



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FRANCISCO CÉSAR MONTEIRO CHAVES FILHO

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E DOS PARÂMETROS SALIVARES DE
DENTIFRÍCIOS CONTENDO CARVACROL E TIMOL: ESTUDO DUPLO-CEGO,
PROSPECTIVO E RANDOMIZADO**

FORTALEZA

2018

FRANCISCO CÉSAR MONTEIRO CHAVES FILHO

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E DOS PARÂMETROS SALIVARES DE
DENTIFRÍCIOS CONTENDO CARVACROL E TIMOL: ESTUDO DUPLO-CEGO,
PROSPECTIVO E RANDOMIZADO

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Thyciana Rodrigues
Ribeiro

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C438a Chaves Filho, Francisco César Monteiro.
Avaliação antimicrobiana e dos parâmetros salivares de dentifrícios contendo carvacrol e timol : estudo duplo-cego, prospectivo e randomizado / Francisco César Monteiro Chaves Filho. – 2018.
61 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Thyciana Rodrigues Ribeiro.
Coorientação: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles.
1. Dentifrícios. 2. Carvacrol. 3. Timol. I. Título.

CDD 617.6

FRANCISCO CÉSAR MONTEIRO CHAVES FILHO

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E DOS PARÂMETROS SALIVARES DE
DENTIFRÍCIOS CONTENDO CARVACROL E TIMOL: ESTUDO DUPLO-CEGO,
PROSPECTIVO E RANDOMIZADO**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia; Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Thyciana Rodrigues Ribeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Juliana Ximenes Damasceno
Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS

A Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, provedor de cada amanhecer da minha longa caminhada.

Agradeço aos meus pais, César e Marlete, pelo apoio incondicional recebido em todos esses anos de estudo. Seus exemplos de força e de simplicidade serão pilares para a minha vida, sempre.

Agradeço a minha amada avó Argentina e minha madrinha Fátima pelo amor dado sem nenhuma cobrança e pelas inúmeras vezes que estenderam os seus colos acolhedores; esse momento só é possível graças ao esforço de vocês.

Agradeço à minha querida noiva Iara pelo seu amor, carinho e por todos os momentos de incentivo, sem as suas palavras eu não seria capaz de acreditar que posso ser muito mais do que imagino. Levarei os seus conselhos guardados no meu coração.

Agradeço aos meus amigos e familiares que estiveram presentes no meu dia-a-dia durante todos esses anos, seja em momentos de dificuldade, seja em momentos de alegria. Compartilhar esse período da vida com vocês foi muito especial e tenho a certeza de que não poderia encontrar melhores companhias.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Thyciana Rodrigues Ribeiro, pela oportunidade e confiança a mim concedida para a execução desse trabalho. Obrigado pelo exemplo de competência e pelos inúmeros ensinamentos ao longo dessa convivência, as suas críticas pertinentes farão de mim uma pessoa melhor pessoalmente e profissionalmente. Sem sombra de dúvida, a minha formação foi diferenciada graças a sua contribuição.

Agradeço à Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles por todo o apoio recebido ao longo dessa pesquisa, a sua presença constante em todas as etapas do projeto tornaram possível a concretização desse trabalho. Admiro muito a sua força, o seu caráter e a sua sabedoria.

Agradeço aos colegas Janaina Ferreira da Costa e Ana Lalessa Pereira; alunas de iniciação científica. Sem a presença de vocês, executar esse projeto seria muito mais difícil e também menos divertido, obrigada pelo imenso auxílio que vocês me proporcionaram.

Agradeço às professoras Cibele Barreto Mano de Carvalho e Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia por todos os ensinamentos e pela viabilização do Laboratório de Bioquímica Analítica e Análise de Proteínas.

Agradeço ao Prof. Said Goncalves da Cruz Fonseca pela viabilização do Laboratório de Farmacotécnica.

Agradeço aos professores presentes na banca examinadora desse trabalho, por dedicarem parte do seu tempo para contribuir com melhorias para o presente artigo.

Por fim, agradeço a todos os meus professores, desde aqueles dos tempos de escola chegando até os professores da pós-graduação. A contribuição de cada um de vocês foi extremamente importante na minha vida, muito obrigado!

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a diferentes dentifrícios à base de óleos essenciais em diferentes concentrações associados ao flúor. A amostra foi composta por 40 adultos de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 45 anos, com ou sem cárie ativa, acompanhantes de pacientes atendidos na Clínica 1 da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE). O desenho do estudo consistiu de um ensaio clínico duplo cego, randomizado e prospectivo. Primeiramente foi coletada a saliva total estimulada de todos os adultos. Em seguida, antes da escovação com um dos seguintes dentifrício formulados: (1) Timol 1% + 1000 ppm de flúor; (2) Timol 2% + 1000 ppm de flúor; (3) Carvacrol 1% + 1000 ppm de flúor; (4) Carvacrol 2% + 1000 ppm de flúor; e (5) 1000ppm de flúor (controle), os adultos receberam instrução padronizada de práticas de higiene oral. Após a escovação durante 1 minuto uma nova coleta foi realizada. Foi solicitada a resposta de um questionário de satisfação após o término da formulação apresentada. Os dados foram tabulados para análise estatística, sendo considerados os resultados com nível de significância $\leq 0,05$. O fluxo salivar final mensurado após a aplicações dos dentifrícios demonstrou aumentar em todos os 5 grupos estudados (Carvacrol 1% $p = 0,001$, Carvacrol 2% $p = 0,006$, Timol 1% $p = 0,001$, Timol 2% $p = 0,001$ e Controle $p = 0,000$). Já o pH salivar teve a média aumentada em todos os grupos, porém somente os grupos Carvacrol 2% e Timol 1% tiveram aumentos significantes ($p = 0,004$ e $p = 0,001$, respectivamente). Na variável capacidade tampão salivar, observou-se uma elevação significativa em todos os grupos contendo timol (Timol 1% $p = 0,009$ e Timol 2% $p = 0,026$) e carvacrol (Carvacrol 1% $p = 0,001$ e Carvacrol 2% $p = 0,036$). A redução de *S. mutans* foi observada apenas nos grupos Timol 1% ($p = 0,024$) e 2% ($p = 0,029$) e Controle ($p = 0,012$). O grupo contendo carvacrol não apresentou redução significativa de *S. mutans*. O questionário de satisfação demonstrou que o carvacrol apresenta uma maior sensação de queimação quando comparado com o timol e que esses óleos essenciais apresentam odor percebido pelos participantes do estudo. Desta forma, conclui-se que o uso de óleos essências, como o timol e carvacrol, auxiliam os dentifrícios contendo flúor no tratamento preventivo da cárie dentária. Contudo, estudos devem ser realizados com a finalidade de reduzir efeitos indesejáveis, como ardência provocada por esses óleos naturais, quando associados a dentifrícios.

Palavras-chave: Dentifrícios. Carvacrol. Timol. Cárie dentária.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the efficacy of the antibacterial action against *Streptococcus mutans*, besides evaluating the salivary flow, pH and buffer capacity of different dentifrices based on essential oils in different concentrations associated with fluoride. The sample consisted of 40 adults of both genders, aged between 18 and 45 years old, with or without active caries, companions of patients attending the Clinic 1 of the Federal University of Ceará, Fortaleza (CE). The study design consisted of a double-blind, randomized, prospective clinical trial. First the total stimulated saliva of all adults was collected. Then, before brushing with one of the following formulated dentifrices: (1) 1% thymol + 1000 ppm fluorine; (2) Thymol 2% + 1000 ppm fluorine; (3) Carvacrol 1% + 1000 ppm fluorine; (4) Carvacrol 2% + 1000 ppm fluorine; and (5) 1000ppm of fluoride (control), adults received standardized instruction in oral hygiene practices. After brushing for 1 minute a new collection was performed. A satisfaction questionnaire was requested after completion of the presented formulation. Data were tabulated for statistical analysis, and the results with significance level ≤ 0.05 were considered. The final salivary flow measured after application of the dentifrices was shown to increase in all 5 groups studied (Carvacrol 1% $p = 0.001$, Carvacrol 2% $p = 0.006$, Thymol 1% $p = 0.001$, Thymol 2% $p = 0.001$ and Control $p = 0.000$). Salivary pH had a mean increase in all groups, but only the Carvacrol 2% and Thymol 1% groups had significant increases ($p = 0.004$ and $p = 0.001$, respectively). In the variable salivary buffer capacity, there was a significant increase in all groups containing thymol (Thymol 1% $p = 0.009$ and Thymol 2% $p = 0.026$) and carvacrol (Carvacrol 1% $p = 0.001$ and Carvacrol 2% $p = 0.036$). Reduction of *S. mutans* was observed only in the 1% ($p = 0.024$) and 2% ($p = 0.029$) and Control ($p = 0.012$) groups. The carvacrol-containing group showed no significant reduction of *S. mutans*. The satisfaction questionnaire showed that carvacrol has a greater burning sensation when compared to thymol and that these essential oils have an odor perceived by study participants. Thus, it is concluded that the use of essential oils, such as thymol and carvacrol, help the dentifrices containing fluoride in the preventive treatment of dental caries. However, studies should be performed to reduce undesirable effects such as burning caused by these natural oils when associated with dentifrices.

Key-words: Dentifrices. Carvacrol. Thymol. Dental Caries

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
MSB	Mitis Salivarius-Bacitracina
ufc	Unidades formadoras de colônias
mL	Mililitros
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. CAPÍTULOS	15
3.1 Capítulo 1: Avaliação Clínico-laboratorial de Dentifrícios Contendo Carvacrol ou Timol sobre os Parâmetros Salivares de Fluxo, ph, Capacidade Tampão e Concentração de Streptococcus Mutans	16
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
5. REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	40
APÊNDICE B - Ficha de Anamnese	43
APÊNDICE C - Questionário de Satisfação	44
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética	45
ANEXO B - Instruções para autores do "Caries Research"	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dentária é uma doença multifatorial, biofilme dependente que afeta cerca de 60 a 90% dos adolescentes de 12 anos com dentição permanente no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde, sendo os indivíduos suscetíveis a esta condição durante toda a sua vida (SALLI et al., 2016). Ela se expressa clinicamente como resultado de um acúmulo de múltiplos eventos de desmineralização e remineralização, desencadeados ao longo do tempo, relacionados ao metabolismo bacteriano na superfície dentária (GONZÁLES et al., 2013). Quando os depósitos microbianos permanecem aderidos ao dente, episódios de queda do pH no biofilme exposto ao açúcar podem ocorrer, levando a uma perda da integridade do esmalte. Portanto, em uma dieta rica em carboidratos e açúcar fermentável, o pH da placa permanece baixo, favorecendo o crescimento da microbiota cariogênica, consequentemente aumentando o risco para o surgimento da cárie (CARDOSO et al., 2016). As bactérias consideradas mais cariogênicas são os *Streptococcus*, especialmente o *Streptococcus mutans* (KASSEBAUM et al., 2015). Outra espécie bacteriana acidogênica e acidúrica, é o *Lactobacillus spp.* Essas bactérias foram observadas no desenvolvimento da lesão de cárie dentária (VALDEZ et al., 2016).

Por se tratar de uma associação organizada, proliferante, enzimaticamente ativa, capaz de se aderir à superfície dos dentes, ocasionando alterações patológicas na cavidade bucal, é indicada a desorganização do biofilme tão logo seja possível (RUFF E NIEDERMAN, 2018). A remoção mecânica do biofilme é um fator importante na prevenção da cárie e doença periodontal, no entanto, existem dificuldades na remoção feita pelo próprio paciente (FILOGÔNIO et al., 2011). Considerando a importância dessa desorganização e as dificuldades de manter os indivíduos motivados para realizar uma adequada limpeza da cavidade bucal, com o objetivo primário de controlar o acúmulo das bactérias sobre às estruturas dentárias, é válido e necessário associar aos procedimentos mecânicos, também, métodos químicos para o controle do biofilme dental (RUFF E NIEDERMAN, 2018). Esse fato leva a comunidade científica a uma busca constante relacionada à produção de substâncias seguras para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos naturais (BOTELHO et al., 2007). Neste sentido, alguns estudos têm sido realizados com a finalidade de determinar estratégias anticariogênicas através do uso de óleos essenciais, os quais demonstram um forte potencial terapêutico que pode ser utilizado para a prevenção de cárie (TOUGER-DECKER & VAN LOVEREN, 2003; FONTENELLE et al., 2007; LOBO et al., 2014; CARDOSO et al., 2016).

Com o aumento da resistência microbiana a antibióticos e antissépticos convencionais, a atenção volta-se ainda mais para a utilização de compostos antimicrobianos naturais (LANGEVELD et al., 2014). Qualquer tratamento que eliminasse ou reduzisse substancialmente a colonização por bactérias cariogênicas terá um forte impacto no desenvolvimento da cárie (BOTELHO et al., 2007). Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de plantas (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). Estima-se que mais de 3000 tipos diferentes de óleos essenciais existam no mundo (BURT, 2004; LANGEVELD et al., 2014). Os óleos essenciais vêm sendo muito estudados devido às suas propriedades antimicrobianas (LOBO et al., 2007), antivirais (SADDI et al., 2007), antifúngicas (CHAIEB et al., 2007), antiparasitárias (PANDEY et al., 2000), antitoxigênicas (JUGLAL et al., 2002), inseticidas (RAJKUMAR et al., 2007), antioxidantes (GACHKAR et al., 2007), analgésicas (MARTÍNEZ et al., 2009), anti-inflamatórias (SOUSA et al., 2008) e anticancerígenas (RAVIZZA et al., 2008). O efeito da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido atribuído principalmente a compostos fenólicos, tais como os isômeros carvacrol e o timol (LOBO et al., 2014). O carvacrol é o principal componente obtido a partir do orégano e do tomilho (50-86%) (BELDA-GALBIS et al., 2014). Já o timol é o principal componente obtido a partir da *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) (50-59%), um arbusto do Nordeste do Brasil conhecido como “Alecrim-Pimenta”, além de apresentar uma pequena quantidade de carvacrol (7-16%) (FONTENELLE et al., 2007).

A identificação de uma substância antimicrobiana de ação específica no controle de placa bacteriana e de suas bactérias precursoras diretamente envolvidas no desenvolvimento do processo carioso seria, portanto, um método adjuvante, de grande valor nos regimes de prevenção e tratamento da doença (LOBO et al., 2011). Apesar de haver na literatura relatos sobre programas de prevenção em saúde bucal, permanece por ser desenvolvido um método eficaz de prevenção à cárie dentária utilizando-se medidas simples, de baixo custo e, portanto, úteis numa perspectiva de saúde bucal para pacientes em geral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antimicrobiana e os parâmetros salivares em adultos em diferentes dentifrícios à base timol e carvacrol em diferentes concentrações associados ao flúor.

2.2 Objetivos Específicos

- Mensurar e comparar o fluxo de saliva total estimulada entre indivíduos após uso de dentifrícios com e sem óleos essenciais;
- Mensurar e comparar o pH e capacidade tampão da saliva total estimulada entre indivíduos após uso de dentifrícios com e sem óleos essenciais;
- Mensurar e comparar os níveis de *S. mutans* proporcionada pelos dentifrícios com e sem óleos essenciais.

3. CAPÍTULOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. Por se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob o protocolo nº 1.615.755, conforme o ofício eletrônico de 30 de junho de 2016 (Anexo A). Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo, contendo artigo redigido de acordo com a revista científica escolhida, conforme descrito abaixo:

Avaliação Clínico-laboratorial de Dentifrícios Contendo Carvacrol ou Timol sobre os Parâmetros Salivares de Fluxo, pH, Capacidade Tampão e Concentração de *Streptococcus Mutans*

Autores: Chaves Filho F.C.M., Marinho R.B.V, Maia C.B.S.C, Fonseca S.G.C., Fonteles C.S.R., Ribeiro T.R..

Este artigo seguiu normas de publicação do periódico: *Caries Research* (ISSN 0008-6568)

3.1 Capítulo 1

Avaliação Clínico-laboratorial de Dentifrícios Contendo Carvacrol ou Timol sobre os Parâmetros Salivares de Fluxo, pH, Capacidade Tampão e Concentração de *Streptococcus Mutans*

Resumo

A cárie é um problema de saúde pública mundial. Vários fatores interagem em sua etiologia, dentre eles a presença de Streptococcus do grupo mutans (*S. mutans*) no biofilme bucal. As medidas de prevenção existentes não são totalmente efetivas, razão pela qual é necessário buscar estratégias complementares para sua gestão. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os níveis de *S. mutans* por meio de dentifrícios contendo timol e carvacrol, como também verificar possíveis alterações nos parâmetros salivares. Para isto, foram selecionados 40 adultos saudáveis que utilizaram por 1 minuto uma das 5 formulações de dentifrícios seguintes: Timol 1%, Timol 2%, Carvacrol 1%, Carvacrol 2% e Controle. Antes e após a aplicação dos tratamentos, foi realizada uma coleta de saliva estimulada a fim de mensurar os níveis de fluxo, pH, capacidade tampão e *S. mutans* salivares. Os dados foram tabulados e analisados utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 20.0, com nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%. Foi aplicado uma transformação logarítmica com a seguinte equação: $y = \log_{10}(x) = \log(x)$ para os dados sobre Unidades Formadoras de Colônias. Em todas as formulações houve um aumento do fluxo salivar final (Carvacrol 1% $p=0,001$, Carvacrol 2% $p=0,006$, Timol 1% $p=0,001$, Timol 2% $p=0,001$ e Controle $p=0,000$). O pH salivar aumentou significativamente apenas nos grupos Carvacrol 2% ($p=0,004$) e Timol 1% ($p=0,001$). Entretanto, a capacidade tampão da saliva elevou-se em todos os grupos contendo timol (Timol 1% $p=0,009$ e Timol 2% $p=0,026$) e carvacrol (Carvacrol 1% $p=0,001$ e Carvacrol 2% $p=0,036$). A redução de *S. mutans* foi observada apenas nos grupos Timol 1% ($p=0,024$) e 2% ($p=0,029$) e Controle ($p=0,012$). Concluiu-se que a adição de óleos essenciais como timol e carvacrol, melhora os parâmetros salivares importantes para a prevenção da cárie, atuando sinergicamente com o flúor nas formulações de dentifrícios para a remoção químico/mecânica de placa durante a escovação dos dentes.

INTRODUÇÃO

O acúmulo de biofilmes bacterianos nas superfícies dentárias resulta em uma das doenças infecciosas mais prevalentes: cárie dentária. Na dentição permanente ela permanece como a condição de saúde mais prevalente em todo o mundo em 2010, afetando 2,4 bilhões de pessoas, e na dentição decídua ela foi a 10^a condição mais prevalente, afetando 621 milhões crianças em todo o mundo [Kassebaum et al., 2015]. Essa doença caracteriza-se como uma alteração fisiológica dos minerais do tecido dentário e dos fluidos que o rodeiam, onde um amplo grupo de determinantes biológicos, socioeconômicos e culturais interagem para seu desenvolvimento. Dentre as espécies bacterianas, o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), destaca-se por ser o principal agente associado à cárie dentária devido às suas propriedades acidogênicas e acidúricas que permitem adaptar-se e sobreviver às mudanças ambientais [Kassebaum et al., 2015; Yu et al., 2017].

Embora a prevenção e o controle da cárie possa ser alcançados através da remoção mecânica diária de biofilmes, muitas pessoas são incapazes ou não estão dispostas a praticar esses procedimentos de forma regular e eficaz. Existe, portanto, um grande interesse na possibilidade de usar produtos químicos para substituir ou incrementar a eficácia dos procedimentos preventivos mecânicos e terapêuticos [Quintas et al., 2015]. Nos últimos anos, o potencial promissor das substâncias naturais contra os microrganismos cariogênicos e sua aplicação no desenvolvimento de produtos preventivos e terapêuticos tem sido explorado [Aguiar et al., 2013 Bardají et al., 2016]. Já existem algumas formulações comercialmente disponíveis de enxaguantes bucais e dentifrícios contendo substâncias naturais [Bardají et al., 2016]. Estudos anteriores relataram os efeitos de substâncias naturais sobre o crescimento microbiano, principalmente *S. mutans*, síntese de polissacarídeos e formação de biofilmes dentários [Wang et al., 2016].

O timol e o carvacrol são óleos essenciais formados por misturas complexas de substâncias hidrofóbicas voláteis obtidas a partir de metabólitos secundários de diversas plantas. Em geral, eles têm pesos moleculares similares e são isômeros estruturais, mas apresentam características físicas distintas; e seus efeitos antimicrobianos estão relacionados a alterações na permeabilidade e integridade das membranas celulares bacterianas [Oliveira et al., 2017]. Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes formulações de dentifrícios contendo timol e carvacrol, além de relacionar as

possíveis alterações de fluxo, pH e capacidade tampão que esses dentifrícios possam provocar na saliva humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará seguindo todos os preceitos da resolução 196/96 (protocolo nº 1.615.755). Após a aprovação pelo Comitê de Ética, foi entregue aos voluntários do estudo um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice A), no qual foram explicados os objetivos, metodologia, bem como riscos e benefícios relacionados de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 466/12). Foi respeitado o sigilo dos pacientes.

População e amostra

A população deste estudo consistiu de 40 adultos saudáveis de ambos os sexos, na faixa etária entre 18 e 45 anos de idade, com ou sem cárie ativa, provenientes da Clínica Odontológica 1 da Universidade Federal do Ceará (UFC), situada na cidade de Fortaleza (CE).

Recrutamento

O recrutamento foi realizado por demanda espontânea, consistindo de acompanhantes de pacientes já cadastrados para atendimento na Clínica Odontológica 1 da UFC, sendo, portanto, essa amostra considerada uma amostra de conveniência. Foi selecionada a mesma quantidade de indivíduos para compor o grupo controle. Foram incluídos no estudo adultos que se enquadraram nos seguintes critérios: (1) saudáveis; (2) ambos os sexos; (3) faixa etária entre 18 e 45 anos de idade; (4) ausência de antibioticoterapia no período de coleta do material; e (5) termo de consentimento assinado pelo participante autorizando a realização do exame e dos procedimentos terapêuticos envolvidos. Nenhum participante do estudo foi excluído ou retirado (Figura 1).

Anamnese

Após devida assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os voluntários foram submetidos a uma anamnese, onde foram obtidas informações concernentes ao seu estado geral de saúde (Apêndice B). Neste momento foram avaliados parâmetros de

saúde geral que pudessem de alguma forma influenciar o padrão salivar do voluntário, ou que requeressem um encaminhamento médico específico por parte do pesquisador.

Aplicação dos tratamentos

Os participantes foram distribuídos aleatoriamente a qualquer um dos cinco grupos de diferentes dentifrícios, os quais foram utilizados para escovação dentária por um período de 1 min: (1) Timol 1% + 1000 ppm de fluoreto de sódio; (2) Timol 2% + 1000 ppm de fluoreto de sódio; (3) Carvacrol 1% + 1000 ppm de fluoreto de sódio; (4) Carvacrol 2% + 1000 ppm de fluoreto de sódio; e (5) 1000ppm de fluoreto de sódio (controle). Todos os dentifrícios foram formulados pelo Laboratório de Ciências Farmacêuticas da UFC, Fortaleza (CE), manipulados seguindo o mesmo padrão, na forma de dentifrício, oriundos de uma mesma fonte, obtendo-se semelhança em cor, odor, textura e sabor. Por se tratar de um estudo duplo-cego, o coordenador do estudo, examinadores e adultos voluntários não tiveram conhecimento de qual dentifrício estava sendo aplicado. Os tratamentos foram aplicados na Clínica Odontológica 1 da UFC, Fortaleza (CE), sob a supervisão do pesquisador principal do estudo e com a assistência de um estudante de graduação. Inicialmente, a primeira coleta de saliva foi realizada antes da aplicação do tratamento, e em seguida todos os participantes receberam escovas dentais, bem como a instrução padronizada de práticas de higiene oral. Em seguida, os voluntários realizaram a escovação com o dentifrício designado para cada grupo. Ao término da escovação, uma nova coleta de saliva para análise foi realizada.

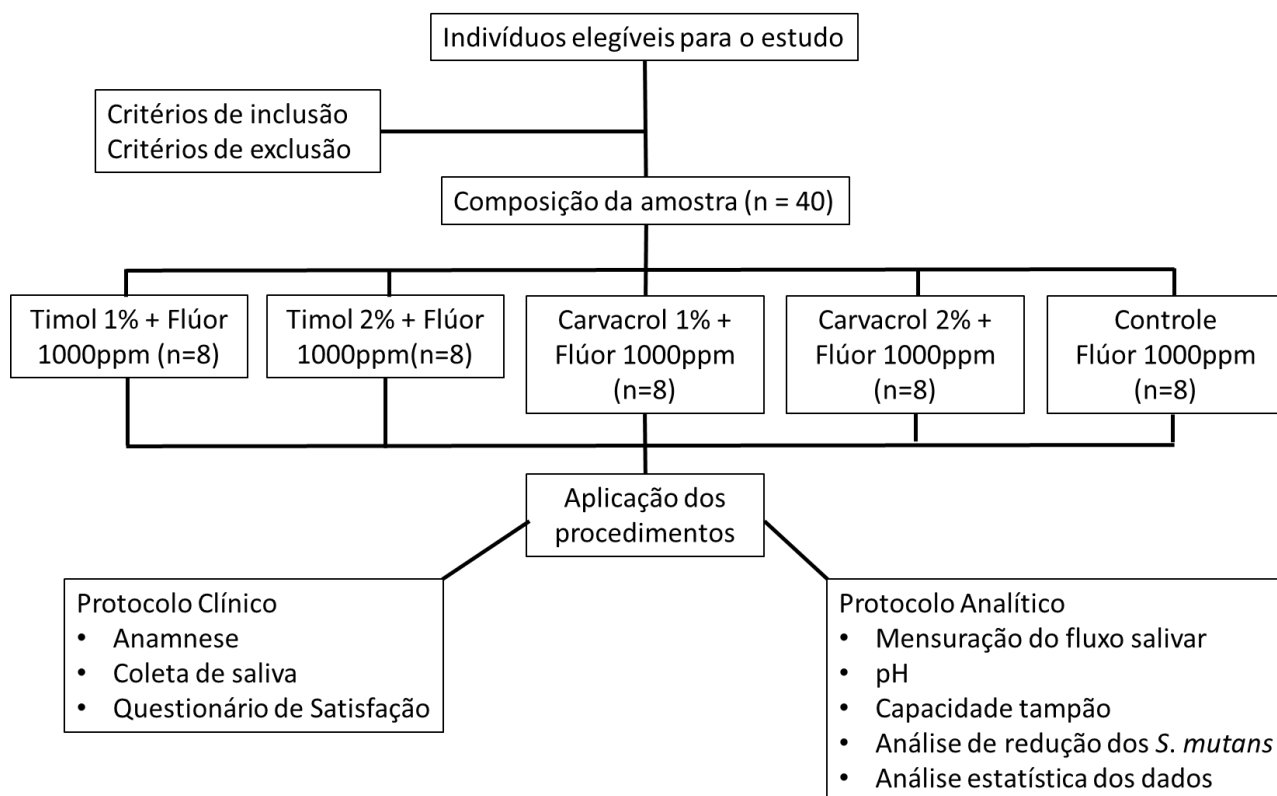


Figura 1: Fluxograma do desenho metodológico utilizado na presente pesquisa.

Questionário de Satisfação

Ao fim da segunda coleta de saliva, o participante foi solicitado a classificar o dentifrício segundo o sabor, presença de sintomas como náuseas, percepção de limpeza oral, facilidade de utilização e percepção olfativa. Cada item foi classificado por meio de escores de 1 (pobre) a 5 (excelente) (APÊNDICE C).

Coleta de saliva

As amostras de saliva total foram coletadas entre 8:00 e 10:00 horas da manhã para reduzir possíveis contribuições circadianas, após um mínimo de 2 horas de jejum. Foi requerido aos voluntários que os procedimentos rotineiros de higienização da cavidade oral não fossem realizados no dia da coleta. Os voluntários ficaram em repouso durante 30 minutos. Em seguida mascararam por um minuto um pedaço de parafina [Parafilm “M”[®], Bemis Company, Inc., Califórnia, EUA] presa a um pedaço longo de fio dental para evitar a deglutição do material, segundo descrito por Klock e Krasse [1979]. Após esse período, a parafina foi retirada da boca do adulto e descartada. A saliva foi coletada por meio de uma

pipeta plástica descartável tipo Pasteur. O armazenamento da saliva coletada ocorreu em tubos Eppendorf® e essas amostras foram mantidas e transportadas sob gelo até a análise.

Mensuração do fluxo salivar

A determinação do fluxo salivar foi realizada após a coleta de saliva, onde foi observado e registrado em mL o volume total de saliva coletado durante 10 minutos, sendo descartados espuma e debris. O fluxo salivar foi determinado pelo volume de saliva depositado no béquer dividido por 10 minutos, bem como foi expresso em mL/min.

pH

O pH salivar foi mensurado digitalmente através de pHmetro portátil digital [Marconi, São Paulo, Brasil]. Foi realizada a calibração do aparelho usando-se soluções tamponadas com pH 4.0 e pH 7.0. Em seguida, o ponteiro sensor do aparelho foi mergulhado na saliva durante 30 segundos, sendo feita a leitura automática do pH. As leituras do pH para cada amostra de saliva foram feitas em triplicata. Foi reportada a média do pH mensurado para cálculo estatístico.

Capacidade tampão

Após a medição do pH, foi mensurada a capacidade tampão. Para mensuração da capacidade tampão, o pH final foi medido após 10 minutos de mistura de 1 mL de saliva com 3 mL de 0,005 M de HCl. As leituras da capacidade tampão para cada amostra de saliva foram feitas em triplicata. Foi reportada a média da capacidade tampão mensurada para cálculo estatístico.

Análise microbiológica

Um volume de 0,1 mL de cada amostra de saliva foi retirado assepticamente e transferido para um tubo Eppendorf® estéril contendo 0,9 mL de solução salina, estabelecendo diluição de 1:10. Um volume correspondente de 25 µL da diluição foi colocado em cada uma das três partes da placa petri contendo ágar Mitis Salivarius-Bacitracina (MSB) a fim de se obter um resultado em triplicata. As placas foram então incubadas a 37°C, durante 48 horas, sob condições microaerófilas. As colônias representativas com características morfológicas da *S. mutans* foram contabilizadas, isoladas e bioquimicamente confirmadas

utilizando os testes de Gram e peroxidase. As contagens bacterianas foram expressas como unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) de saliva.

Análise estatística

Inicialmente, os dados foram tabulados em tabela do software Microsoft Excel® versão 2016. Os dados foram submetidos à análise estatística, sendo utilizado, para esse fim, o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 20.0, ambiente Mac OS Sierra®. Os dados sobre o número de Unidades Formadoras de Colônias foram inicialmente processados para homogeneizar as variações e tornar a distribuição mais próxima da normalidade. Para este fim, usamos uma transformação logarítmica como a seguinte equação: $y = \log_{10}(x) = \log(x)$. As variáveis quantitativas e contínuas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Shapiro Wilk, de modo a verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calculou-se média e desvio padrão (dados paramétricos) ou mediana e valores mínimos e máximos (dados não paramétricos). Para comparar três ou mais grupos (análise entre grupos), utilizamos análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparação múltipla de Tukey, para verificar diferenças entre cada dois grupos (dados paramétricos) ou teste de Wilcoxon Signed Rank (dados não paramétricos). As comparações entre diferentes momentos do mesmo grupo (dentro da análise de grupo) foram realizadas pelo teste t para dados pareados. Os dados categóricos foram expressos na forma de frequência absoluta e percentual, e verificadas associações por meio do teste do qui-quadrado. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação entre os rankings obtidos para cada variável avaliada no questionário de satisfação. O nível de significância estatística adotado para todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A maioria das variáveis apresentadas seguiram uma curva de distribuição normal dos dados (dados paramétricos), com exceção das variáveis “nº de *S. mutans* - Controle” e “nº de *S. mutans* Carvacrol 2%” ($p < 0,05$) (dados não-paramétricos).

Intra-grupos

O fluxo salivar apresentou em todos os grupos um valor médio final maior que o valor médio inicial, apresentando em todos os casos uma diferença altamente significativa (Carvacrol 1%, $p = 0,001$; Carvacrol 2%, $p = 0,006$; Timol 1%, $p = 0,001$; Timol 2%, $p = 0,001$; Controle, $p = 0,000$) (Tabela 1).

O valor de pH final, medido após o tratamento com os dentifrícios, apresentou um valor médio maior que o pH medido antes da aplicação dos tratamentos em todos os grupos, porém apenas os grupos Carvacrol 2% e Timol 1% expressaram uma diferença significativa ($p = 0,004$ e $p = 0,001$, respectivamente) (Tabela 1).

Ao se comparar a capacidade tampão salivar nos momentos inicial e final, observou-se um aumento nas médias de capacidade tampão após o tratamento com todos os grupos de dentifrícios estudados, com exceção do grupo controle que teve uma média final ($4,56 \pm 1,03$) menor que a média inicial ($4,81 \pm 0,62$). As formulações Timol 2% ($p = 0,026$), Timol 1% ($p = 0,009$), Carvacrol 1% ($p = 0,001$) e Carvacrol 2% ($p = 0,036$) apresentaram valores de significância nos momentos inicial e final de cada grupo. O Controle foi o único grupo que não apresentou valor de significância ($p = 0,510$) (Tabela 1).

Ao comparar o nº de *S. mutans* contados nos momentos inicial e final da aplicação dos tratamentos, observou-se que os grupos Timol 1% ($p = 0,024$), Timol 2% ($p = 0,029$) e Controle ($p = 0,012$) apresentaram uma redução estatisticamente significativa do número de *S. mutans* com o uso destes dentifrícios. Nenhum dentifrício contendo Carvacrol (Carvacrol 1%, $p = 0,057$; Carvacrol 2%, $p = 0,093$), apresentou diferença significante, podendo-se destacar o grupo Carvacrol 2% que teve um aumento no numérico na concentração de *S. mutans* após o tratamento (Tabela 2).

Entre os grupos

Ao se comparar as variáveis salivares de fluxo, pH, capacidade tampão e nº de *S. mutans* entre os grupos, observamos que somente a variável “capacidade tampão inicial”

apresentou uma diferença significativa ($p = 0,008$), demonstrando não haver correlação entre as demais variáveis (Tabela 3).

Qualitativos

Por fim, ao se comparar os rankings das respostas obtidas pelo questionário de satisfação aplicado após os tratamentos sobre os dentifrícios testados, foi verificada significância entre o Carvacrol 2% e o Timol 2% para as variáveis percepção olfativa ($p = 0,027$) e sensação de queimação ($p = 0,015$). Ao se comparar Carvacrol 2% com Controle, foi obtida significância nas variáveis percepção olfativa ($p = 0,048$) e sintomas ($p = 0,004$). Comparando Carvacrol 1% com Controle observou-se p-valor de 0,041 para sensação de queimação. Timol 2% apresentou uma sensação de queimação maior que o grupo controle ($p = 0,003$). Carvacrol 1% apresentou uma sensação de queimação maior que o grupo Timol 2% ($p = 0,045$). Em relação ao item sobre limpeza oral, Carvacrol 1% apresentou uma melhor avaliação que Timol 1% ($p = 0,037$). Na última comparação, observou-se que Timol 2% apresentou uma sensação de queimação maior que Timol 1% ($p = 0,012$) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Este estudo foi delineado com o intuito de se verificar a eficácia do timol e do carvacrol associados a flúor frente ao dentifrício contendo apenas flúor, na redução de *S. mutans* em saliva bem como a capacidade dessas substâncias em interferir no fluxo salivar, pH e capacidade tampão com finalidade de prevenir o surgimento de lesões de cárie.

Segundo Humphrey e Williamson [2001], existe uma grande variabilidade nas taxas individuais de fluxo salivar, sendo o intervalo aceitável de fluxo normal encontrando-se acima de 0,1 mL/min, na qual valores menores são considerados hipossalivação. Nossos resultados demonstraram que todas as 5 formulações de dentifrícios aumentaram o fluxo salivar após a escovação de forma significativa, provavelmente devido a estimulação mecânica provocada pela escovação. Os indivíduos com índice de fluxo salivar baixo, frequentemente, apresentam alta incidência de cárie [Papapoulos et al., 1993; Spak et al., 1994]. Estimular o fluxo de saliva altera sua composição, sendo observado por Dawes [1996] que o aumento da taxa de fluxo salivar aumenta a concentração de proteína, sódio, cloreto e bicarbonato e diminui a concentração de magnésio e fósforo. Talvez a maior importância seja o aumento da concentração de bicarbonato, que aumenta progressivamente com a duração da estimulação. O aumento da concentração de bicarbonato se difunde na placa, neutraliza os ácidos da placa, aumenta o seu pH e favorece a remineralização do esmalte danificado e dentina [Lussi, 2014]. Desta forma é de extrema importância que os dentifrícios contribuam com aumento do volume salivar a fim de dificultar o surgimento da cárie.

Com isso podemos afirmar que o pH salivar desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde bucal, sendo a faixa de normalidade de 6,2 a 7,6 [Edgar e O'Mullane, 2004]. O valor baixo de pH influencia diretamente no surgimento da cárie, propiciando um ambiente ácido favorável ao seu desenvolvimento [Selwitz et al., 2007]. O presente trabalho demonstrou uma elevação do pH em todas as formulações testadas, com ênfase nos grupos Carvacrol 2% e Timol 1% que apresentaram os maiores aumentos de pH quando comparados ao pH salivar dos indivíduos antes da aplicação dos tratamentos com esses dentifrícios. Não há informações na literatura sobre a influência do carvacrol e timol no pH. Isso pode ser explicado pelo fato pelo aumento da estimulação salivar, o que aumenta a concentração de bicarbonato da saliva e, assim, aumenta o pH salivar [Islas-Granillo et al., 2014].

Da mesma forma, a capacidade tampão salivar apresenta um importante papel na prevenção da cárie, pois atua modulando o processo da cárie [Hegde et al., 2017]. O presente estudo demonstrou que as formulações contendo timol e carvacrol, tanto nas concentrações de

1% quanto nas de 2%, aumentaram a capacidade tamponante da saliva. O único grupo que não apresentou esse aumento foi o Controle que não continha óleos essenciais. A progressão e a regressão da cárie dentária dependem de um equilíbrio entre desmineralização e remineralização, os quais ocorrem frequentemente durante o dia na maioria das pessoas. Ao longo do tempo, este processo levará à cavitação dentária ou ao reparo e reversão da lesão, ou à manutenção [Featherstone, 2004]. A remineralização é frequente, especialmente quando o pH do biofilme é restaurado pela saliva, que atua como um amortecedor do baixo pH [Selwitz et al., 2007]. Isso demonstra que a capacidade tampão da saliva é um importante fator de resistência à cárie dental [Hegde et al., 2017].

O *S. mutans* é um importante microorganismo para colonização precoce nas superfícies dos dentes durante a formação da placa dentária [Hetrodt et al., 2018]. As propriedades acidogênicas do *S. mutans*, aliados a sua capacidade de sintetizar glucanos extracelulares, são os principais fatores envolvidos no desenvolvimento e no estabelecimento de biofilmes cariogênicos [Nomura et al., 2018]. Nas últimas décadas, os fitoterápicos têm assumido um papel importante como meio terapêutico alternativo na Odontologia, mediante às suas propriedades antimicrobianas frente às afecções bucais, principalmente as decorrentes do biofilme dental [Lobo et al., 2014; Ilic et al 2017]. Wang et al. [2016] demonstraram que o timol e carvacrol apresentaram eficácia antimicrobiana ao *S. mutans*, porém o timol apresentou maior atividade antimicrobiana que o carvacrol, o que também foi demonstrado no presente trabalho, no qual as duas formulações contendo timol reduziram significativamente o número de *S. mutans* após a escovação, porém não foi observado tal redução significativa nas formulações contendo carvacrol. De acordo com Nascimento et al. [2000] os testes e as avaliações da atividade antimicrobiana de óleos essenciais podem ser dificultados pela volatilidade do óleo, sua insolubilidade em água e complexidade química, assim estes fatores tornam os resultados da literatura difíceis de serem comparados. Este fato poderia ser a justificativa das formulações contendo carvacrol não terem apresentado os efeitos desejados já mencionados em estudos anteriores [Hwang et al., 2004; Botelho et al., 2007; Miladi et al., 2017].

Ao aplicar o questionário de satisfação após os tratamentos, foi observado que as formulações contendo Carvacrol 1% e 2% obtiveram altos escores na variável sensação de queimação. Este fato poderia ter influenciado na realização de uma mecânica de higienização satisfatória, que provavelmente foi obtida nos demais grupos. O mesmo foi visto nos estudos de Hur et. [2007] e Diniz et al. [2014] que ao testarem enxaguatórios bucais à base de óleos

essenciais perceberam efeitos adversos como sensação de queimação e ardência bucal relatados pelos pacientes dos estudos.

Alguns estudos têm mostrado a atividade antimicrobiana de substâncias naturais em dentifrícios. Lobo et al. [2014] utilizou substâncias naturais em dentifrícios e enxaguantes bucais tendo como controle a clorexidina 1% e 0,12%, respectivamente, por 5 dias e observou que a redução do nível de *S. mutans* foi maior e mais estável nos grupos onde a formulação consistia de dentifrício a base de óleo essencial. Ditterich et al. [2007] avaliaram a ação antimicrobiana *in vitro* de 7 cremes dentários compostos de substâncias naturais onde as formações de zonas de inibição foram observadas. Os autores concluíram que a adição de agentes antimicrobianos em dentifrícios pode atuar como um adjuvante no controle mecânico do biofilme dental. Outro estudo *in vitro* avaliou a atividade antimicrobiana de 9 dentifrícios contra *S. mutans* em indivíduos com níveis bacterianos elevados na saliva e observaram a inibição da *S. mutans*, concluindo que as combinações de ingredientes naturais podem ajudar a maximizar o desempenho de dentifrícios contra a principal bactéria que causa cárie dentária [Rosell et al., 2004].

O presente estudo conclui que a adição dos óleos essenciais em dentifrícios, como timol e carvacrol, eleva a taxa de fluxo salivar, pH e capacidade tampão salivar, principalmente os grupos contendo Carvacrol 2% e Timol 1%. Entretanto, a redução do nível de *S. mutans* foi observada apenas nos grupos Timol 1%, Timol 2% e Controle, sugerindo um efeito aditivo entre o flúor e os componentes antibacterianos presentes no óleo essencial Timol, e enfatizando a importância da remoção mecânica do biofilme dental no efeito antibacteriano contra *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

1. Aguiar GP, et al.: Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. *Natural product research* 2013,27(18):1668-1672.
2. Bardají DKR, et al.: Antibacterial activity of commercially available plant-derived essential oils against oral pathogenic bacteria. *Natural product research* 2016,30(10):1178-1181.
3. Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA, Brito GAC: Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007;40:349-356.
4. Dawes C: Factors influencing salivary flow rate and composition. *Saliva and oral health* 1996;27-33.
5. Diniz PA, Lima CF, Fernandes EE, Joias RP, Rode SDM: Percepção dos pacientes em uso de enxaguatórios bucais: óleos essenciais e cloreto de cetilperidíneo. *Revista da Associação Paulista de Cirurgios Dentistas* 2014;68(3):245-249.
6. Ditterich RG, Romanelli MC, Rastelli MC, Portero PP, Santos EBD :Atividade antimicrobiana in vitro de substâncias naturais presentes nos dentifrícios. *Odontol. clín.-cient* 2007;6(4):303-307.
7. Edgar WM, O'Mullane DM: *Saliva and oral health*. British Dental Association 2004.
8. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet*. 2007;6;369(9555):51-9
9. Featherstone JDB: The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *Journal of dental research* 2004;83(1_suppl):39-42.
10. Hegde R J, et al.: Comparative evaluation of the effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) and xylitol-containing chewing gum on salivary flow rate, pH and buffering capacity in children: An in vivo study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2017;35(4):332.
11. Hetrodt F, et al.: Natural saliva as an adjuvant in a secondary caries model based on *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology* 2018.
12. Hwang JK, Chung JY, Baek NI, Park JH: Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*. *International journal of antimicrobial agentes* 2004;23:377-381.

13. Humphrey SP, Williamson RT: A review of saliva: normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry* 2001;85(2):162-169.
14. Hur MH, Park J, Maddock-Jennings W, Kim DO, Lee MS: Reduction of mouth malodour and volatile sulphur compounds in intensive care patients using an essential oil mouthwash. *Phytotherapy Research* 2007;21(7):641-643.
15. Islas-Granillo H, et al.: Salivary parameters (salivary flow, pH and buffering capacity) in stimulated saliva of Mexican elders 60 years old and older. *The West Indian Medical Journal* 2014;63(7):758.
16. Kassebaum, NJ, et al.: Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *Journal of dental Research* 2015; 94(5):650-658.
17. Ilic DV, et al.: Traditional dentistry knowledge among Serbs in several Balkan countries. *Journal of intercultural ethnopharmacology* 2017; 6(2):223.
18. Lobo PLD, et al.: The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: a randomized, double-blind, controlled study. *Phytomedicine* 2014;21(8-9):1043-1047.
19. LUSSI Adrian, et al.: Toothbrushing after an erosive attack: will waiting avoid tooth wear?. **European journal of oral Sciences** 2014;122, 5:353-359.
20. Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL: Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology* 2000; 31:247-256.
21. Nomura R, et al.: Inhibitory effect of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate against adhesion and colonization by *Streptococcus mutans*. *Scientific reports* 2018;8(1):5056.
22. Papas AS, Joshi A, MacDonald SL, Maravelis-Splagounias L, Pretara-Spanedda P, Curro FA: Caries prevalence in xerostomic individuals. *Journal (Canadian Dental Association)* 1993;59(2):171-4.
23. Rosell FL, Valsecki-Júnior A, Silva SRC, Oliveira-Júnior LG: Atividade antimicrobiana de substâncias naturais em dentifrícios. *Saúde Rev* 2004;6:39-44.
24. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB: Dental caries. *The Lancet* 2007;369(9555):51-59.
25. Spak CJ, Johnson G, Ekstrand J: Caries incidence, salivary flow rate and efficacy of fluoride gel treatment in irradiated patients. *Caries research* 1994;28(5):388-393.

26. Yu OY, et al.: Dental Biofilm and Laboratory Microbial Culture Models for Cariology Research. *Dentistry Journal* 2017;5(2):21.
27. Wang TH, Hsia SM, Wu CH, Ko SY, Chen MY, Shih YH, Wu CY: Evaluation of the antibacterial potential of liquid and vapor phase phenolic essential oil compounds against oral microorganisms. *PloS one* 2016;11(9):e0163147.

Tabela 1. Comparação entre os momentos inicial e final das variáveis fluxo salivar, pH salivar e capacidade tampão salivar em cada grupo.

	Grupos	n	Momento	Média	Desvio padrão	p - valor
Fluxo salivar médio (mL/min)	Carvacrol 1%	8	Inicial	4,98	3,56	0,001*
			Final	7,78	3,56	
	Carvacrol 2%	8	Inicial	3,77	2,47	0,006*
			Final	5,96	2,66	
	Timol 1%	8	Inicial	5,23	3,66	0,001*
			Final	7,71	3,69	
	Timol 2%	8	Inicial	3,86	2,03	0,001*
			Final	7,27	3,81	
	Controle	8	Inicial	8,43	6,10	0,000*
			Final	11,36	6,89	
pH	Carvacrol 1%	8	Inicial	7,29	0,38	0,088
			Final	7,63	0,47	
	Carvacrol 2%	8	Inicial	7,22	0,43	0,004*
			Final	7,79	0,37	
	Timol 1%	8	Inicial	7,03	0,31	0,001*
			Final	7,6	0,34	
	Timol 2%	8	Inicial	7,46	0,27	0,118
			Final	7,77	0,58	
	Controle	8	Inicial	7,19	0,28	0,568
			Final	7,26	0,36	
Capacidade tampão salivar	Carvacrol 1%	8	Inicial	3,78	0,75	0,001*
			Final	4,90	0,81	
	Carvacrol 2%	8	Inicial	3,43	1,20	0,036*
			Final	4,95	1,03	
	Timol 1%	8	Inicial	3,34	0,96	0,009*
			Final	4,61	0,85	
	Timol 2%	8	Inicial	3,12	0,96	0,026*
			Final	4,1	1,34	
	Controle	8	Inicial	4,81	0,62	0,510
			Final	4,56	1,03	

* p -valor significativo ($p < 0,05$)

Teste t para dados pareados

Tabela 2. Comparação entre os momentos inicial e final da variável nº de *S. mutans* em cada grupo.

	n	Momento da contagem do nº de <i>S. mutans</i> (UFC/mL)	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p - valor
Carvacrol 1%	8	Inicial	3,84	0,67	3,97	2,82	4,73	0,057 ^a
		Final	2,72	1,82	3,31	0,00	4,67	
Carvacrol 2%	8	Inicial	1,29	0,73	4,13	2,73	5,06	0,093 ^b
		Final	3,29	1,47	3,40	0,00	4,54	
Timol 1%	8	Inicial	4,14	0,73	4,33	3,17	5,02	0,024 ^{*a}
		Final	2,49	1,70	2,99	0,00	4,59	
Timol 2%	8	Inicial	3,57	0,69	3,38	2,82	4,90	0,029 ^{*a}
		Final	2,38	1,61	2,51	0,00	4,04	
Controle	8	Inicial	3,51	0,59	6,64	2,73	4,18	0,012 ^{*b}
		Final	1,95	1,66	2,60	0,00	3,78	

* p -valor significativo (p<0,05)

^aTeste t para dados pareados para dados paramétricos

^bTeste de Wilcoxon Signed Rank para dados não-paramétricos

Tabela 3. Comparação entre os grupos das variáveis salivares de fluxo, pH, capacidade tampão e nº de *S. mutans* para comparação dos dados 2 a 2.

	Variáveis	df	F	p - valor
Inicial	Fluxo salivar	4	1,943	0,125
	pH		1,648	0,184
	Capacidade tampão		4,123	0,008*
	Nº de <i>S. mutans</i>		1,630	0,189
Final	Fluxo salivar		1,581	0,201
	pH		1,896	0,133
	Capacidade tampão		0,872	0,490
	Nº de <i>S. mutans</i>		0,697	0,599

* p -valor significativo (p<0,05)

Teste ANOVA

	Comparação entre grupos		Diferença média	Desvio padrão	p - valor
	Capacidade tampão inicial	Carvacrol 2%	Controle	-1,3762	0,4622
Controle		Carvacrol 2%	-1,3762	0,4622	0,039*
		Timol 1%	1,4625	0,4622	0,025*
		Timol 2%	1,6825	0,4622	0,007*
Timol 1%		Controle	1,4625	0,4622	0,025*
Timol 2%		Controle	1,4625	0,4622	0,025*

* p -valor significativo (p<0,05)

Pós-teste de Tukey

Tabela 6. Comparação entre os grupos por meio dos p-valores obtidos dos rankings (1 a 5) do questionário de satisfação aplicado após o uso das diferentes formulações de dentifrícios para as variáveis gosto, sintomas, náuseas, facilidade de uso, percepção olfativa, sensação de queimação e alteração de paladar.

Grupos comparados	Gosto	Sintomas	Náuseas	Limpeza oral	Facilidade de uso	Percepção olfativa	Sensação de queimação	Alteração de paladar
Carvacrol 2% - Timol 2%	0,416	0,074	0,317	0,653	0,608	0,027*	0,015*	0,871
Carvacrol 2% - Timol 1%	0,955	0,441	1,000	0,519	0,300	0,363	0,619	0,871
Carvacrol 2% - Controle	0,864	0,004*	0,064	0,808	0,608	0,048*	0,157	0,498
Controle – Carvacrol 1%	0,248	0,273	0,333	0,371	0,653	0,782	0,041*	0,646
Controle – Timol 2%	0,252	0,589	0,300	0,522	1,000	0,747	0,003*	0,664
Controle – Timol 1%	0,781	0,060	0,064	0,442	0,589	0,114	0,079	0,664
Carvacrol 1% - Timol 2%	0,738	0,822	0,927	0,086	0,653	0,517	0,045*	0,956
Carvacrol 1% - Timol 1%	0,324	0,364	0,317	0,037*	0,333	0,124	1,000	0,956
Timol 2% - Timol 1%	0,377	0,303	0,317	0,890	0,589	0,076	0,012*	1,000

* p -valor significativo ($p < 0,05$)

TesteMann-Whitney

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Todos as 5 formulações de dentifrícios aumentaram as taxas de fluxo salivar após a escovação independente da presença ou ausência dos óleos essenciais.
2. Os grupos Carvacrol 2% e Timol 1% demonstraram aumentar o pH salivar em comparação com o pH mensurado antes dos tratamentos.
3. Todas as formulações contendo os óleos essenciais Timol e Carvacrol melhoraram a capacidade tamponante da saliva. Apenas o grupo Controle não obteve a melhora da capacidade tampão.
4. Dentifrícios a base de Timol reduziram significativamente o número de *S. mutans* presentes na saliva, o mesmo ocorreu no grupo Controle, demonstrando que adição de óleos essenciais ricos em timol, podem agir de maneira aditiva aos dentifrícios contendo flúor.
5. Por se tratar de um estudo preliminar, futuras análises longitudinais precisam ser realizadas para verificar os efeitos desses óleos essenciais a longo prazo. Além disso, pesquisar forma de diminuir sensação de ardência bucal provocados pelos óleos essenciais, como nas formulações contendo carvacrol, afim de difundir seu uso na prática odontológica preventiva.

5. REFERÊNCIAS

BELDA-GALBIS, Clara Miracle et al. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. **Journal of Food Engineering**, v. 141, p. 37-43, 2014.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CARDOSO, Julia Gabiroboertz et al. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. **Archives of oral biology**, v. 65, p. 77-81, 2016.

CHAIEB, Kamel et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

DE ALMEIDA AGUIAR, Alciara Alice; SALIBA, Nemre Adas. Toothbrushing with vegetable oil: a clinical and laboratorial analysis Escovação dentária com óleo vegetal: análise clínica e laboratorial. **Braz Oral Res**, v. 18, n. 2, p. 168-73, 2004.

FEATHERSTONE, J. D. et al. Caries management by risk assessment: consensus statement, April 2002. **Journal of the California Dental Association**, v. 31, n. 3, p. 257, 2003.

FILOGÔNIO, Cíntia de Fátima Buldrini et al. A Efetividade de Óleos Essenciais no Controle Químico do Biofilme e na Prevenção da Cárie Dentária. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 3, 2011.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

ISMAIL A.I; SOHN W; TELLEZ M; AMAYA A; SEN A; HASSON H; PITTS N.B. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. **Community Dent Oral Epidemiol** v.35, p. 170-178, 2007.

GACHKAR, Latif et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 898-904, 2007.

GONZÁLEZ SANZ, Ángel Miguel; GONZÁLEZ NIETO, Blanca Aurora; GONZÁLEZ NIETO, Esther. Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. **Nutrición hospitalaria**, v. 28, p. 64-71, 2013.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection®**, v. 65, n. 4, p. 683-687, 2002.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. **Journal of dental research**, v. 94, n. 5, p. 650-658, 2015.

LANGEVELD, Wendy T.; VELDHUIZEN, Edwin JA; BURT, Sara A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LOBO, Patrícia Leal Dantas et al. Dose–response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 551-556, 2011.

LOBO, Patrícia Leal Dantas et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8, p. 1043-1047, 2014.

PANDEY, R. et al. Essential oils as potent source of nematocidal compounds. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 7-8, p. 501-502, 2000.

RAJKUMAR, S. et al. Repellent activity of selected plant essential oils against the malarial fever mosquito *Anopheles stephensi*. **Trop Biomed**, v. 24, n. 2, p. 71-75, 2007.

RAVIZZA, Raffaella et al. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. **Oncology reports**, v. 20, n. 3, p. 625, 2008.

RUFF, Ryan Richard; NIEDERMAN, Richard. Comparative effectiveness of school-based caries prevention: a prospective cohort study. **BMC oral health**, v. 18, n. 1, p. 53, 2018.

SALLI, K. M. et al. Influence of sucrose and xylitol on an early *Streptococcus mutans* biofilm in a dental simulator. **Archives of Oral Biology**, 2016.

SOUSA, Orlando V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 771-777, 2008.

TOUGER-DECKER, Riva; VAN LOVEREN, Cor. Sugars and dental caries. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 4, p. 881S-892S, 2003.

VALDEZ, Remberto Marcelo Argandoña et al. Comparative in vitro investigation of the cariogenic potential of bifidobacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 71, p. 97-103, 2016.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado, por Francisco César Monteiro Chaves Filho, como participante da pesquisa intitulada **“SEGURANÇA, EFICÁCIA ANTIBACTERIANA E AÇÃO ANTICÁRIE DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO LIPPIA SIDOIDES CHAM., CARVACROL E TIMOL: ESTUDO PILOTO, PROSPECTIVO, DUPLO-CEGO E RANDOMIZADO”**. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Estamos realizando esta pesquisa com o objetivo de avaliar o impacto de uma proposta de ação preventiva à doença cárie em adultos de 18 a 45 anos, assistidas pela Universidade Federal do Ceará.

Para isso, realizaremos uma rápida anamnese e um exame oral com você, a fim de realizamos o seu cadastro na pesquisa. Você terá que escovar os dentes com uma pasta dentária sorteada, com uma prévia instrução de higiene oral. Uma coleta de saliva será realizada antes e após a escovação de maneira não invasiva. Um questionário de satisfação também será aplicado a escovação de modo que nos ajude a selecionar as pastas de dente com os melhores efeitos antimicrobiano e aceitação pelo paciente. Você receberá um *kit* de higiene bucal e participará de atividade de instrução de higiene, como escovação dentária com pasta fluoretada ou com pasta fluoretada adicionada com um remédio para prevenir a doença cárie. Caso você precise de algum tratamento dentário, isso será feito gratuitamente na Clínica de Odontologia Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de medicamentos da Universidade Federal do Ceará, em dias e horários previamente agendados.

Não estão previstas formas de indenização de qualquer natureza, pois não existem riscos envolvidos.

Esclarecemos que a sua participação é voluntária e decorrente de sua livre decisão após receber todas as informações que julgar necessárias. Não haverá prejuízo de nenhuma forma caso sua vontade seja de não participar, podendo sair a qualquer momento do estudo sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Asseguramos que os seus dados individuais serão mantidos em sigilo e não serão divulgados em nenhuma hipótese, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto, sendo disponíveis a(o) senhor(a) a qualquer momento.

Endereço d(os, as) responsável(is) pela pesquisa:

1º Nome: Francisco César Monteiro Chaves Filho

Instituição: Universidade Federal do Ceará/ Curso de Odontologia

Endereço: Rua Monsenhor Furtado, s/n, Rodolfo Teófilo

Telefone: 3366 8420

2º Nome: Rebeca Bastos Vasconcelos Marinho

Instituição: Universidade Federal do Ceará/ Curso de Odontologia

Endereço: Rua Monsenhor Furtado, s/n, Rodolfo Teófilo

Telefone: 3366 8420

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, ____anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa _____

Data _____

Assinatura _____

Nome do pesquisador _____

Data _____

Assinatura _____

Nome da testemunha _____

Data _____

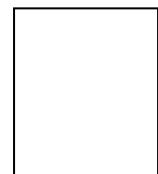
Assinatura _____

(se o voluntário não souber ler)

Nome do profissional que aplicou o TCLE _____

Data _____

Assinatura _____



APÊNDICE B
FICHA DE ANAMNESE
DADOS PESSOAIS

NOME _____
 IDADE _____ DATA DE NASCIMENTO _____
 ENDEREÇO _____
 TELEFONE PARA CONTATO _____ PESO _____ ALTURA _____

ESTADO GERAL DE SAÚDE

FAVOR LER E RESPONDER COM ATENÇÃO.

1) O voluntário se encontra sob tratamento médico? ()Sim ()Não

Para que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

2) O voluntário está tomando algum remédio? ()Sim ()Não

Quais? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

3) O voluntário tem algum tipo de alergia? ()Sim ()Não

A que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

4) O voluntário esteve recentemente hospitalizado? ()Sim ()Não

Para que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

5) Tem ou teve algum dos problemas de saúde abaixo relacionados?

()Hemorragia ()Convulsão com febre ()Convulsão sem febre ()Desmaio

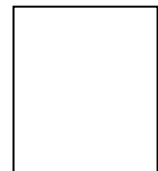
()Febre reumática () Pneumonia ()Diarréia ()Desidratação

()Anemia ()Hepatite ()Outras _____

Afirmo que as informações acima são verdadeiras.

Data: _____

Assinatura: _____



APENDICE C
QUESTIONÁRIO DE SATISFAÇÃO

Nº DO PACIENTE: _____

IDADE _____ DATA DE NASCIMENTO ____/____/_____

DATA: ____/____/_____

PASTA n^o _____

* Por favor marcar com o X o escore escolhido para cada classificação da pasta utilizada:

CLASSIFICAÇÃO	ESCORES				
	1 (Pobre)	2	3	4	5 (Excelente)
GOSTO					
SINTOMAS					
NÁUSEAS					
LIMPEZA ORAL					
FACILIDADE DE UTILIZAÇÃO					
PERCEPÇÃO OLFATIVA					
SENSAÇÃO DE QUEIMAÇÃO					
ALTERAÇÃO DO PALADAR					

TOTAL DE ESCORES: _____

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SEGURANÇA, EFICÁCIA ANTIBACTERIANA E AÇÃO ANTICÁRIE DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO LIPPIA SIDOIDES CHAM., CARVACROL E TIMOL: ENSAIO CLÍNICO PROSPECTIVO, DUPLO CEGO, RANDOMIZADO, CRUZADO.

Pesquisador: Rebeca Bastos Vasconcelos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57022816.7.0000.5054

Instituição Proponente: Faculdade de Educação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.615.755

Apresentação do Projeto:

O aumento da procura por novos antimicrobianos devido a prevalência de resistência microbiana, levou várias investigações sobre os efeitos dos óleos essenciais. O presente projeto objetiva avaliar a eficácia da prevenção de cárie dentária, segurança e aceitabilidade de diferentes dentifrícios à base de óleos essenciais em diferentes concentrações associados ao flúor, comparados à eficácia de dentifrício contendo somente flúor em crianças. A amostra foi composta por crianças de ambos os gêneros, de 7 a 11 anos, livres de lesões cáries ativas, mas com alto risco de cárie, vinculadas a Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza (CE). O desenho consistirá de um ensaio clínico duplo cego, randomizado. Uma primeira fase visará estabelecer a melhor formulação de dentifrício (combinação óleo essencial + flúor) e dose para teste clínico, bem como a formulação/dose de óleo de melhor aceitação clínica. Na segunda fase será conduzida para teste das formulações eleitas na 1ª fase do estudo (cross over ou estudo cruzado), e se seguirá por período de 12 meses (estudo prospectivo). Protocolo analítico será realizado em ambas as fases para análise dos Streptococcus Mutans, Lactobacilos, capacidade tampão e pH, além da mensuração do fluxo salivar. Em ambas as fases, será solicitado resposta de questionário de satisfação ao retomar para acompanhamento e apenas na fase 2, serão solicitados exames complementares de urina e sangue. Os dados serão tabulados para análise estatística, sendo

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Telefone: (85)3366-8344

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.615.755

considerados os resultados com nível de significância 0,05.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a eficácia da prevenção de cárie dentária, segurança e aceitabilidade de diferentes dentifrícios à base de óleos essenciais em diferentes concentrações associados ao flúor, comparados à eficácia de dentifrício contendo somente flúor em crianças de alto risco à cárie.

Objetivo Secundário:

Na fase 1 do estudo busca-se avaliar:

- Eficácia antibacteriana dos óleos essenciais testados quando associados ao flúor;
- Aceitabilidade dos pacientes ao produto;
- Efeitos adversos na mucosa oral. Na fase 2 do estudo busca-se avaliar prospectivamente:
 - Efeito anti-cárie dos dentifrícios eleitos ao término da fase 1, contendo os óleos essenciais que demonstraram melhor eficácia antibacteriana, segurança e aceitabilidade por parte das crianças;
 - Efeito antibacteriano destes dentifrícios;
 - Segurança dos produtos testados por meio de exames complementares hematológicos da função hepática e sumário de urina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Este estudo apresenta risco mínimo, isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras como conversar, tomar banho, ler etc.

Benefícios:

A associação de óleos essenciais no dentifrício seria uma forma simples e eficaz de administração de agentes terapêuticos. Não interfere na rotina de higienização do paciente infantil ao ser aplicada na escovação dentária, favorecendo o controle do biofilme dental. Um simples procedimento preventivo comprova que inovação tecnológica não requer necessariamente altos investimentos e a aplicabilidade do dentifrício além de simples é altamente eficaz na redução dos índices de cárie, com baixo custo e alto impacto para quem mais necessita (Zero et al., 2004) Sugere um método eficaz de prevenção à cárie dentária utilizando-se medidas simples, de baixo custo, e portanto úteis numa perspectiva de saúde bucal para pacientes pediátricos. Acredita-se que o uso de dentifrício fluoretado contendo óleos essenciais de origem vegetal têm o potencial de tornarem-se uma ação de baixo custo de prevenção à cárie em crianças.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPEAQ



Continuação do Parecer: 1.615.755

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância para a área de prevenção de cárie em odontologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram entregues e devidamente assinados.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_725437.pdf	14/06/2016 23:07:59		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_725437.pdf	14/06/2016 23:04:46		Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO_NOVA.pdf	14/06/2016 23:03:27	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Oleos_PLATAFORMA1.doc	14/06/2016 23:02:12	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODEASSENTIMENTO.doc	14/06/2016 23:01:49	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODECONSENT.doc	14/06/2016 23:01:36	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA2.pdf	07/06/2016 21:21:25	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA1.pdf	07/06/2016 21:19:56	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO2.pdf	07/06/2016 21:18:48	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO1.pdf	07/06/2016 21:17:47	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO.pdf	07/06/2016 20:39:19	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.615.755

Outros	CARTA_DE_SOLICITACAO.pdf	07/06/2016 20:37:16	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CONCORDANCIA_TODOS.pdf	07/06/2016 20:30:19	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INSTITUCIONAL_DR_ALEXANDRE.pdf	07/06/2016 20:17:14	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INSTITUCIONAL_DR_ODORICO.pdf	07/06/2016 20:15:54	Rebeca Bastos Vasconcelos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 30 de Junho de 2016

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B

Instruções para autores do “Caries Research”

Guidelines for Authors

www.karger.com/cre_guidelines

Aims and Scope

Submission

Plagiarism Policy

Conditions

Types of Papers

Preparation of Manuscripts

Color Illustrations

References

Color Illustrations

Supplementary Material

Digital Object Identifier (DOI)

Self-Archiving/Green Open Access, *Author's Choice*[™],

Funding Organizations (NIH etc.)

Page Charges

Proofs

Reprints

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are

outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online.

Should you experience problems with your submission, please contact

Prof. David Beighton

(Editor-in-Chief, Caries Research)

Department of Microbiology

The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research

KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower

London Bridge SE1 9RT (UK)

Tel. +44 2071887465

Fax +44 2071887466

cre@karger.com

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e-mail addresses of three potential reviewers for your manuscript.

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission.

Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.

If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of Caries Research and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

For legal reasons, we must receive your ['Submission Statement](#)' with your original (hand-written) signature. Please download, print, sign and either fax or scan it to make it legally binding.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications. Authors of papers describing research on human subjects are required to state that they have adhered to the Declaration of Helsinki.

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope. Reviews are not subject to page charges.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must be numbered consecutively from the title page until the last page.

Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the

manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki ([World Medical Association](#)). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript.

Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the [CONSORT Statement](#). The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at [clinicaltrials.gov](#) or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the first patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number].

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes](#) and/or the [National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surfacesoftened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few

sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
 - Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
 - Figures with a screen background should not be submitted.
 - When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).
-

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 960.00 per page.

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Examples

(a) *Papers published in periodicals*: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.

(b) *Papers published only with DOI numbers*: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs*: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) *Edited books*: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) *Patents*: Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) *World Wide Web*: Chaplin M: Water structure and behavior. www.lsbu.ac.uk/water, 2004.

Supplementary Material

Multimedia files and other supplementary files, directly relevant but not essential to the conclusions of a paper, enhance the online version of a publication and increase its visibility on the web. These files will undergo editorial review. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Multimedia and supplementary material should meet production quality standards for publication without the need for any modification or editing. Files should not exceed 10 MB in size. Figures and tables need to have titles and legends, and all files should be supplied separately and labeled clearly. All supplementary material should be referred to in the main text. A DOI number will be assigned to supplementary material and it will be hosted online at <https://karger.figshare.com> under a CC BY license. Authors will be charged a processing fee of CHF 250.00 for supplementary material.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Self-Archiving/Green Open Access

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-peer review) or post-prints (i.e. accepted manuscript after peer review but before production) on their personal or their institution's internal website. In addition, authors may post their accepted manuscripts in public Open Access repositories and scientific networks (e.g. ResearchGate or Mendeley) no earlier than 12 months following publication of the final version of their article. For all self-archiving, the posted manuscripts must:

- Be used for noncommercial purposes only
- Be linked to the final version on www.karger.com
- Include the following statement:

'This is the peer-reviewed but unedited manuscript version of the following article: [insert full citation, e.g. Cytogenet Genome Res 2014;142:227–238 (DOI: 10.1159/000361001)]. The final, published version is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).'

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Manuscripts to be archived in PubMed Central due to funding requirements will be submitted by Karger on the author's behalf [see Funding Organizations (NIH etc.)].

For self-archiving Author's Choice™ (Gold Open Access) articles, see Author's Choice™.

Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

The final, published version of the article may be posted at any time and in any repository or on other websites, in accordance with the relevant Creative Commons license. Reposted Open Access articles must:

- Follow the terms of the relevant Creative Commons license
- Be linked to the final version on www.karger.com
- Include the following statement:

‘The final, published version of this article is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).’

It is the author’s responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Funding Organizations (NIH etc.)

The U.S. National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy mandates that accepted, peer-reviewed manuscripts are archived in its digital database, PubMed Central (PMC), within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits NIH-funded articles to PMC on behalf of the authors immediately upon publication. The NIH assigns a PMCID within approximately 1 month and the manuscript will appear in PMC after a 12-month embargo. For authors making their paper Open Access through Author's Choice™, the embargo will be overridden, thereby accelerating the accessibility of the article. Karger also complies with other funders’ requirements (including Wellcome Trust and RCUK) for submission to PMC.

Authors should include information on their grant in the Acknowledgements section of their papers.

There are no page charges for papers of six or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted six printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 18 double-spaced typescript pages (including tables, illustrations and references).

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.