapelli et al., 2010).

A ação do dentifrício Branco pode ser atribuída à ação mecânica da escovação e a presença do tensoativo, Lauril sulfato de sódio. O Lauril sulfato de sódio apresenta atividade antimicrobiana, provocando a lise da bactéria por meio do deslocamento do citoplasma da parede celular e dissolução de partes da membrana plasmática (Pader, 1993; Randall et al., 2014).

5.2 Análises *in vivo*

As análises *in vivo* buscaram verificar a capacidade dos dentifrícios em remover o biofilme, bem como verificar sua atividade antimicrobiana contra *Candida spp*, *Strptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-negativas. Os resultados não indicaram diferença significativa entre os dentifrícios, quanto a sua capacidade de remoção de biofilme, bem como sua atividade antimicrobiana.

Com relação à capacidade de remoção do biofilme, os resultados podem ser explicados pela presença do componente tensoativo em todas as formulações, cujas funções são formar espuma o que facilita o espalhamento do produto sobre a superfície, alterar a superfície diminuindo a tensão superficial (Pader, 1993) e promover a remoção de matéria orgânica da superfície (Moore e Addy, 2005). Há ainda a ação mecânica da escovação.

Comparando o efeito da escovação, independente do dentifrício utilizado, com o “Baseline”, pode observar nos gráficos de frequência (Figuras 45 a 49) que houve uma migração da condição dos participantes que apresentavam porcentagens de biofilme

superiores a 30% e, em alguns casos superiores a 20%, para porcentagens menores, de 0 a 20%, após o uso dos dentifrícios experimentais. Tal resultado pode ser explicado pela motivação dos participantes em seguir o protocolo estabelecido e por estarem usando um produto específico para seu aparelho protético.

Analisando os gráficos boxplot (Figuras 51 a 54) da avaliação da atividade antimicrobiana dos dentifrícios, podemos observar que para as espécies de *Candida* o dentifrício Branco, apesar de ter apresentado uma dispersão maior de dados, 50% dos dados apresentaram valores de Log_{10} menor que os demais dentifrícios. Este resultado não era esperado em função da não adição de um agente antimicrobiano específico em sua composição. No entanto, pode-se levantar uma hipótese de que a presença do tensoativo Lauril sulfato de sódio, devido a sua forte ação detergente, tenha atuado na redução da tensão superficial, proporcionando dificuldade de adesão dos microrganismos. Além disso, este tensoativo apresenta atividade antimicrobiana, segundo o estudo realizado por Pader (1993) e Randall et al. (2014).

Para o *S. mutans*, podemos observar que o dentifrício de Triclosan apresentou uma maior dispersão de dados e 50% da amostra apresentou os menores valores de UFC, quando comparado aos demais dentifrícios (Figura 52). Isto confirma sua ação contra bactérias Gram-positivas (De Rossi et al., 2014).

No gráfico do *S. aureus*, o dentifrício de Cloramina-T apresentou a menor dispersão de dados e 50% dos dados centrais da amostra apresentaram os menores valores de UFC, quando comparado aos demais dentifrícios. No entanto, ele apresentou o valor máximo maior que o dentifrício de Triclosan. Em um estudo realizado por Arnitz et al. (2009), cujo objetivo foi avaliar a ação bactericida (*E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e fungicida (*A. fumigatus*, *A. flavus* e *C. albicans*) da Cloramina-T e da Monocloramina, os autores obtiveram como resultado para a Cloramina-T a seguinte ordem de suscetibilidade dos microrganismos avaliados: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. fumigatus* e *A. flavus*. Embora não tenha havido diferença estatística entre os dentifrícios, no presente estudo, o dentifrício de Cloramina-T apresentou menor contagem de UFC.

Para as bactérias Gram-negativas, pode ser observada no gráfico, a menor dispersão dos dados do dentifrício de Triclosan, bem como seu menor valor do terceiro quartil. Isso nos permite dizer que embora, não tenha havido diferença estatística o dentifrício de Triclosan em 50% dos dados centrais da amostra apresentou as menores contagens de UFC. De acordo com a revisão de Torres et al. (2000) sobre agentes antimicrobianos e sua aplicação na odontologia, o Triclosan apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas.

Comparando os resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* dos dentifrícios, pode ser observada uma diferença nas atividades dos dentifrícios entre si. *In vitro*, os dentifrícios apresentaram atividade diferente contra as espécies de *Candida*, enquanto *in vivo* não. Segundo Haraszthy et al. (2010) um agente antimicrobiano pode não apresentar a mesma atividade *in vitro* e *in vivo*. Os microrganismos, quando em comunidade, apresentam-se mais resistentes em função da presença da matriz que dificulta a entrada dos agentes antimicrobianos e em função das relações harmônicas entre si, tais como sociedade, colônia, mutualismo e protocooperação (Azevedo e Cerca, 2012). Embora a avaliação antimicrobiana *in vitro* tenha sido realizada por meio da formação de biofilme multiespécie (*S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*) o biofilme *in vivo* ainda é mais complexo, o que nos sugere uma resistência maior. Outra hipótese para essa diferença pode estar no tempo de maturação do biofilme. Na formação *in vitro* a maturação foi de 48 horas, enquanto que na cavidade bucal temos um tempo superior a esse, o que pode conferir maior resistência deste *in vivo*.

Com o objetivo de avaliar se os dentifrícios apresentariam maior ou menor efetividade contra as diferentes espécies de *Candida*, foi realizada a identificação das mesmas após o uso dos dentifrícios através do meio de cultura *Chromagar*. Não foi encontrada diferença significativa no número de UFC para cada espécie de *Candida* em função dos dentifrícios. No entanto, pode-se observar que o dentifrício de Triclosan apresentou 50% de sua amostra com os menores valores de contagem de UFC de *C. albicans*. (Figura 55).

Para as espécies de *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Figuras 56 e 57, respectivamente), o dentifrício Branco apresentou a maior dispersão dos dados, bem como 50% da amostra apresentou os menores valores de contagem de UFC. As leveduras apresentam grande capacidade de adesão em superfícies abióticas, como os aparelhos protéticos (Azevedo e Cerca, 2012). Uma hipótese para esse resultado pode ser baseada na ação detergente do tensoativo, Lauril sulfato de sódio, capaz de dificultar a adesão destas espécies de *Candida*. Além disso, os fungos apresentam inúmeras adesinas responsáveis pela adesão dos mesmos às superfícies. As adesinas são variáveis entre as espécies de *Candida* (de Groot et al., 2013) e talvez haja, também, diferença de suscetibilidade das adesinas à ação dos tensoativos.

No gráfico de identificação de outras espécies de *Candida* (Figura 58), podemos observar uma maior dispersão dos dados e os menores valores de contagem de UFC para o dentifrício de Triclosan, o que comprova sua ação contra fungos (Bhargava e Leonard, 1996; Torres et al., 2000).

Com o ensaio de PCR, buscou-se apenas confirmar a identificação das *Candidas* pelo ChromAgar e pode-se observar por meio da tabela 26, que não houve grande diferença entre as técnicas de identificação. Porém, a técnica da PCR proporciona a identificação de um número maior de espécies. Foi possível observar uma maior prevalência de algumas espécies, alguns autores encontraram as espécies de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* como sendo as mais prevalentes (Paranhos et al., 2000; 2013), semelhante ao presente estudo.

Ao final do uso de cada dentifrício experimental, um questionário de avaliação dos dentifrícios foi respondido pelos participantes com base nos estudos de Salles et al. (2007) e Badaró (2013). Não houve diferença estatística significativa entre os dentifrícios experimentais, de acordo com as respostas dadas pelos participantes. Na tabela 27 pode ser observado que a maioria das respostas foi favorável, o que nos permite dizer que os dentifrícios experimentais apresentaram características satisfatórias no que diz respeito à percepção dos usuários. Este resultado é importante uma vez que a aceitação do método proposto é de extrema importância para a real adesão a qualquer protocolo de higiene ou de tratamento.

No entanto, ajustes na formulação dos dentifrícios se fazem necessários com ao objetivo de melhorar seu comportamento tixotrópico, área de histerese e com isso maximizar a atividade antimicrobiana.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

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

1. Os dentifrícios experimentais apresentaram estabilidade quanto as características organolépticas, embora o dentifrício de *Ricinus communis* tenha apresentado sabor e odor, e cor característicos ao agente antimicrobiano, após 15 e 30 dias, respectivamente;
2. As características físico-químicas dos dentifrícios podem ser consideradas satisfatórias;
3. Em relação à rugosidade de superfície, pode-se considerar que os dentifrícios apresentaram menor abrasividade;
4. Na avaliação *in vitro*, o dentifrício de Triclosan apresentou maior eficácia antimicrobiana contra as espécies de *Candida* e *S. mutans*;
5. Na avaliação *in vivo*, todos os dentifrícios apresentaram capacidade de remoção do biofilme e atividade antimicrobiana, semelhantes;
6. Os dentifrícios apresentaram atividade antimicrobiana semelhante frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*;
7. Com a confirmação pela PCR pode-se dizer que neste estudo, as espécies de *Candida* mais encontradas foram: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente;
8. Os dentifrícios experimentais apresentaram-se satisfatórios quanto à percepção dos participantes.

Os dentifrícios experimentais apresentaram grande potencial para uso na higienização de próteses totais.

REFERÊNCIA

REFERÊNCIAS

1. Almeida VG, Trein MP, Oppermann RV, Rösing CK. In situ biofilm formation on enamel and glass ionomer cement in different oxygen tensions. *Rev Odonto Ciênc.* 2008; 23(1):48-52.
2. Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res.* 2007;41(4):263-7.
3. AmbjØrnsen E, Valderhaug J, Norhem, P; Floystrand, F. Assessment of an additive index for plaque accumulation on complete maxillary dentures. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(4):203-8.
4. Andrade IM, Andrade KM, Pisani MX, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Paranhos Hde F. Trial of an experimental castor oil solution for cleaning dentures. *Braz Dent J.* 2014;25(1):43-7.
5. 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.
6. 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.
7. Arnitz R, Nagl M, Gottardi W. Microbicidal activity of monochloramine and chloramines T compared. *J Hosp Infect.* 2009;73(2):164-70.
8. Azevedo NF, Cerca N. *Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria.* 1ª Ed. Porto, Portugal: Publindústria, 2012. 396 p.
9. Badaró MM. Avaliação clínica e laboratorial de uma solução experimental à base de *Ricinus communis* em comparação ao hipoclorito de sódio para higiene de próteses totais [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2013. 140 p.
10. Barros VM, Rosa AL, Beloti MM, Chierice G. In vivo biocompatibility of three different chemical compositions of *Ricinus communis* polyurethane. *J Biomed Mater Res A.* 2003;67(1):235-9.

11. Bertoletti ACD. Ação biocida do Poliquilgerm® derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona) sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica. [Dissertação]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2008. 74p.
12. Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control*. 1996;24(3):209-18.
13. Boëck-Neto RJ, Gabrielli MF, Shibli JA, Marcantonio E, Lia RC, Marcantonio E Jr. Histomorphometric evaluation of human sinus floor augmentation healing responses to placement of calcium phosphate or *Ricinus communis* polymer associated with autogenous bone. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005;7(4):181-8.
14. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997;13(4):258-69.
15. Brasil, Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010. Brasília 2011.
16. 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.
17. 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.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 33, de 19 de abril de 2000. Brasília: ANVISA; 2000.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA; 2007.
20. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent*. 1979;42(6):619-23.
21. Budtz-Jørgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974; 82(2):151-190.
22. Cakan U, Kara O, Kara HB. Effects of various denture cleansers on surface roughness of hard permanent relined resins. *Dent Mater J*. 2015 Feb 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25740306.

23. Camargo SE, Rode Sde M, do Prado RF, Carvalho YR, Camargo CH. Subcutaneous tissue reaction to castor oil bean and calcium hydroxide in rats. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(3):273-8.
24. Ciancio S, Panagakos FS. Superior management of plaque and gingivitis through the use of a Triclosan/copolymer dentifrice. *J Clin Dent.* 2010; 21(4):93-5.
25. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *J Mol Diagn.* 2011;13(1):12-22.
26. Council on Dental Materials, Instruments, and Equipment. Denture cleansers. *J Am Dent Assoc.* 1983;106(1):77-9.
27. Dametto FR, Adabo GL, Cruz CAS, Vaz LG, Chierice GO. Evaluation of different dentin cleaning solutions by scaling electronic microscopy. *Rev ABO Nac.* 2001;9(4):233-7.
28. de Castellucci Barbosa L, Ferreira MR, de Carvalho Calabrich CF, Viana AC, de Lemos MC, Lauria RA. Edentulous patients' knowledge of dental hygiene and care of prostheses. *Gerodontology.* 2008;25(2):99-106.
29. de Freitas KM, Paranhos HF. Weight loss of five commercially available denture teeth after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(4):242-6.
30. de Groot PW, Bader O, de Boer AD, Weig M, Chauhan N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell.* 2013;12(4):470-81.
31. De Rossi A, Ferreira DC, da Silva RA, de Queiroz AM, da Silva LA, Nelson-Filho P. Antimicrobial activity of toothpastes containing natural extracts, chlorhexidine or Triclosan. *Braz Dent J.* 2014;25(3):186-90.
32. DiBardino DM, Wunderink RG. Aspiration pneumonia: a review of modern trends. *J Crit Care.* 2015;30(1):40-8.
33. Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent.* 1988;60(4):467-70.
34. Edgerton M, Levine MJ. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent.* 1992;68(4):683-91.

35. Edgerton M, Levine MJ. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent*. 1992;68(4):683-91.
36. Ercalik-Yalcinkaya S, Ozcan M. Association between oral mucosal lesions and hygiene habits in a population of removable prosthesis wearers. *J Prosthodont*. 2014 Sep 17. doi: 10.1111/jopr.12208. [Epub ahead of print].
37. Felipucci DN, Davi LR, Paranhos HF, Bezzon OL, Silva RF, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the surface of removable partial denture. *Braz Dent J*. 2011;22(5):392-7.
38. Ferreira CM, da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J*. 2002;13(2):118-22.
39. Haraszthy VI, Zambom JJ, Sreenivasan PK. Evaluation of the antimicrobial activity of dentifrices on human oral bacteria. *J Clin Dent*. 2010;21(4):96-100.
40. Harrison Z, Johnson A, Douglas CWI. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. *J Oral Rehabil*. 2004;31(5):460-7.
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. Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*. 2000;28(2):184-96.
45. Keng SB, Lim M. Denture plaque distribution and the effectiveness of a perborate-containing denture cleanser. *Quintessence Int*. 1996;27(5):341-5.
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, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil.* 2002;29(3):300-4.
48. Kumar S, Patel S, Tadakamadla J, Tibdewal H, Duraiswamy P, Kulkarni S. Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and Triclosan compared with chlorhexidine and Triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining. *Int J Dent Hyg.* 2013;11(1):35-40.
49. Lee HE, Wang CC, Wang JC, Chen CP. The effect of denture cleansers and cleaning methods on the microflora of denture plaque. *Gaoxing Yi Xue Ke Xue Za Zhi.* 1985;1(2):88-94.
50. Leite VM, Pinheiro JB, Pisani MX, Watanabe E, de Souza RF, Paranhos HF, Lovato-Silva CH. In vitro antimicrobial activity of an experimental dentifrice based on *Ricinus communis*. *Braz Dent J.* 2014;25(3):191-6.
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, da Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod.* 2001;27(12):717-9.
53. Liljeborg A, Tellefsen G, Johannsen G. The use of a profilometer for both quantitative and qualitative measurements of toothpaste abrasivity. *Int J Dent Hyg.* 2010;8(3):237-43.
54. 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.
55. Medici CM, Fröner IC. A scanning electron microscopic evaluation of different root canal irrigation regimens. *Braz Oral Res.* 2006;20(3):235-40.
56. 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.
57. 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.

58. Ministério da Saúde. Sb Brasil 2010 - Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Principais resultados. 2011.
59. Modéer T, Bengtsson A, Rölle G. Triclosan reduces prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 in vitro. *J Clin Periodontol*. 1996;23(10):927-33.
60. Moore C, Addy M. Wear of dentine in vitro by toothpaste abrasives and detergents alone and combined. *J Clin Periodontol*. 2005;32(12):1242-6.
61. 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.
62. Mustafa M, Wondimu B, Yucel-Lindberg T, Kats-Hallström AT, Jonsson AS, Modéer T. Triclosan reduces microsomal prostaglandin synthase-1 expression in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol*. 2005;32(1):6-11.
63. Nasri F. The aging population in Brazil. *Einstein*. 2008;6(Supl 1):S4-S6.
64. Neill DJ. A study of materials and methods employed in cleaning dentures. *Br Dent J*. 1968;124(3):107-15.
65. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. *Int J Prosthodont*. 2003;16(6):616-20.
66. 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.
67. Pader M. Oral Hygiene Products and Practice. New York: Marcel Decker, 1993.
68. Palmer RJ Jr, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol*. 1997;5(11):435-40.
69. Panariello BHD. Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução da viabilidade de biofilme multiespécies. Dissertação (Mestrado). Araraquara: UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara. 2013. 84 p.
70. 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.

71. Paranhos Hde F, Salles AE, Macedo LD, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Watanabe E. Complete denture biofilm after brushing with specific denture paste, neutral soap and artificial saliva. *Braz Dent J.* 2013;24(1):47-52.
72. Paranhos HFO, Bezzon OL, Davi LR, Felipucci DN, Silva CH, Pagnano VO. Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. *Braz Oral Res.* 2014;28(1):1-7.
73. 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.* 2000;11(2):97-104.
74. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture bifilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(8):606-12.
75. 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.
76. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. Comparative study of methods for the quantification of biofilm on complete dentures. *Braz Oral Res.* 2004;18(3):215-23.
77. Pascon EA, Souza CJA, Langeland K. Biocompatibilidade de materiais endodônticos. Citotoxicidade da resina poliuretana derivada do óleo de mamona-Parte 1. *Rev. ABO Nac.* 2000; 8(4):238-250.
78. Pedrazzi V, Lara EHG, Panzeri H. Sílica em dentifrícios: aspectos físicos e físico-químicos. *Cosmet toiletries.* 1999;11:66-9.
79. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J.* 2012;23(5):547-54.
80. Peracini A, Andrade IM, Paranhos HF, Silva CH, de Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J.* 2010a;21(3):247-52.
81. Peracini A, Davi LR, Ribeiro NQ, de Souza RF, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. *J Prosthodont Res.* 2010b;54(2):78-83.

82. 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.
83. Pilch S, Williams MI, Cummins D. Effect of a Triclosan/PVM/MA copolymer/fluoride dentifrice on volatile sulfur compounds in vitro. *Oral Dis.* 2005;11 Suppl 1:57-60.
84. Pinelli LA, Montandon AA, Corbi SC, Moraes TA, Fais LM. *Ricinus communis* treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. *J Oral Rehabil.* 2013;40(5):375-80.
85. 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.* 2010a;13(3):369-73.
86. 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.* 2010b;19(5):369-73.
87. 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.* 2012;29(2):e179-85.
88. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol.* 1999;55(2):95-100.
89. Prasanth M. Antimicrobial efficacy of different toothpastes and mouthrinses: an in vitro study. *Dent Res J.* 2011;8(2):85-94.
90. Raghavendran K, Mylotte JM, Scannapieco FA. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. *Periodontol 2000.* 2007;44:164-77.
91. Randall J, Seow W, Walsh L. Antibacterial activity of fluoride compounds and herbal toothpastes on *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Aust Dent J.* 2014. doi: 10.1111/adj.12247. [Epub ahead of print].
92. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1599-607.
93. 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.

94. Salles AE, Macedo LD, Fernandes RA, Silva-Lovato CH, Paranhos HOF. Comparative analysis of biofilm levels in complete upper and lower dentures after brushing associated with specific denture paste and neutral soap. *Gerodontology*. 2007;24(4):217-23.
95. Salles MM. Eficácia da ação antimicrobiana de soluções químicas – hipoclorito alcalino e mamona (*Ricinus communis*) – frente a micro-organismos específicos [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2013. 175 p.
96. Scannapieco FA, Shay K. Oral health disparities in older adults: oral bacteria, inflammation, and aspiration pneumonia. *Dent Clin North Am*. 2014;58(4):771-82.
97. Scannapieco FA. The oral microbiome: its role in health and in oral and systemic infections. *Clin Microbiol Newsl*. 2013; 35(20):163-9.
98. Segundo Ade L, Pisani MX, do Nascimento C, Souza RF, Paranhos Hde F, Silva-Lovato CH. Clinical trial of an experimental cleaning solution: antibiofilm effect and integrity of a silicone-based denture liner. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15(5):534-42.
99. Sexson JC, Phillips RW. Studies on the effects of abrasives on acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1951;1(4):454-71.
100. Shim JY, Yim SB, Chung JH, Hong KS. Antiplaque and antigingivitis effects of a mouthrinse containing cetylpyridinium chloride, Triclosan and dipotassium glycyrrhizinate. *J Periodontal Implant Sci*. 2012;42(2):33-8.
101. Singh S, Chaknis P, De Vizio W, Petrone M, Panagakos FS, Proskin HM. A clinical investigation of efficacy of three commercially available dentifrices for controlling established gingivitis and supragingival plaque. *J Clin Dent*. 2010;21(4):105-10.
102. Sorgini DB, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Davi LR, Paranhos HF. Abrasiveness of conventional and specific denture-cleansing dentifrices. *Braz Dent J*. 2012;23(2):154-9.
103. Spolidorio DMP, Zuanon ACC, Zuanon JA. Biofilme dentário. *Rev paul odontol*. 2003;25(5):27-9.
104. Stovell AG, Newton BM, Lynch RJ. Important considerations in the development of toothpaste formulations for children. *Int Dent J*. 2013;63 Suppl 2:57-63.

105. 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.
106. 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.
107. Tirapelli C, Landi F, Ribas JP, Panzeri H, Lara EH. Evaluating an experimental dentifrice containing chloramine-T: a preliminary study. Oral Health Prev Dent. 2010;8(4):375-81.
108. 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.
109. 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.
110. Vieira, DF, Phillips, RW. Influence of certain variables on the abrasion of acrylic resin veneering materials. J Prosthet Dent. 1962;12(4):720-31.
111. 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.

APÊNDICE

APÊNDICE A – AVALIAÇÕES *IN VITRO*

Tabela A1 - Ensaio de reologia do dentifrício Branco.

Associação para leitura: BIIC S1

Data: 04/11/2014

Amostra: Dentifrício 2

Velocidade	α	$t = \alpha x z$	D	$m = t/D \times 100$
1	9,0	503,10	0,1800	279500,00000
2	9,0	503,10	0,3240	155277,77778
3	10,0	559,00	0,5400	103518,51852
4	12,0	670,80	0,9720	69012,34568
5	15,0	838,50	1,6200	51759,25926
6	18,0	1006,20	2,9160	34506,17284
7	22,0	1229,80	4,8600	25304,52675
8	26,0	1453,40	8,7480	16614,08322
9	31,0	1732,90	14,5800	11885,45953
10	37,0	2068,30	26,2400	7882,24085
11	43,0	2403,70	43,7400	5495,42753
12	51,0	2850,90	78,7200	3621,57012
11	43,0	2403,70	43,7400	5495,42753
10	37,0	2068,30	26,2400	7882,24085
9	31,0	1732,90	14,5800	11885,45953
8	26,0	1453,40	8,7480	16614,08322
7	21,0	1173,90	4,8600	24154,32099
6	17,0	950,30	2,9160	32589,16324
5	13,0	726,70	1,6200	44858,02469
4	10,0	559,00	0,9720	57510,28807
3	7,0	391,30	0,5400	72462,96296
2	6,0	335,40	0,3240	103518,51852
1	4,0	223,60	0,1800	124222,22222
$z = 55,9$				

Tabela A2 - Ensaio de reologia do dentifrício de *R. communis*.

Associação para leitura: BIIC S1

Data: 04/11/2014

Amostra: Dentifrício 3

Velocidade	α	$t = \alpha x z$	D	$m = t/D \times 100$
1	7,0	391,30	0,1800	217388,88889
2	8,0	447,20	0,3240	138024,69136
3	9,0	503,10	0,5400	93166,66667
4	11,0	614,90	0,9720	63261,31687
5	14,0	782,60	1,6200	48308,64198
6	17,0	950,30	2,9160	32589,16324
7	20,0	1118,00	4,8600	23004,11523
8	25,0	1397,50	8,7480	15975,08002
9	29,0	1621,10	14,5800	11118,65569
10	35,0	1956,50	26,2400	7456,17378
11	41,0	2291,90	43,7400	5239,82625
12	49,0	2739,10	78,7200	3479,54776
11	41,0	2291,90	43,7400	5239,82625
10	35,0	1956,50	26,2400	7456,17378
9	29,0	1621,10	14,5800	11118,65569
8	24,0	1341,60	8,7480	15336,07682
7	19,0	1062,10	4,8600	21853,90947
6	16,0	894,40	2,9160	30672,15364
5	12,0	670,80	1,6200	41407,40741
4	10,0	559,00	0,9720	57510,28807
3	7,0	391,30	0,5400	72462,96296
2	6,0	335,40	0,3240	103518,51852
1	4,0	223,60	0,1800	124222,22222
$z = 55,9$				

Tabela A3 - Ensaio de reologia do dentifrício de Triclosan.

Associação para leitura: BIIC S1

Data: 04/11/2014

Amostra: Dentifrício 1

Velocidade	α	$t = \alpha x z$	D	$m = t/Dx100$
1	8,0	447,20	0,1800	248444,44444
2	9,0	503,10	0,3240	155277,77778
3	10,0	559,00	0,5400	103518,51852
4	13,0	726,70	0,9720	74763,37449
5	16,0	894,40	1,6200	55209,87654
6	20,0	1118,00	2,9160	38340,19204
7	23,0	1285,70	4,8600	26454,73251
8	28,0	1565,20	8,7480	17892,08962
9	33,0	1844,70	14,5800	12652,26337
10	39,0	2180,10	26,2400	8308,30793
11	46,0	2571,40	43,7400	5878,82945
12	57,0	3186,30	78,7200	4047,63720
11	47,0	2627,30	43,7400	6006,63009
10	40,0	2236,00	26,2400	8521,34146
9	34,0	1900,60	14,5800	13035,66529
8	29,0	1621,10	8,7480	18531,09282
7	23,0	1285,70	4,8600	26454,73251
6	19,0	1062,10	2,9160	36423,18244
5	15,0	838,50	1,6200	51759,25926
4	12,0	670,80	0,9720	69012,34568
3	9,0	503,10	0,5400	93166,66667
2	7,0	391,30	0,3240	120771,60494
1	5,0	279,50	0,1800	155277,77778
z = 55,9				

Tabela A4 - Ensaio de reologia do dentifrício de Cloramina-T.

Associação para leitura: BIIC S1

Data:
06/11/2014**Amostra: Dentifrício 4**

Velocidade	α	$t = \alpha x z$	D	$m = t/D \times 100$
1	4,0	223,60	0,1800	124222,22222
2	5,0	279,50	0,3240	86265,43210
3	6,0	335,40	0,5400	62111,11111
4	8,0	447,20	0,9720	46008,23045
5	10,0	559,00	1,6200	34506,17284
6	13,0	726,70	2,9160	24921,12483
7	16,0	894,40	4,8600	18403,29218
8	21,0	1173,90	8,7480	13419,06722
9	25,0	1397,50	14,5800	9585,04801
10	31,0	1732,90	26,2400	6604,03963
11	36,0	2012,40	43,7400	4600,82305
12	44,0	2459,60	78,7200	3124,49187
11	37,0	2068,30	43,7400	4728,62369
10	31,0	1732,90	26,2400	6604,03963
9	25,0	1397,50	14,5800	9585,04801
8	21,0	1173,90	8,7480	13419,06722
7	16,0	894,40	4,8600	18403,29218
6	13,0	726,70	2,9160	24921,12483
5	9,0	503,10	1,6200	31055,55556
4	7,0	391,30	0,9720	40257,20165
3	5,0	279,50	0,5400	51759,25926
2	3,0	167,70	0,3240	51759,25926
1	2,0	111,80	0,1800	62111,11111
$z = 55,9$				

Tabela A5 - Média (DP) das rugosidades antes (RI) e após (RF) a escovação.

Dentifrícios	RI (Ra)	RF (Ra)
Branco	0,017	0,303
	0,023	0,353
	0,017	0,133
	0,023	0,240
	0,013	0,380
	0,020	0,177
Média	0,019	0,264
DP	(±0,004)	(±0,098)
<i>R. communis</i>	0,020	0,210
	0,020	0,270
	0,020	0,170
	0,027	0,203
	0,033	0,250
	0,013	0,313
Média	0,022	0,236
DP	(±0,022)	(±0,236)
Triclosan	0,010	0,417
	0,010	0,260
	0,010	0,163
	0,013	0,183
	0,010	0,167
	0,010	0,397
Média	0,011	0,265
DP	(±0,001)	(±0,116)
Cloramina-T	0,027	0,150
	0,027	0,277
	0,023	0,383
	0,020	0,137
	0,027	0,117
	0,037	0,153
Média	0,027	0,203
DP	(±0,006)	(±0,105)
Água	0,023	0,027
	0,023	0,020
	0,023	0,030
	0,020	0,027
	0,027	0,033
	0,033	0,027
Média	0,025	0,027
DP	(±0,005)	(±0,004)

Tabela A6 – Análise de variância dos valores de rugosidade de superfície.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	G.L.	Quadrados médios	F	Sig.
Dentifrício	0,110	4	0,028	7,465	0,000
Tempo	0,477	1	0,477	129,320	0,000
Dentifrício * Tempo	0,127	4	0,032	8,621	0,000

Tabela A7 - UFC/10 mL (em log₁₀) dos grupos avaliados contra as espécies de *Candida*.

Grupos	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T	Água
UFC	3,93	3,58	0,00	3,26	4,03
	2,90	3,20	0,00	2,30	4,45
	3,15	2,78	0,00	0,00	4,26
	4,29	3,00	0,00	2,30	3,97
	2,30	4,02	0,00	0,00	4,11
	3,60	3,60	2,60	3,62	3,82
	3,53	3,78	2,78	2,30	4,16
	3,00	3,26	3,00	2,90	4,44
	3,38	3,70	2,90	3,48	4,55
	3,08	4,00	2,60	2,90	3,60
Média	3,32	3,49	1,39	2,31	4,14
DP	(±0,56)	(±0,42)	(±1,47)	(±1,31)	(±0,30)

Tabela A8 - UFC/10 mL (em log₁₀) dos grupos avaliados contra os *S. mutans*.

Grupos	Branco	<i>R. communis</i>	Triclosan	Cloramina-T	Água
UFC	3,42	0,00	0	0,00	3,64
	0,00	2,30	0	0,00	4,03
	4,38	2,30	0	0,00	4,02
	0,00	2,30	0	0,00	4,01
	0,00	2,30	0	0,00	3,79
	0,00	0,00	0	4,75	4,00
	0,00	0,00	0	0,00	3,94
	0,00	0,00	0	2,60	3,73
	0,00	3,34	0	0,00	3,75
	4,78	3,42	0	0,00	3,00
Média	1,26	1,60	0	0,74	3,79
DP	(±1,95)	(±1,36)	0	(±1,55)	(±0,30)

Figura A1 - Avaliação *in vitro* dos dentifrícios frente às espécies de *Candida*: A1.1 - Controle Positivo; A1.2 - Após escovação com dentifrício Branco; A1.3 - Após escovação com dentifrício de *R. communis*; A1.4 - Após escovação com dentifrício de Triclosan; A1.5 - Após escovação com dentifrício de Cloramina-T e A1.6 - Após escovação com água.

Figura A2 - Avaliação *in vitro* dos dentifrícios frente às espécies de *Candida*: A2.1 - Controle Positivo; A2.2 - Após escovação com dentifrício Branco; A2.3 - Após escovação com dentifrício de *R. communis*; A2.4 - Após escovação com dentifrício de Triclosan; A2.5 - Após escovação com dentifrício de Cloramina-T e A2.6 - Após escovação com água.

APÊNDICE B – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VIVO*

Figura B1 - Avaliação *in vivo* dos dentífricos frente às espécies de *Candida*: B1.1 - Coleta do Baseline; B1.2 - Coleta após uso do dentífrico Branco; B1.3 - Coleta após o uso do dentífrico de *R. communis*; B1.4 - Coleta após o uso do dentífrico de Triclosan e B1.5 - Coleta após o uso do dentífrico de Cloramina-T.

Figura B2 - Avaliação *in vivo* dos dentífricos frente ao *S. mutans*: B2.1 - Coleta do Baseline; B2.2 - Coleta após uso do dentífrico Branco; B2.3 - Coleta após o uso do dentífrico de *R. communis*; B2.4 - Coleta após o uso do dentífrico de Triclosan e B2.5 - Coleta após o uso do dentífrico de Cloramina-T.

Figura B3 - Avaliação *in vivo* dos dentifrícios frente ao *S. aureus*: B3.1 - Coleta do Baseline; B3.2 - Coleta após uso do dentifrício Branco; B3.3 - Coleta após o uso do dentifrício de *R. communis*; B3.4 - Coleta após o uso do dentifrício de Triclosan e B3.5 - Coleta após o uso do dentifrício de Cloramina-T.

Figura B4 - Avaliação *in vivo* dos dentifrícios frente às bactérias Gram-negativas: B4.1 - Coleta do Baseline; B4.2 - Coleta após uso do dentifrício Branco; B4.3 - Coleta após o uso do dentifrício de *R. communis*; B4.4 - Coleta após o uso do dentifrício de Triclosan e B4.5 - Coleta após o uso do dentifrício de Cloramina-T.