



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

Marcela Agne Alves Valones

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM DENTIFRÍCIO A BASE DO EXTRATO DE
Rosmarinus officinalis Linn., QUANTO AO SANGRAMENTO GENGIVAL E
PRESENÇA DE PLACA BACTERIANA ATRAVÉS DE ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO-CEGO**

RECIFE-PE
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

Marcela Agne Alves Valones

AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM DENTIFRÍCIO A BASE DO EXTRATO DE
Rosmarinus officinalis Linn., **QUANTO AO SANGRAMENTO GENGIVAL E**
PRESENÇA DE PLACA BACTERIANA ATRAVÉS DE ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO-CEGO

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Arnaldo de F. Caldas Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo R. E. Souza

RECIFE-PE
2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- V198a Valones, Marcela Agne Alves.
Avaliação clínica de um dentífrico a base do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn., quanto ao sangramento gengival e presença de placa bacteriana através de ensaio clínico randomizado controlado duplo-cego / Marcela Agne Alves Valones. – 2016.
59 f.: il.; 30 cm.
- Orientadora: Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2016.
- Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Rosmarinus officinalis. 2. Fitoterapia. 3. Sangramento gengival. 4. Placa bacteriana. 5. Dentífrico herbal. I. Carvalho, Alessandra de Albuquerque Tavares (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2017-226)

MARCELA AGNE ALVES VALONES

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM DENTIFRÍCIO A BASE DO EXTRATO DE
Rosmarinus officinalis Linn., QUANTO AO SANGRAMENTO GENGIVAL E
PRESENÇA DE PLACA BACTERIANA ATRAVÉS DE ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO-CEGO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

APROVADA EM: 18 de Fevereiro de 2016.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alcino Gueiros

Profa. Dra. Kátia Simone Alves dos Santos

Profa. Dra. Jane Sheila Higinio

Prof. Dr. Gustavo Pina de Godoy

Profa. Dra. Márcia Maria Vendiciano Barbosa Vasconcelos

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque T. Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

COLEGIADO - MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Profa. Dra. Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Profa. Dra. Andrea Cruz Câmara

Profa. Dra. Andrea dos Anjos Pontual

Prof. Dr. André Vajgel Fernandes (Pós-Doc)

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa. Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Profa. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

A Deus, pelo dom da vida!

Aos meus pais, os maiores exemplos da minha vida, que, séria e rigorosamente, me mostraram sempre que o estudo é um dos melhores caminhos de luta por uma vida autônoma, digna e decente.

A Miguel, meu filho querido, ainda tão pequeno, mas, uma criança linda, carinhosa, inteligente; um ser humano intenso, que me ensina, todos os dias, de forma lúdica e divertida, grandes e verdadeiras lições de humanidade e amorosidade.

A Marcelo, irmão querido, grande profissional, companheiro, suporte, presença segura, que, com um verdadeiro espírito de fraternidade e solidariedade, está sempre comigo, em todos os momentos, lutando, também, como eu, por um trabalho sério, competente e cuidadoso, na área da Odontologia.

A minha “voinha” Neusa e à minha tia Nelbe, duas grandes referências de mulheres, que me acolheram como filha e me alimentaram de mil maneiras, em toda minha vida e, especialmente, durante o doutorado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado, por subsidiar toda estrutura necessária à conclusão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação.

À Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) da Universidade Federal de Pernambuco.

Aos que fazem o Programa de Pós-Graduação em Odontologia, professores e funcionários, na pessoa da coordenadora Prof. Dra. Alessandra de A. T. Carvalho, pelo apoio e pelo esforço em melhorar a qualidade do referido Programa.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Alessandra de A. T. Carvalho, pela orientação cuidadosa e por estar ao meu lado, caminhar comigo desde o mestrado, acreditando e apostando na minha vontade de estudar e crescer profissionalmente. Essa é uma parceria da qual nunca me esquecerei! A professora Dra. Alessandra Carvalho provocou profundas transformações na minha vida pessoal e acadêmica.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Arnaldo Caldas, verdadeiro suporte na orientação da minha pesquisa e educador entusiasmado com as minhas conquistas, ser humano de singulares qualidades, por me deixar segura, por seus estímulos e por acreditar nas minhas potencialidades. Também é uma parceria que ficará na minha memória!

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Souza, co-orientador, que me auxiliou nas atividades laboratoriais, ensinando-me, sem perceber, a importância das tentativas. Sem suas orientações e tentativas, não teríamos conseguido chegar aos acertos. Muito obrigada!

Aos meus tios Jorge e Jonas, pelo apoio e disponibilidade junto a Miguel, dando-me tranquilidade nos muitos momentos de estudo e trabalho. Disponíveis em todos os momentos, sempre foram, para mim, símbolos de proteção e segurança.

A tio Cláudio, grande suporte, tia Nelbe, Sandra e Thamires, que também “tomaram conta” de Miguel para me ajudar nessa jornada. É difícil expressar tamanha gratidão pelo apoio e pela acolhida recebida no dia a dia e durante todo o tempo da pesquisa.

Aos meus familiares que, de perto ou de longe, em todos os momentos e em todos os sentidos, têm me dado exemplos de união, de força, mostrando que, em meio às adversidades, precisamos estar juntos para enfrentar os desafios e celebrar as conquistas da nossa vida.

À Prof. Janete Magali de Araújo, por ter colaborado intensamente com a minha pesquisa, com seus consistentes conhecimentos na área de Microbiologia. Sua intervenção foi de importância fundamental no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos meus companheiros de doutorado, Jalber Almeida, Thiago Cavalcanti e Michely Cauás, que, através de estudos, reflexões e discussões, fizeram intensas aprendizagens junto a mim.

A Lorraine Tenório, parceira, cúmplice e amiga que, com uma enorme disponibilidade, ajudou-me e interferiu decisivamente na dimensão clínica da pesquisa.

Às alunas da Iniciação Científica, Pricila Terto e Rhayssa Celerino, que empreenderam todos os esforços para atender às necessidades da pesquisa. Com o seu apoio imprescindível, pudemos chegar a excelentes resultados ao final do trabalho.

Aos alunos do laboratório Genoma: Géssica Lima, Isaura Silva, Yasmim Lopes, Maria Eduarda Andrade, que estiveram sempre disponíveis e colaboraram intensivamente nos momentos das atividades laboratoriais.

Ao amigo Luiz Alcino, que durante as nossas conversas sobre a difícil fase laboratorial, trouxe significativas contribuições, além de uma palavra de conforto.

À Fátima Maria, Técnica do Laboratório de Microbiologia, que com uma constante disponibilidade, abriu as portas do Laboratório para a realização da pesquisa, ajudando-me no desenvolvimento das atividades neste espaço.

Aos meus companheiros de consultório, Flavinha, Joelma, Elisângela, Eliane e Fábio, por participarem de momentos alegres e tristes, no meu dia a dia, quando chegava com as várias notícias sobre o andamento da pesquisa.

Às funcionárias, Oziclere Sena, D. Tânia de Souza, Ianê Pessoae Thamires Cibebe, que foram grandes colaboradoras nas tarefas burocráticas, contribuindo, assim, para o sucesso do meu trabalho.

À Sensorialle[®]- Manipulação Cosmética e Farmacêutica - na pessoa da farmacêutica Germana Benevides, pela manipulação exemplar dos dentifrícios.

Ao estatístico Jansen Campos, por ilustrar e interferir nos dados estatísticos da pesquisa, com os seus importantes saberes e conhecimentos nesta área.

*Vamos precisar de todo mundo
Um mais um é sempre mais que dois
Prá melhor juntar as nossas forças...*

Beto Guedes

RESUMO

Objetivo: o objetivo deste estudo foi investigar a ação de um dentifrício à base do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim), através de um ensaio clínico randomizado, controlado, aberto e duplo cego. **Material e Métodos:** cento e dez voluntários, que preencheram os critérios de inclusão, foram randomizados em dois grupos, A e B, de acordo com os dentifrícios utilizados e avaliados antes e após 30 dias do estudo, onde foram registrados os Índices de Sangramento Gengival (IG) e de Placa (IP). A análise dos dados foi realizada calculando-se o efeito dos dois dentifrícios na redução do sangramento gengival e de placa, através de medidas como Excesso Relativo de Risco (ERR), Redução Relativa do Risco (RRR), Redução Absoluta do Risco (RAR) e o Número Necessário de Tratamento (NNT). **Resultados:** houve equivalência entre os dois dentifrícios em relação à redução do risco de sangramento gengival em termos relativos e absolutos (A reduziu em 38% ERR= 0,38; B reduziu em 29,3% ERR=0,293; A e B reduziram em 18% RAR= 0,18), em relação à eficácia da redução da placa bacteriana (A reduziu em 22,7% RRR=0,227; B reduziu 28% RRR= 0,28) e em relação ao número necessário de pacientes para tratamento do sangramento e da redução de placa (A e B NNT=5; A e B NNT=7, respectivamente). **Conclusão** O dentifrício de Alecrim se mostrou efetivo quanto ao sangramento gengival e redução de placa bacteriana em comparação ao dentifrício convencional. **Relevância Clínica:** o dentifrício de Alecrim é um produto viável clinicamente em comparação ao dentifrício convencional.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. Fitoterapia. Sangramento gengival. Placa bacteriana. Dentifrício herbal.

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to investigate the action of a toothpaste made from the extract of *Rosmarinus officinalis* Linn. (rosemary) in a clinical randomized, controlled, open and double-blind trial. **Material and Methods:** One hundred and ten volunteers fulfilled the inclusion criteria and were randomly separated into two groups according to the toothpastes used: Group A (experimental) and Group B (control). They were assessed at baseline and 30 days after the study using the gingival bleeding index (GBI) and the plaque index (PI). Data analysis was conducted to calculate the effects of the two toothpastes on gingival bleeding and plaque, using measurements such as the excess relative risk (ERR), the Relative Risk Reduction (RRR), the Absolute Risk Reduction (ARR) and the Number Needed for Treatment (NNT). **Results:** The two toothpastes provided similar results in terms of the reduction in the risk of gingival bleeding (relative and absolute): a reduction of 38% in Group A, ERR= 0.38; a reduction of 29.3% in Group B, ERR=0.293; A and B reduced by 18% ARR= 0.18). The reductions in bacterial plaque were also similar (22.7% reduction in Group A, RRR=0.227; 28% reduction in Group B, RRR= 0.28). The number needed for treatment values for bleeding and plaque were A and B NNT=5 and A and B NNT=7, respectively. **Conclusion:** The rosemary-based toothpaste effectively treated gingival bleeding and reduced bacterial plaque, when compared with conventional toothpaste. **Clinical Relevance:** The rosemary-based toothpaste is a clinically viable product, when compared with conventional toothpaste.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*. Phytotherapy. Gingival bleeding. Bacterial plaque. Herbal toothpaste.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
IPA	Instituto de Pesquisas Agrícolas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DL ₅₀	Dose letal 50%
OMS	Organização Mundial de Saúde
ISG	Índice de Sangramento Gengival
IP	Índice de Placa
CCI	Coeficiente de Correlação Interclasse
REBEC	Registro Brasileiro de Ensaios ClínicosERR (Excesso Relativo de Risco
RRR	Redução relativa do Risco
RAR	Redução Absoluta do Risco
NNT	Número Necessário para Tratar

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	14
2	AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM DENTIFRÍCIO A BASE DO EXTRATO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn., QUANTO AO SANGRAMENTO GENGIVAL E PRESENÇA DE PLACA BACTERIANA ATRAVÉS DE ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO CEGO.....	15
2.1	Introdução.....	15
2.2	Materiais e Métodos.....	17
2.3	Resultados.....	20
2.4	Discussão.....	22
3	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS.....	27
	APÊNDICES.....	31
	Apêndice 1 - Fluxograma.....	31
	Apêndice 2 - Tabela 1 Comparação do sexo e a idade em relação ao uso dos Dentifrícios.....	32
	Apêndice 3 - Tabela 2 Evolução dos pacientes quanto aos Índices de sangramento gengival e Placa em relação ao uso dos Dentifrícios A e B.....	33
	Apêndice 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	34
	Apêndice 5 - Ficha Clínica.....	37
	ANEXOS.....	39
	Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética.....	39
	Anexo 2 - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos.....	42
	Anexo 3 - Normas da Revista <i>Clinical Oral Investigation</i>	47

1 APRESENTAÇÃO

Esta tese foi estruturada sob a forma de artigo científico a ser enviado ao periódico *Clinical Oral Investigation*. Procurou-se avaliar clinicamente um produto de higiene bucal contendo um extrato de planta medicinal, na tentativa de criar um produto compatível ao que se tem disponível comercialmente. Para isso, utilizou-se uma metodologia já comprovada cientificamente, com um desenho de estudo satisfatório aos métodos. Os resultados ressaltaram os desafios de um ensaio clínico e o bom desempenho do produto testado, permitindo-se concluir a viabilidade deste produto. Todos os referenciais teóricos consultados são apresentados após o artigo. Este documento ainda apresenta a produção científica discente realizada durante todo o percurso da Pós-Graduação.

2 AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM DENTIFRÍCIO A BASE DO EXTRATO DE *Rosmarinus officinalis* Linn., QUANTO AO SANGRAMENTO GENGIVAL E PRESENÇA DE PLACA BACTERIANA ATRAVÉS DE ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO CEGO

2.1 Introdução

O acúmulo de placa bacteriana, ou biofilme dental, ainda representa uma preocupação para a odontologia, pois está relacionado com a etiologia de doenças importantes como cárie, doença periodontal e halitose, sendo assim, a importância do controle deste biofilme para a saúde bucal é um fato bem explorado na literatura [1, 2, 3]. Além da remoção mecânica da placa bacteriana através da escovação, a clorexidina na concentração de 0,2% se tornou a substância padrão internacional para o seu controle; no entanto, por se tratar de um produto químico, apresenta uma série de efeitos adversos, como alteração do paladar, manchamento dos dentes, língua e restaurações, dentre outras [4, 5].

Os dentifrícios utilizados atualmente apresentam objetivos cosméticos e terapêuticos, pois auxiliam na limpeza da superfície dentária, refrescando o hálito e combatem a progressão da lesão de cárie e acúmulo de placa bacteriana, promovendo efeito anti-inflamatório [4]. Existem vários dentifrícios à base de plantas disponíveis no mercado; e esta é uma realidade para um público crescente que valoriza uma medicina natural e livre de produtos sintéticos [6]. Os produtos herbais, por se tratarem de produtos naturais, não se mostram apenas econômicos, mas, também, têm menos efeitos indesejáveis, sendo universalmente aceitos pelos seus efeitos benéficos [7].

Rosmarinus officinalis Linn., conhecido no Brasil como “Alecrim”, é um arbusto aromático de pequeno porte, nativo da região do Mediterrâneo e pertencente à família

Lamiaceae. Trata-se de uma planta medicinal com propriedades terapêuticas antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes, dentre inúmeras outras, e é muito usada como erva aromatizante na indústria alimentícia. Suas folhas são a grande fonte de suas propriedades, sendo composto por Terpenóides, Flavonóides, Fenóis e Óleo Essencial. Cada componente tem sua função nas propriedades farmacológicas da planta, o que a torna uma excelente matéria prima para produtos com múltiplas funções terapêuticas [8, 9, 10, 11]. Vários extratos de plantas, dentre eles, o de Alecrim, têm alcançado o poder de inibir a formação do biofilme dental, através da redução da adesão de patógenos nas superfícies dentárias, evitando o primeiro evento para a iniciação das patologias causadas pela sua formação [8, 12, 13].

O aumento crescente de substâncias naturais incorporadas aos produtos odontológicos, acompanhado pela escassez de pesquisas na literatura sobre a segurança e eficácia desses produtos são importantes justificativas para mais estudos sobre o assunto. Aliada a estas carências, a evidência científica acerca das propriedades terapêuticas do Alecrim [10, 11, 13, 14], acenaram, também, cientificamente, para a elaboração de um dentifrício à base do extrato de Alecrim e sua avaliação clínica.

Assim, este ensaio clínico randomizado, controlado, aberto e duplo cego teve por objetivo investigar a ação de um novo dentifrício cosmecêutico (cosmético com ação terapêutica), à base do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim), sobre a placa bacteriana e sangramento gengival, comparando-o a um dentifrício convencional, fluoretado, disponível comercialmente.

2.2 Materiais e Métodos

Este estudo caracterizou-se como um ensaio clínico randomizado do tipo duplo-cego, controlado, aberto, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, sob nº 02576212.1.0000.5208, e realizado no período de 2013 e 2014, na Clínica de Estomatologia do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva da mesma Universidade. Todos os sujeitos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), obedecendo à resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, após a explicação dos objetivos (Fig.1).

Sujeitos do estudo

Os voluntários eram pacientes da referida clínica, sendo selecionados à medida que chegavam para serem atendidos. Com base no estudo-piloto, a amostra foi determinada através do programa PC-SIZE, versão 1.01(c), 1990 (Gerard E. Dallal, Andover, MA, USA), considerando erro tipo 1 de 5% e IC= 95%. 250 voluntários foram avaliados por elegibilidade, onde 140 foram excluídos por não cumprirem os critérios de inclusão, por recusa de participação, ou por outras razões. Assim, 110 sujeitos preencheram os seguintes critérios de inclusão: ambos os gêneros, idades entre 18 e 45 anos, no mínimo 20 dentes hígidos na cavidade bucal, e ausência de gengivite, periodontite e lesões de cárie ao exame visual e sondagem com sonda periodontal milimetrada. Foram excluídos do estudo: fumantes, gestantes, diabéticos, usuários de drogas xerostomizantes, que estivessem fazendo uso de antibiótico, anti-inflamatório ou antifúngico naquele momento e portadores de aparelho ortodôntico.

Preparo do dentifrício à base de Alecrim

O material botânico *Rosmarinus officinalis* Linn. foi adquirido em mercado público local e identificado através de comparação com material já depositado por Bento Pickel, nº 1641, no Herbário do Instituto de Pesquisas Agrícolas de Pernambuco (IPA). O extrato etanólico do alecrim foi produzido, em grande quantidade, no Laboratório de Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e encaminhado à farmácia de manipulação SENSORIALE® - Manipulação Farmacêutica e Cosmética - (Recife-PE), para incorporação à formula de um dentifrício. Neste processo, foram realizados testes dos caracteres organolépticos como: cor, sabor, odor, além de serem também avaliados a viscosidade, abrasividade, brilho, pH e qualidade de espuma[15]. Na composição do dentifrício, foi respeitada a DL₅₀ do alecrim [16], como parâmetro de segurança, obtendo-se um dentifrício final com 5% de concentração do extrato.

Protocolo do estudo

Ao ingressar no experimento, os voluntários foram randomizados para os grupos A ou B, através da técnica dos envelopes opacos, os quais se encontravam selados e numerados de acordo com a sequência aleatória na qual os sujeitos eram admitidos para o estudo. Os envelopes lacrados continham a letra correspondente ao respectivo grupo. Por se tratar de um estudo duplo-cego, tanto o pesquisador, quanto os voluntários não tinham conhecimento acerca do dentifrício sorteado. Para este cegamento, os produtos foram mascarados pela farmacêutica responsável, que era a única detentora da identidade dos dentifrícios. Após o término do ensaio clínico, a identidade dos dentifrícios foi revelada: o grupo A utilizou o dentifrício experimental e o grupo B utilizou o dentifrício convencional fluoretado

comercializado no Brasil (SorrisoDentes Brancos[®], Colgate-Palmolive, Osasco, SP). A escolha do dentifrício B se deu pela presença de flúor e menos aditivos em sua fórmula. Assim, 55 pacientes compuseram o grupo A (experimental-dentifrício de Alecrim); e 55 compuseram o grupo B (controle-dentifrício fluoretado).

Após o processo de seleção e randomização, os pacientes iniciaram os experimentos, quando foram submetidos a dois momentos do estudo, descritos a seguir:

1^o momento do estudo – Baseline: foi realizado exame clínico e registrado o “Índice de Sangramento Gengival” (ISG), [17] e o “Índice de Placa” (IP), [18].

O ISG consiste no exame de todas as superfícies dos dentes (vestibular, lingual, mesial e distal). A presença ou ausência de sangramento gengival é determinada por uma suave inspeção do sulco gengival, com Sonda Periodontal, do modelo da Organização Mundial de Saúde (OMS). A presença de sangramento indica uma contagem positiva, expressa como uma porcentagem do número total de margens gengivais examinadas.

O IP consiste no exame das superfícies vestibulares e linguais de todos os dentes, após terem sido corados com “fucsina básica”, usando marcações numéricas, de 0 a 5, que variam de acordo com o grau de pigmentação pelo corante. A contagem da placa é obtida através da soma dos escores verificados e divididos pelo número de faces examinadas.

Em seguida, cada voluntário recebeu uma escova, acompanhada de um dentifrício, de acordo com o seu grupo, A ou B. Todos foram orientados a manter seus hábitos de higiene normais, e a usar exclusivamente aquele dentifrício, por um período de 30 dias, época em que voltariam ao Serviço, para dar continuidade ao experimento.

2^o momento do estudo: decorridos 30 dias, os voluntários retornaram ao Serviço, trazendo os tubos de dentifrícios vazios. Foram realizados os mesmos procedimentos do 1^o momento, obtendo-se novos registros de ISG e IP.

Uma única examinadora do experimento foi previamente calibrada e a concordância intraexaminadora foi avaliada através do Coeficiente de Correlação Interclasse (CCI), que é o equivalente ao Coeficiente Kappa, para variáveis do tipo “contínuas”. A concordância foi 0,878, para o índice de Placa com p-valor $p < 0,001$. Em relação ao sangramento gengival, a mesma foi treinada para que fizesse uma sondagem suave com aproximadamente 25g de peso.

O ensaio clínico foi registrado no REBEC (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos-www.rebec.com.br), sob n^o RBR-9F3CTB.

Análise dos dados

A análise estatística foi realizada no software estatístico SPSS versão 17.0. Para este ensaio clínico calculou-se o efeito dos dois dentifrícios na redução do sangramento gengival e de placa bacteriana entre os dois momentos dos exames (Baseline e 30 dias). Ainda calculou-se o Excesso Relativo de Risco (ERR), Redução Relativa do Risco (RRR), Redução Absoluta do Risco (RAR) e o Número Necessário de Tratamento (NNT).

2.3 Resultados

O grau de participação da amostra foi de 91,81%. A amostra final, de 101 pacientes, apresentou a idade média de $30,48 \pm 5,90$ anos, com idade mínima de 18 e máxima de 43 anos; destes, 39 (38,61%) eram homens e 62 (61,38%) eram mulheres (Tabela 1). Desta amostra, 46

pertenciam ao Grupo A, ou seja, usaram o dentifrício A (experimental) e 55 pertenciam ao grupo B (controle). Foram avaliados o ISG e IP no momento inicial e ao final de 30 dias do uso de cada dentifrício.

A evolução dos pacientes, quanto ao sangramento gengival e quanto à presença de placa, em relação ao uso dos dentifrícios A e B, pode ser verificada na tabela 2.

Ao analisar os dados da tabela 2 e calcular medidas construídas através de razões ou diferenças entre os grupos A e B, verificou-se que o uso do dentifrício A reduziu em 38% o risco de sangramento gengival nos pacientes ($ERR= 0,38$). Em termos absolutos, a redução desse risco foi de 18% ($RAR= 0,18$). Além disso, usando-se o dentifrício A, preveniu-se 1 caso de sangramento a cada 5 pacientes tratados ($NNT=5$). Da mesma forma, os dados mostraram que o uso do dentifrício B reduziu em 29,3% o risco de sangramento gengival ($ERR=0,293$). Em termos absolutos, a redução desse risco foi, também, de 18% ($RAR= 0,18$). Com isso, utilizando-se o dentifrício B, preveniu-se 1 caso de sangramento a cada 5 pacientes tratados ($NNT= 5$). Quanto ao índice de Placa, verificou-se que a eficácia do tratamento com o dentifrício A foi de 22,7% ($RRR= 0,227$). Em termos absolutos, o risco de aumento da quantidade de placa foi de 14% ($RAR= 0,14$). Assim, usando-se o dentifrício A, preveniu-se 1 caso de aumento de placa, a cada 7 pacientes tratados ($NNT=7$). Semelhantemente, a eficácia do tratamento com o dentifrício B foi 28% ($RRR= 0,28$). Em termos absolutos, o risco de aumento da quantidade de placa foi de 14% ($RAR= 0,14$). Assim, da mesma forma, usando-se o dentifrício B, preveniu-se 1 caso de aumento de placa, a cada 7 pacientes tratados ($NNT=7$).

2.4 Discussão

Produtos naturais continuam representando uma fonte valiosa e inexplorada de antimicrobianos potencialmente eficazes e de baixa toxicidade. Os recentes avanços na tecnologia analítica, voltados para a fitoterapia, abriram portas para uma nova era de produtos e terapias anti-placa [19]; no entanto, estudos publicados sobre esta temática ainda são raros, apesar da relevância do assunto.

O presente estudo, com o objetivo de investigar a ação clínica de uma nova terapia, avaliou, através de um ensaio clínico randomizado, um dentifrício à base de uma planta medicinal muito conhecida, o Alecrim, amplamente usada como alimento, cosmético, especiaria e aromatizante. Semelhante ao nosso estudo, vários autores realizaram ensaios clínicos buscando avaliar a eficácia de dentifrícios contendo plantas [1, 6, 20, 21]. No entanto, nosso estudo é pioneiro na análise clínica do efeito do alecrim adotando índices de condição de saúde bucal, utilizando uma dose terapêutica definida do extrato da planta. Ainda, observa-se que existe um consenso entre nosso estudo e os trabalhos citados acerca da excelência destes produtos herbais, mostrando eficácia e bom desempenho nos resultados.

Um modo adicional para medir o impacto de uma intervenção, que vem se tornando relevante, é o número necessário para tratar (NNT), representando o número de pacientes a serem tratados para que se previna um evento indesejado[22]. Os resultados do presente ensaio clínico randomizado se mostraram positivos em relação ao sangramento gengival, quando comparou-se o dentifrício de alecrim ao dentifrício convencional, uma vez que a redução do sangramento foi maior no grupo que sofreu a intervenção. Assim, a cada 5 pacientes tratados com o dentifrício de alecrim, preveniu-se 1 caso de sangramento gengival.

Em relação à presença de placa, o dentifrício de alecrim apresentou uma eficácia de 22,7%, prevenindo 1 caso de aumento de placa a cada 7 pacientes tratados. Com resultados aproximados, a redução do sangramento gengival nos pacientes que usaram o dentifrício convencional foi de 29,3%, mostrando que a cada 5 pacientes tratados, previne-se 1 caso de sangramento gengival. Em relação à presença de placa, também houve equiparação da eficácia do tratamento, quando foram comparados pacientes que sofreram a intervenção aos que não sofreram, sendo a intervenção destes, de 28%, o que reforça neste grupo, a prevenção de 1 caso de aumento de placa a cada 7 pacientes tratados. Assim, de acordo com o achado de outro estudo neste sentido[7], produtos naturais podem oferecer uma alternativa eficaz às preparações sintéticas, representando uma abordagem promissora e estratégica para prevenir e tratar doenças e infecções bucais.

O alecrim é composto por Terpenóides, Flavonóides, Fenóis e Óleo essencial, tendo, cada componente, sua função nas propriedades farmacológicas [11], tornando-o uma valiosa matéria-prima para produtos terapêuticos, como o nosso dentifrício. O bom desempenho deste dentifrício experimental, em relação ao sangramento gengival e redução de placa, deve-se, certamente, às propriedades terapêuticas anti-inflamatórias e antimicrobianas, cientificamente comprovadas do alecrim [10, 11, 14, 23], pois tal dentifrício teve o poder de reduzir o biofilme e diminuir o sangramento da gengiva. A redução do biofilme *in vivo* também foi verificada por Rasooli et al. [12], com o uso do óleo essencial do alecrim, levando-os a sugerir a sua utilização em novos tratamentos anti-cárie.

Silva et al. [8], também verificaram o poder antimicrobiano do Alecrim contra bactérias orais em seus estudos. Eles utilizaram bactérias importantes na cavidade bucal (*S. mitis*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. mutans* e *L. casei*), na forma planctônica. Semelhante a eles,

Bernardes et al. [9], também comprovaram o poder antibacteriano do alecrim, atribuindo tal efeito aos componentes do seu óleo essencial, o Ácido Carnósico e o Carnosol. Esses achados foram reforçados pelo estudo de Freires et al. [3], que realizaram revisão sistemática acerca do poder antimicrobiano dos óleos essenciais de plantas medicinais, dentre elas, o alecrim.

Na odontologia moderna, vivencia-se uma era da clínica baseada em evidências e qualquer produto com aplicação clínica em potencial, deve passar por uma série de testes para demonstrar sua biocompatibilidade aos tecidos da cavidade oral, bem como, suas vantagens em termos de eficácia nestas aplicações. Assim, estudos *in vivo* são necessários para recomendar protocolos clínicos ideais [4, 7]. Nosso estudo compartilha da mesma linha de pensamento, quando executa um ensaio clínico baseado em estudos pré-clínicos de uma planta medicinal, obtendo-se resultados comparáveis com os produtos já disponíveis no mercado.

Segundo Liza-Barreto et al. [24], extratos de plantas incorporados às formulas dos dentifrícios se somam à ação do flúor, melhorando o produto que será comercializado e utilizado pelo paciente. Desta forma, um dentifrício como o nosso, onde, além do flúor, existe extrato de uma planta medicinal provida de tantas propriedades terapêuticas como o alecrim, mostra-se de grande relevância científica, além de caracterizar-se como uma significativa inovação tecnológica.

Embora se trate de um produto herbal, houve quadro de reação alérgica em 2 pacientes que sofreram a intervenção, levando à interrupção imediata do uso. Existem relatos na literatura de reação alérgica ao alecrim desde os estudos de Klarman [25], e Fousereau [26]. Miroddi et al. [27], publicaram recentemente uma revisão sistemática relatando vários casos

de reações ao *Rosmarinus officinalis* e sugerindo o Carnosol como o constituinte causador das reações.

3 Conclusão

O dentifrício experimental à base de *Rosmarinus officinallis* mostrou-se efetivo nos controles de sangramento gengival e placa bacteriana, na amostra submetida ao seu uso, em relação ao dentifrício convencional fluoretado, representando, assim, uma alternativa aos produtos sintéticos empregados na Odontologia.

REFERÊNCIAS

- 1 Pradeep AR, Agarwal E, Naik SB. 2012. Clinical na microbiologic effects of commercially available dentifrice containing Aloe Vera: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 83(6): 797-804.
- 2 Tatikonda A, Debnath S, Chauhan V, Chaurasia V, Taranath M, Sharma A. 2014. Effects of herbal and non-herbal toothpastes on plaque and gingivitis: a clinical comparative study. *J Int Soc Prev Community Dent*. 4(suppl 2): 126-9.
- 3 Freires IA, Denny C, Benso B, Alencar SM, Rosalen PL. 2015. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*. 20 (4): 7329-7358.
- 4 Sanz M, Serrano J, Iniesta M, Santa Cruz I, Herrera D. 2013. Antiplaque and antigingivits toothpastes. *Monogr Oral Sci*. 23: 27-44.
- 5 Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B, Gupta N. 2015. Use of traditional Indian plants in inhibition of caries-causing bactéria-*Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 26 (2):110-115.
- 6 Hebbal M, Ankola AV, Sharma R, Johri S. 2012. Effectiveness of herbal and fluoridated toothpaste on plaque and gingival scores among residentes of a working women's hostel-a randomized Controlled Trial. *Oral Health & Prev Dent*. 10(4): 389-95.
- 7 Hotwani K, Baliga S, Sharma K. Phytodentistry: use of medicinal plants. 2014. *J Complement Integr Med*, 11(4): 233-251.

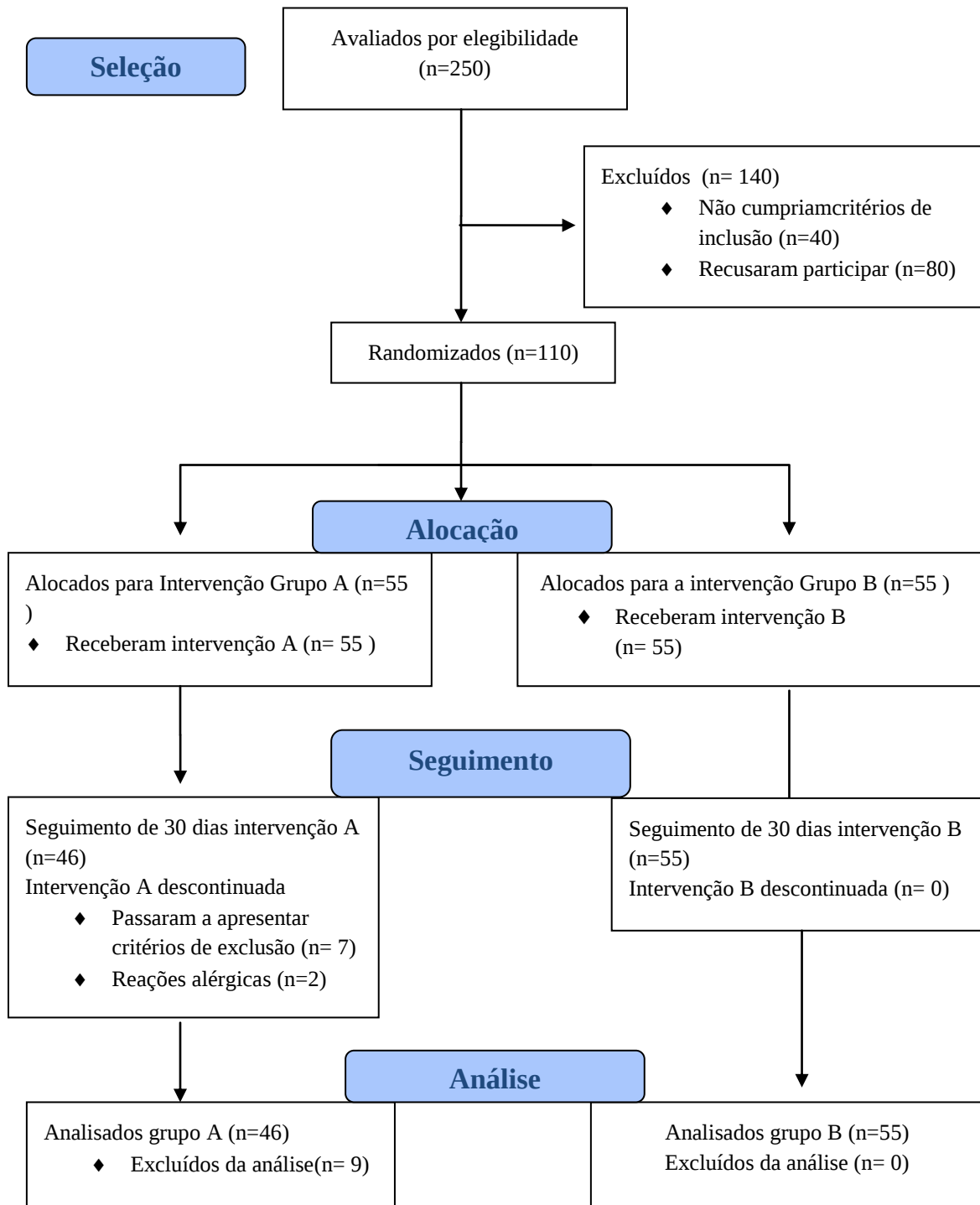
- 8 Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho A de AT. 2008. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. Rev Bras Farmacogn. 18 (2): 236-40.
- 9 Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Souza MGM, Silva MLA, Silva Filho AA, Martins CHG, Crotti AEM, Pauletti PM, Groppo M, Cunha WR. 2010. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of Carnosic Acid and Carnosol. Chemistry & Biodiversity. 7 (7): 1835-40.
- 10 Kazemi M, Rostami H, Ameri A. 2012. The study of compositions and antimicrobial properties of essential oil of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* on human pathogens. Curr Res Bacteriol. 5 (1):1-12.
- 11 Begum A, Sandhya S, Ali SS, Vinod KR, Reddy S, Banji D. 2013. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Acta Sci Pol Technol Aliment. 12 (1): 61-73.
- 12 Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Darvish S, Astaneh A. 2008. *Rosmarinus officinalis* and *Thymus eriocalix* essential oils combat *in vitro* and *in vivo* dental biofilm formation. Phcog Mag. 4 (14):65-75.
- 13 Palombo EA. 2011. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evid Based Complement Alternat Med. ID 680354.
- 14 Justo OR, Simioni PU, Gabriel DL, Tamashiro WM, Rosa Pde T, Moraes AM. 2015. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. BMC Complement Altern Med. 15(1):390.

- 15 Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. 2010. O que devemos saber sobre medicamentos. Trecho 5, Área especial 57, Brasília-DF.
- 16 Sena KXFR, Andrade MSAS, Lima RC, Santos ER. 1993. Atividades biológicas da *Rosmarinus officinalis* L. Bol Soc Brot Ser. 2 (66): 97-109.
- 17 Ainamo J, Bay I. 1975. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int. Dent. J. 25(4): 229-35.
- 18 Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. 1970. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. J Periodontol. 41(1): 41-3.
- 19 Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. 2011. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. Caries Res. 45 (3): 243-63.
- 20 Gupta P, Agarwal N, Anup N, Manujunath BC, Bhalla A. 2012. Evaluating the anti-plaque efficacy of meswak (*Salvadora persica*) containing dentifrice: a triple blind controlled trial. J Pharm Bioallied Sci. 4 (4): 282-85.
- 21 Chen JX, Liu YY, Wang SX, Li XH. 2013. Efficacy of Crest Herbal Crystal Toothpaste in “Clearing Internal Heat”: A randomized, double-blind clinical study. Evidence-Based Complement Alternat Med. ID 807801.
- 22 Coutinho ESF, Cunha GM. 2005. Conceitos básicos de epidemiologia e estatística para a leitura de ensaios clínicos controlados. Rev Bras Psiquiat. 27(2): 146-51.
- 23 Smullen J, Finney M, Storey DM, Foster HA. 2012. Prevention of artificial dental plaque formation *in vitro* by plant extracts. J of Applied Microbiol. 113 (4): 964-73.

- 24 Lisa Barreto V, Feitosa AMSC, Araújo TJ, Chagas FK, Costa LK. 2005. Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífrices contiendo fitoterápicos. Av Odontoestomatol. 21(4): 195-201.
- 25 Klarmann EG. 1958. Perfume dermatitis. Ann Allergy. 16 (4): 425-434.
- 26 Foussereau J, Benezra C. 1970. Les eczémas allergiques professionnels. Paris: Masson & Cie. 170, 391.
- 27 Miroddi M, Calapai G, Isola S, Minciullo PL, Gangemi S. 2014. *Rosmarinus officinalis* L. as cause of contact dermatitis. Allergol Immunopathol: 42 (6):616-9.

APÊNDICES

Apêndice 2 - Tabela 1 Comparação do sexo e a idade em relação ao uso dos Dentifrícios



Apêndice 2 - Tabela 1 Comparação do sexo e a idade em relação ao uso dos Dentifrícios

Tabela 1- Comparação do sexo e a idade em relação ao uso dos Dentifrícios

Variável	Dentifrício		Total	Valor de p
	A	B		
SEXO				
Masculino	15 (32,6%)	23 (41,8%)	38 (37,6%)	0,341 ¹
Feminino	31 (67,4%)	32 (58,2%)	63 (62,4%)	
Idade	29,4 ± 5,4	31,4 ± 6,2	30,5 ± 5,9	0,089 ²
Total	46 (100%)	55 (100%)	101 (100%)	

1- Teste Qui-quadrado de Pearson; 2-Teste T de Student.

Apêndice 3 - Tabela 2 Evolução dos pacientes quanto aos Índices de sangramento gengival e Placa em relação ao uso dos Dentifrícios A e B

Tabela 2 - Evolução dos pacientes quanto aos Índices de sangramento gengival e de Placa em relação ao uso dos Dentifrícios A e B

Variável	Dentifrício		Total	Valor de p ¹
	A	B		
ISG				
Sim	30 (65,2%)	26 (47,2%)	56 (55,5%)	0,071
Não	16 (34,8%)	29 (52,8%)	45 (44,5%)	
IP				
Sim	22 (47,8%)	34 (61,8%)	56 (55,5%)	0,159
Não	24 (52,2%)	21 (38,2%)	45 (44,5%)	
Total	46 (100%)	55 (100%)	101 (100%)	

1- Teste Qui-quadrado de Pearson

Apêndice 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Convido o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO DE *Rosmarinus officinalis* Linn.: UM ESTUDO RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO-CEGO. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Informações sobre a pesquisa:

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO DE *Rosmarinus officinalis* Linn. : UM ESTUDO RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO-CEGO

Pesquisador Responsável: Marcela Agne Alves Valones

A pesquisadora poderá ser encontrada diariamente no endereço: Pós-graduação em odontologia, Av. Prof. Moraes Rego- Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600 Telefone: 92528488(inclusive para ligações a cobrar), e-mail: mavalona@globo.com

Pesquisadores participantes: Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho, Arnaldo de França Caldas Júnior, Lorraine Alves Tenório, Priscila Barros Terto,

Esta pesquisa pretende avaliar a atividade do creme dental à base de extrato de alecrim contra as bactérias da boca. Pretende também determinar e comparar o efeito deste creme dental sobre a placa bacteriana através de Índice de Placa (IP) e Índice de Sangramento Gengival (ISG) antes e depois do seu uso. Haverá 2 momentos neste estudo:

1^o momento: Os indivíduos serão distribuídos em dois grupos (A e B). Os dois grupos receberão escovas e o creme dental de acordo com o seu grupo. Um dos grupos usará o creme dental comercializado no mercado, e o

outro, usará o creme dental com o extrato do Alecrim. Os cremes dentais serão produzidos e etiquetados especificamente em farmácia de manipulação, de modo que apenas o farmacêutico responsável os identifique, mantendo esta informação em sigilo até o final do estudo. Neste momento, (dia 0), também será realizado um exame da boca, que consistirá nas avaliações seguintes:

Índice de Placa (IP): Examinam-se todos os dentes após o uso de corante que mostrará a placa bacteriana

Índice de Sangramento Gengival (ISG): A presença ou ausência de sangramento gengival é determinada pelo uso de instrumento odontológico em todos os dentes.

20 momento: Depois de 30 dias, os indivíduos retornarão ao Serviço, trazendo os tubos dos creme dentais vazios, para realização de um novo exame da boca(dia 30) semelhante ao primeiro dia.

Riscos

- O uso de um creme dental que não contém flúor. O combate à cárie se deve ao Alecrim;
- O constrangimento de estar testando uma nova terapêutica;
- Reações adversas ao produto;

Benefícios:

- Contribuição para o desenvolvimento de um produto natural, com relevância social, pois tem menor custo;
- Contribuição para a criação de uma terapia que irá combater as doenças cárie e periodontal;
- Orientações de higiene bucal, o que influenciará nos bons hábitos;
- Recebimento de diagnóstico sobre a sua situação bucal;
- Ao término do estudo, os pacientes receberão um kit de higiene oral

A pesquisa terá duração média de 30 dias. Os indivíduos não terão suas identidades reveladas, podendo se retirar da pesquisa a qualquer momento.

Nome e Assinatura do pesquisador _____

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____ CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa **AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO DE *Rosmarinus officinalis* Linn.:UM ESTUDO RANDOMIZADO CONTROLADO DUPLO-CEGO** como paciente. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nelaenvolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi informado que posso retirar meu consentimento a qualquer momento da pesquisa.

Local e data _____

Nome e Assinatura do paciente ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do paciente em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Apêndice 5 - Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA

NOME: _____

END: _____ BAIRRO: _____

TELEFONE: _____ SEXO: _____ IDADE _____

DIA 0 ____/____/____ - DENTIFRÍCIO : _____

ÍNDICE DE SANGRAMENTO (AINAMO, BAY , 1975)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

RESULTADOS

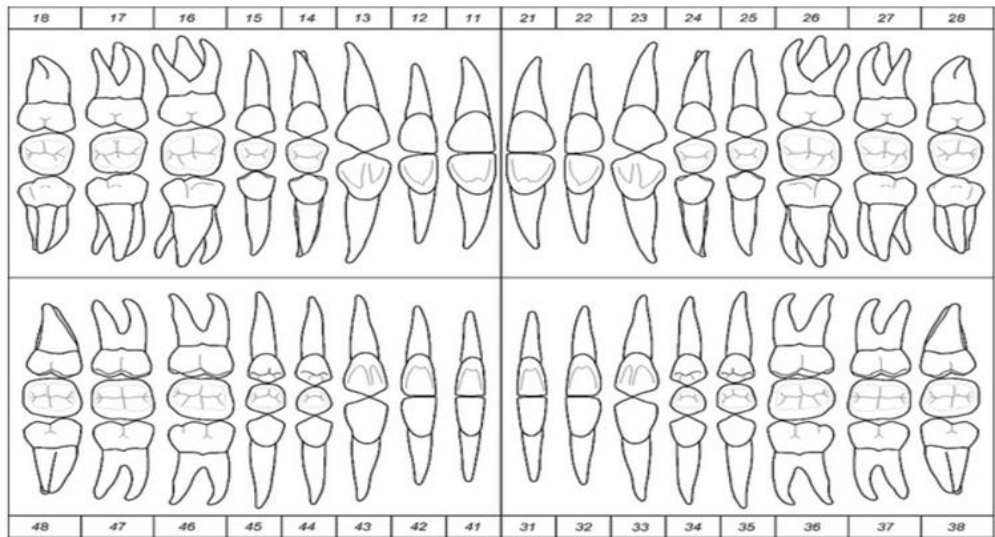
ÍNDICE DE PLACA (TURESKY et al.,1970)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

RESULTADOS

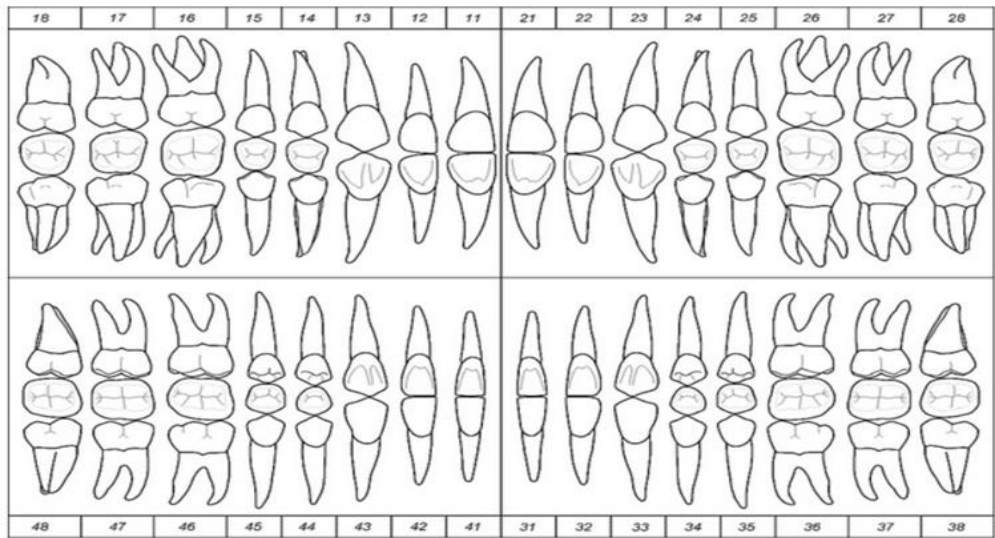
DIA 30 ____/____/____

ÍNDICE DE SANGRAMENTO (AINAMO, BAY , 1975)



RESULTADOS

ÍNDICE DE PLACA (TURESKY et al.,1970)



RESULTADOS

ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO DE *Rosmarinus officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE O BIOFILME DENTAL E *S. mutans* DA SALIVA

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Pesquisador: Marcela Agne Alves Valones

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

CAAE: 02576212.1.0000.5208

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 67690

Data da Relatoria: 23/07/2012

Apresentação do Projeto:

Por um longo período de tempo, as plantas têm sido uma valiosa fonte de produtos naturais para a manutenção da saúde humana, constituindo uma forma de medicamento vegetal e de matéria prima para a indústria farmacêutica. As pesquisas sobre este tema foram intensificadas especialmente na última década. O alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) é um arbusto perene, muito comum na vegetação da região mediterrânea e apresenta crescimento frente à diversidade de condições ecológicas. É conhecido por várias nomenclaturas em todo o mundo, como por exemplo, alecrim-dejardim, alecrim-rosmarinho, libanotis, alecrinzeiro, dentre outros. Patologias bucais, como a cárie dentária e doença periodontal, resultam diretamente da colonização bacteriana, embora outros fatores possam influenciar no curso desses males. O agente etiológico predominante, é a presença de microrganismos depositados na superfície dentária, que formam uma massa aderente conhecida como biofilme dentário ou placa bacteriana. A presença do *S. mutans* é prevalente nas etapas iniciais da cárie. O uso de escova com um dentifrício é a forma de higiene bucal mais amplamente praticada e reconhecida na maioria das regiões para o controle de placa bacteriana supragengival. Como consequência, o creme dental proporciona um veículo ideal de agentes químicos. Dessa forma, a associação da escova com o dentifrício facilita a remoção de placa e promove a aplicação de agentes químicos nas superfícies dentárias com fins terapêuticos e preventivos da cárie e doença periodontal. Recentemente, extratos de plantas têm sido incorporados nas fórmulas dos dentifrícios, os quais além de apresentarem funções cosméticas, têm o objetivo principal de melhorar a ação antimicrobiana, atuando como agentes terapêuticos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar, através de um ensaio clínico cruzado randomizado, duplo-cego, a atividade antimicrobiana do dentifrício à base do extrato alcoólico de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) sobre o biofilme dental e *S. mutans* da saliva.

Objetivo Secundário:

Determinar e comparar clinicamente o efeito do dentifrício à base do extrato alcoólico de alecrim sobre o biofilme dental através dos parâmetros:

Avaliar através do desempenho clínico dos dois dentifrícios na amostra estudada;

Promover a identificação de *Streptococcus mutans* na saliva dos pacientes antes e depois do uso do dentifrício;

Promover a contagem de *Streptococcus mutans* na saliva dos pacientes antes e depois do uso do dentifrício;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Uso de creme dental que não contém flúor (o combate à cárie se deve ao alecrim)

Constrangimento de estar testando uma nova terapêutica

Reações adversas ao produto

Benefícios

Contribuição para o desenvolvimento de um produto natural, com relevância social, pois tem menor custo

Contribuição para a criação de uma terapia que irá combater as doenças cárie e periodontal

Orientações de higiene bucal, o que influenciará nos bons hábitos do paciente

Recebimento, por parte do paciente, do diagnóstico acerca de sua saúde bucal

Recebimento de Kit de higiene bucal

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este protocolo tem a aparente finalidade de elaboração de tese de doutorado da Pesquisadora Responsável, cirurgiã-dentista Marcela Agne Alves Valones, já que a Folha de Rosto é assinada pela Coordenadora de Pós-Graduação de Odontologia do CCS da UFPE.

Trata-se de um ensaio clínico cruzado randomizado do tipo duplo-cego, seguindo as

regras CONSORT que empregará um dentifrício a base de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) que será obtido através da farmácia de manipulação. A população amostral será composta de 60 indivíduos com idade entre 18 a 25 anos, de ambos os sexos, com todos os dentes hígidos e com Índice PSR igual a 0, que será divididos em dois subgrupos, cada um com 25 pessoas. Um dos grupos usará o dentifrício comercializado no mercado, e o outro, usará o dentifrício com o antimicrobiano em teste (extrato do Alecrim). Os dentifrícios serão etiquetados especificamente na farmácia de manipulação, de modo que apenas o farmacêutico responsável os identifique, mantendo esta informação em sigilo até o final do estudo. Também será realizado exame clínico, com examinador previamente calibrado, no qual serão registrados os seguintes parâmetros: : Índice de Placa (IP), : Índice de Sangramento Gengival (ISG) Coleta de saliva não estimulada. Decorridos 30 dias, os indivíduos retornarão ao Serviço, trazendo os tubos de dentifrícios vazios, para realização de um novo exame clínico semelhante ao inicial (dia 30), onde serão obtidos novos registros do IP e ISG e coleta de saliva não estimulada. Neste momento, os dentifrícios serão trocados entre os grupos A e B, de modo que todos os indivíduos façam uso dos dois dentifrícios em momentos distintos, pois trata-se de um ensaio clínico cruzado. Eles serão orientados, semelhantemente ao 1º momento, a escovar seus dentes, três vezes ao dia, por mais um período de 30 dias, época em que voltarão ao Serviço para continuidade do estudo. Será realizado um novo exame clínico nos dois grupos (dia 60), com registro do IP, ISG e coleta de saliva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este protocolo apresenta Folha de Rosto corretamente preenchida. Cronograma com término previsto para 2015. Orçamento de porte médio (R\$ 9.490,00) que, aparentemente, está sob a responsabilidade da Pesquisadora Responsável. Apresenta Critérios de Inclusão para os participantes, mas não de Exclusão. TCLE apresenta-se bem redigido contendo riscos, benefícios, direitos e garantias para os sujeitos da pesquisa.

Recomendações:

Recomendações:

- Incluir no Projeto os critérios de Inclusão;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados. Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 06 de Agosto de 2012

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO

Anexo 2 - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

REGISTRO BRASILEIRO DE ENSAÍOS CLÍNICOS



USUÁRIO

SENHA

ENTRAR

Esqueceu a senha?
 Registrar-se

PT | ES | EN

NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO

BUSCAR ENSAIO

BUSCA AVANÇADA

[HOME](#) / [ENSAIOS REGISTRADOS](#) /

RBR-9f3ctb
Avaliação Clínica da Atividade Antimicrobiana do Dentífrico a Base do Extrato de Rosmarinus officinalis Linn. (alecrim) Sobre o Biofilme Dental e S.mutans da Saliva
 Data de registro: 27 de Março de 2012 às 12:10
 Last Update: 22 de Out. de 2015 às 12:16

Tipo do estudo:

Intervenções

Título científico:

PT-BR
 Avaliação Clínica da Atividade Antimicrobiana do Dentífrico a Base do Extrato de Rosmarinus officinalis Linn. (alecrim) Sobre o Biofilme Dental e S.mutans da Saliva

EN
 Clinical evaluation of the antimicrobial activity of the dentifrice the basis of Rosmarinus officinalis Linn extract. (rosemary) on the biofilm and saliva S. mutans

Identificação do ensaio

Número do UTN: U1111-1173-7747

Título público:

PT-BR
 Estudo Clínico de Creme Dental a base de Alecrim sobre a Placa Bacteriana e Bactéria da Saliva

EN
 Clinical Study Toothpaste base Rosemary on Plaque and Saliva Bacterium

Acrônimo científico:

Acrônimo público:

Identificadores secundários:
 02576212.1.0000.5208
 Órgão emissor: Plataforma Brasil
 67690
 Órgão emissor: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco

Patrocinadores

Patrocinador primário: UFPE-Universidade Federal de Pernambuco

Patrocinadores secundários:
 Instituição: UFRPE-Universidade Federal Rural de Pernambuco

30/12/2015

Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

Fontes de apoio financeiro ou material:

Instituição: CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Condições de saúde

Condições de saúde ou problemas:

Gengivite, Cárie dentária

PT-BR

Gingivitis, Dental cavity

EN

Descritores gerais para as condições de saúde:

C07: Doenças estomatognáticas

PT-BR

C07: Enfermedades estomatognáticas

ES

C07: Stomatognathic diseases

EN

Descritores específicos para as condições de saúde:

K05: Gengivite e doenças periodontais

PT-BR

K05: Gingivitis y enfermedades periodontales

ES

K05: Gingivitis and periodontal diseases

EN

K02.9: Cárie dentária, sem outra especificação

PT-BR

K02.9: Caries dental, no especificada

ES

K02.9: Dental caries, unspecified

EN

Intervenções

Categorias das intervenções

Other

Intervenções:

Grupo experimental: 55 voluntários de ambos os sexos, saudáveis, livres de doença periodontal significativa (gengivite aguda, bolsa periodontal) e de cárie dentária, serão examinados na boca quanto ao sangramento gengival (Índice de sangramento gengival Ainamo & Bay, 1975) e quanto à presença de placa (Índice de placa Turesky 1970). Receberão 1 creme dental a base de alecrim para uso rotineiro, sendo instruídos a manterem seus hábitos de higiene normais por 30 dias.

Grupo controle: 55 voluntários de ambos os sexos, saudáveis, livres de doença periodontal significativa (gengivite aguda, bolsa periodontal) e de cárie dentária, serão examinados na boca quanto ao sangramento gengival (Índice de sangramento gengival Ainamo & Bay, 1975) e quanto à presença de placa (Índice de placa Turesky 1970). Receberão 1 creme dental presente no mercado a base de flúor para uso rotineiro,

PT-BR

Experimental group: 55 volunteers of both sexes, healthy, significant periodontal disease-free (acute gingivitis, periodontal pocket) and tooth decay, will be examined in the mouth on the gum sacramento (gingival bleeding Index Ainamo & Bay, 1975) and the the presence of plaque (plaque Index Turesky 1970). 1 will receive the toothpaste rosemary basis for routine use and were instructed to maintain their normal hygiene for 30 days.

Control group: 55 volunteers of both sexes, healthy, significant periodontal disease-free (acute gingivitis, periodontal pocket) and tooth decay, will be examined in the mouth on the gum sacramento (gingival bleeding Index Ainamo & Bay, 1975) and the the presence of plaque (plaque Index Turesky 1970). Receive 1 toothpaste on the market from fluor for routine use, and instructed to maintain their normal hygiene habits for 30 days.

EN

09/12/2015

Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

sendo instruídos a manterem seus hábitos de higiene normais por 30 dias.

Ao final de 30 dias, os pacientes de ambos os grupos serão novamente examinados quanto ao índice de sangramento e de placa bacteriana.

After 30 days, patients in both groups will be re-examined for bleeding index and plaque.

Descritores para as intervenções:

E05.318.308.250.300.725: Índice Periodontal

PT-BR

E05.318.308.250.300.725: Índice Periodontal

ES

C07.793.208.377: Placa Dentária

PT-BR

C07.793.208.377: Placa Dental

ES

Recrutamento

Situação de recrutamento: Recruitment completed

País de recrutamento

Brazil

Data prevista do primeiro recrutamento: 2014-02-08

Data prevista do último recrutamento: 2014-11-04

Tamanho da amostra alvo:	Gênero para inclusão:	Idade mínima para inclusão:	Idade máxima para inclusão:
110	-	18 Y	45 Y

Crêterios de inclusão:

Voluntários saudáveis; ambos os gêneros; idade entre 18 a 45 anos; mínimo de 20 dentes ígidos na boca; sem doenças sistêmicas; sem uso de medicamentos; condição bucal saudável
Tamanho da amostra-alvo: 110 pacientes

PT-BR

Healthy volunteers; both genders; aged 18 to 45 years; minimum of 20 healthy teeth in the mouth; without systemic diseases; without the use of drugs; healthy oral condition
Sample size : 110 patients

EN

Crêterios de exclusão:

Voluntários fumantes; grávidas; portadores de doenças periodontal ou cárie; portadores de doenças sistêmicas importantes; usuários de medicamentos; portadores de aparelho ortodôntico

PT-BR

Smoking volunteers; pregnant women; people with periodontal disease or decay; carriers of important systemic diseases; drug users; people with braces

EN

Tipo do estudo

Desenho do estudo:

Ensaio clínico randomizado, duplo-cego controlado, paralelo com dois braços

PT-BR

Randomized clinical trial, double-blind controlled, parallel two-arm

EN

09/12/2015

Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

Programa de acesso expandido	Enfoque do estudo	Desenho da intervenção	Número de braços	Tipo de mascaramento	Tipo de alocação	Fase do estudo
Nenhum	Treatment	Paralelo	2	Double-blind	Randomized-controlled	1

Desfechos**Desfechos primários:**

PT-BR

Diminuição do sangramento gengival no período de 30 dias, verificada por meio da mensuração através do Índice de Sangramento Gengival de Ainamo & Bay (1975), a partir da constatação de uma variação de pelo menos 18% nas medições pré e pós intervenção

EN

Decreased gingival bleeding in the 30-day period, verified by measuring through the Gingival Bleeding Index Ainamo & Bay (1975), starting from the realization of a range of at least 18% in pre and post measurements intervention

Desfechos secundários:

PT-BR

Diminuição da quantidade de placa bacteriana no período de 30 dias, verificada por meio da mensuração através do Índice de Placa de Turesky (1970), a partir da constatação de uma variação de pelo menos 14% nas medições pré e pós intervenção

EN

Reducing the amount of plaque in the 30-day period, verified by measuring through Turesky Board Index (1970) starting from the realization of a range of at least 14% in pre and post intervention measurements

ContatosContatos para questões públicas

Nome completo: Marcela Agne Alves Valones

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária

Cidade: Recife / Brazil

CEP: 50670-901

Fone: +55(81)992528488

E-mail: mavalona@globo.com

Afiliação: UFPE-Universidade Federal de Pernambuco

Contatos para questões científicas

Nome completo: Marcela Agne Alves Valones

Endereço: Rua Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária

Cidade: Recife / Brazil

CEP: 50670-901

Fone: +55(81)992528488

E-mail: mavalona@globo.com

09/12/2015

Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

Afiliação: UFPE-Universidade Federal de
Pernambuco

Contatos para Informação sobre os centros de pesquisa

Nome completo: Marcela Agne Alves Valones

Endereço: Rua Professor Moraes Rego, 1235,
Cidade Universitária

Cidade: Recife / Brasil

CEP: 50670-901

Fone: +55(81)992528488 / +55(81)21268817

E-mail: mavalona@globo.com

Afiliação: UFPE-Universidade Federal de
Pernambuco

Links adicionais:

[Download no formato ICTRP](#)

[Download no formato XML OpenTrials](#)

Anexo 3 - Normas da Revista *Clinical Oral Investigation*

NORMAS DA REVISTA *Clinical Oral Investigation*

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Papers may be submitted for the following sections:

- Original articles
- Invited reviews
- Short communications
- Letters to the editor

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

EDITORIAL PROCEDURE

If you have any questions please contact:

Prof. Dr. G. Schmalz

University of Regensburg

Department of Conservative Dentistry and Periodontology

Franz-Josef-Strauß-Allee 11

93053 Regensburg

Germany

e-mail: gottfried.schmalz@klinik.uni-regensburg.de

Tel.: +49 941 9446024,

Fax: +49 941 9446025

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Further Useful Information

please follow the link below

- Further Useful Information

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

- Springer Author Academy

TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Objectives (stating the main purposes and research question)
- Materials and Methods
- Results
- Conclusions
- Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

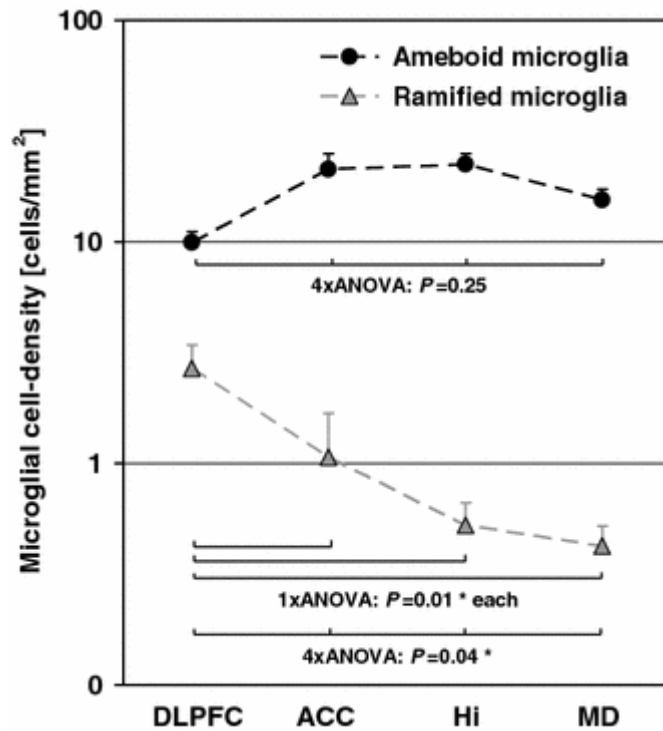
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

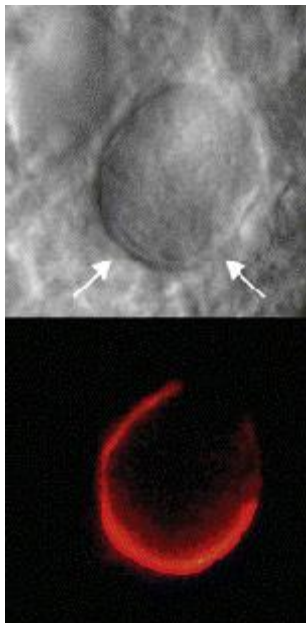
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

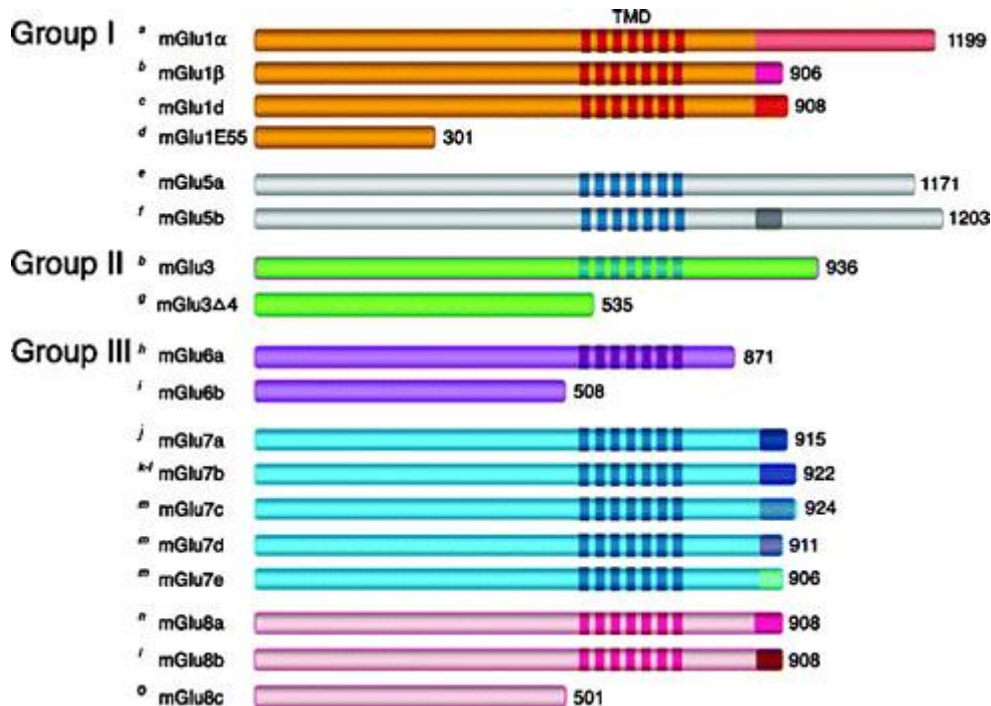
Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.

- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.

- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. They should also state that they have full control of all primary data and that they agree to allow the journal to review their data if requested.

Therefore the manuscript must be accompanied by the “Conflict of Interest Disclosure Form”. To download this form, please follow the hyperlink on the right.

The manuscript must also be accompanied by the “Authorship & Disclosure Form”. To download this form, please follow the hyperlink on the right.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- Edanz Editing Global

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript.

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License..

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.