



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE ODONTOLOGIA

MARCELLA MARIA ROCHA LIMA

**POTENCIAL ANTICÁRIE *IN VITRO* DE SELANTES RESINOSOS E
IONOMÉRICOS CONTENDO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

FORTALEZA

2016

MARCELLA MARIA ROCHA LIMA

POTENCIAL ANTICÁRIE *IN VITRO* DE SELANTES RESINOSOS E IONOMÉRICOS
CONTENDO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título bacharel em Odontologia.

Área de concentração: Cariologia

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Fortaleza

2016

MARCELLA MARIA ROCHA LIMA

POTENCIAL ANTICÁRIE *IN VITRO* DE SELANTES RESINOSOS E IONOMÉRICOS
CONTENDO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Odontologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção de título bacharel em
Odontologia.

Área de concentração: Cariologia

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla
Azevedo Rodrigues

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonca

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Juliana Paiva Marques Lima Rolim

Centro Universitário Christus (Unichristus)

Dedido este trabalho a Deus que é o meu guia
e sempre está ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A DEUS e minha MÃE SANTÍSSIMA que guiam e iluminam meu caminho, sempre me mostrando por onde devo seguir. Mesmo nos momentos onde penso que estou sozinha e fraca, sinto-os ao meu lado, confortando-me e enchendo-me de força e determinação para trilhar no caminho certo.

À minha família por me apoiarem em tudo o que proponho-me a fazer. Obrigada a minha mãe RENILVANE ROCHA e ao meu pai JOÃO BATISTA LIMA pelos seus ensinamentos e amor, pois, hoje, tudo o que sou devo a vocês. Aos meus irmãos ONILDO NETO, JOÃO RENATO ROCHA e SOFIA MELO por sempre estarem ao meu lado. Aos meus sobrinhos amados, MANUELA MELO, HENRIQUE MELO E SOPHIE LIMA por me fazer uma pessoa melhor depois de ter tido a oportunidade de ser tia. A minha madrinha e segunda mãe ÂNGELA ROCHA, por me amar como filha e mesmo distante, faz-se presente em todos os momentos alegres e tristes da minha vida, sempre acreditando no meu potencial. A minha avó ALBERTINA FARIAS que mesmo estando tão distante, eu sei que está comigo a cada beijo carinhoso, sei que estaria radiante de orgulho.

Ao meu amor RAFAEL TEIXEIRA por sempre estar ao meu lado, aguentando minhas falhas e minhas ausências. Obrigada por me ajudar e fazer-me ser uma pessoa mais madura e melhor a cada dia. Agradeço ainda pelo amor e confiança que deposita em mim. Não conseguiria sem você.

À minha querida orientadora, LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES, por não ter me dito não quando, há alguns anos, insisti piedosamente para ser da sua equipe. Hoje só tenho a agradecer por ter me deixado aprender e crescer sendo sua aluna de Iniciação Científica por quase dois anos. A senhora é admirável. Tenho muito carinho e respeito pelo seu trabalho e principalmente pela pessoa que é.

À banca avaliadora, Dra. JULIANA PAIVA e Dr. JULIANO SARTORI MENDONCA, pela disponibilidade em participar desta banca de TCC. Agradeço, antecipadamente, as valiosas contribuições para este trabalho.

À minha dupla de experimento ERNANDA SALES, a convivência com você deixou as horas de desespero mais amenas e as risadas mais gostosas. Obrigada pela sua amizade e por dividir um dos momentos mais importantes em nossas vidas. Muito sucesso.

Aos meus amigos PEDRO HENRIQUE ACIOLY e DAVID QUEIROZ, obrigada não só pela disposição em ajudar sempre, mas também pela amizade. Não foi tão difícil, pois vocês estavam ao meu lado, dando palavras de apoio e incentivo, emprestando o ombro e os ouvidos quando batia a hora do desespero. Alegando-se a cada vitória. Pessoas como vocês são raras, ficar feliz pelo outro é divino.

À querida WESLANNY MORAIS, obrigada pela paciência de ensinar desde o nome de um eppendorf ao realizar experimentos na microbiologia. Não teria conseguido sem sua ajuda e principalmente pelos seus ensinamentos. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar, sorrindo e aguentando meus intermináveis pedidos de socorro.

À amiga Dra. RAMILE LIMA pela ajuda e palavras de incentivo. Seu trabalho é admirável.

Aos amigos do laboratório da pós-graduação pela convivência e amizade, CATARINA MARTINS, VANESSA FONTENELE, DEBORAH CAVALCANTE e HANIERY ALVES.

À minha dupla BIANCA PALHANO, que por muitas vezes atendeu sozinha e sempre entendeu minhas ausências quando estava no laboratório. Obrigada ainda pelas palavras de amor e amizade. Você é maravilhosa.

Ao meu grupinho de turma, JULIANNE COELHO, DÉBORA TORQUATO, CAROLINE SALEMA, SABRINA SALDANHA, EDSON CETIRA E PEDRO FERNANDES pelo companheirismo e amizade.

RESUMO

Os selantes são muito utilizados no controle da cárie dentária, tendo sua aplicação indicada em fôssulas e fissuras de pacientes com alto risco ao desenvolvimento de lesões. A clorexidina tem sido incorporada em vários materiais odontológicos, já que pode inibir o desenvolvimento de micro-organismos cariogênicos e prevenir o aparecimento de lesões cariosas. Este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar os efeitos da incorporação de digluconato de clorexidina (DC) sobre a rugosidade e propriedades anticárie de um selante resinoso (SR) e um selante ionomérico quimicamente ativado (SI). Clorexidina não foi incorporada nos materiais controle e os materiais experimentais foram preparados com a adição de 0,5% (p/p) de DC, constituindo os grupos: SR (Controle), SI (Controle), SRDC e SIDC. Os espécimes foram avaliados para a determinação de rugosidade de superfície, efeito anti-biofilme contra *Streptococcus mutans* e inibição da lesão de cárie em esmalte. Três espécimes de cada material foram confeccionados com uma tira matriz em moldes cilíndricos. A rugosidade da superfície de cada amostra foi determinada usando um perfilômetro mecânico com apalpador (Stylus). Cavidades Classe I foram preparadas em blocos de esmalte bovino (8x8x2 mm³) e restauradas com os materiais controle e experimentais. Três blocos de cada grupo foram submetidos à formação de biofilme de *S. Mutans* por 5 dias e o efeito dos materiais foi testado de acordo com a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) no biofilme formado sobre as amostras, em 3 repetições biológicas, independentes, com 3 repetições técnicas cada. A desmineralização do esmalte ao redor da restauração, representada pela área integrada da dureza × profundidade da lesão Delta S (ΔS) foi determinada por análise de microdureza em corte longitudinal, a 50 e 100 μm a partir da margem de restauração. Os dados foram analisados por ANOVA 2 critérios e Tukey, com um nível de significância pré-estabelecido em 5%. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na rugosidade dos espécimes, independente do material utilizado, incorporado ou não de DC ($p > 0,05$). Menores médias de UFC foram encontradas sobre os blocos restaurados com selante resinoso quando comparados àqueles restaurados com ionômero de vidro ($p = 0,011$), no entanto, não foi encontrada diferença estatística significativa na incorporação de DC ($p = 0,190$), independente do material usado. A 50 μm da restauração, menor desmineralização foi encontrada para os selantes ionoméricos ($p < 0,001$) e para aqueles materiais com DC incorporada ($p = 0,026$), não havendo interação entre material usado e incorporação de DC ($p = 0,259$). Na distância de 100 μm , apenas os selantes ionoméricos foram capazes de diminuir a desmineralização ($p < 0,001$), independente da incorporação de DC. Os materiais ionoméricos têm um maior

efeito anticárie, no entanto a incorporação de DC parece ser mais eficaz quando realizada em materiais resinosos.

Palavras- chave: Digluconato de clorexidina, Efeito antibacteriano e Selante.

ABSTRACT

Sealants are widely used in dental caries control, and its application is indicated for pits and fissures from patients at high risk of developing caries lesions. Chlorhexidine has been incorporated in various dental materials since it can inhibit cariogenic microorganism growth and prevent caries development. This *in vitro* study aimed to evaluate the effects of chlorhexidine digluconate (CD) incorporation on roughness and anticaries properties of a resin sealant (RS) and a chemically activated glass ionomer sealant (GIS). Chlorhexidine was not incorporated control materials and experimental materials were prepared by adding 0.5% CD(w/w) constituting the groups: RS (Control), GIS (control) SRCD and GISCD. The specimens were evaluated for surface roughness determination, anti-biofilm effect against *Streptococcus mutans* and inhibition of enamel caries lesion. Three specimens of each material were made with a matrix strip in cylindrical molds. The surface roughness of each specimen was determined using a contact stylus profilometer. Class I Cavities were prepared in bovine enamel blocks (8x8x2 mm³) and restored with control and experimental materials. Three blocks of each group was subjected to *S. mutans* biofilm formation during 5 days and the effect of the material was tested according to colony-forming units (CFUs) over the samples, in 3 independent biological replicates with 3 technical replicates each. Demineralization represented by integrated area of hardness × lesion depth Delta S (ΔS) was determined on enamel by analysis of cross-sectional microhardness, at 50 and 100 micrometres from the restoration margin. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey tests, with a pre-set significance level of 5%. No statistically significant difference was found in roughness of the specimens, regardless of material used, incorporated or not with CD ($p > 0.05$). Lower CFU means were found on the blocks restored with resin sealant when compared to those restored with glass ionomer ($p = 0.011$), however, no statistically significant difference was found in for CD incorporation ($p = 0.190$), regardless of material used. At 50 μm from the restoration, lower demineralization was found for glass ionomer sealants ($p < 0.001$) and for those materials with CD incorporation ($p = 0.026$), with no interaction between the material used and CD incorporation ($p = 0.259$). At the 100- μm distance, only glass ionomer sealants were able to reduce demineralization ($p < 0.001$), independent of the CD incorporation. Ionomeric materials have a higher anti-caries effect, however t incorporation of CD appears to be most effective when performed on resin materials.

Keywords: Antibacterial effect, Chlorhexidine gluconate and Sealant.

SUMÁRIO

11

14

15

15

16

22

26

28

29

ANEXO A: NORMAS DA REVISTA “CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS”.....32

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária ainda é um grande problema de saúde, especialmente em países populosos em desenvolvimento. É uma doença biofilme-açúcar-dependente [1] e entre os açúcares alimentares mais danosos está a sacarose, pois além de ser facilmente fermentada em ácido, muda a matriz do biofilme, fazendo-o mais cariogênico [2].

O uso dos selantes representa umas das medidas mais utilizadas no controle de cárie em pacientes com alto risco ao desenvolvimento de lesões de cárie [3], principalmente quando há fôssulas e fissuras profundas, estreitas e retentivas [4], o que favorece a adesão de microorganismos, pois há limitação da ação protetora exercida pela saliva e pelo flúor, dificultando a autolimpeza e a remineralização dentária, conseqüentemente, favorecendo a retenção de biofilme e a proliferação bacteriana [5].

Os selantes devem possuir algumas propriedades como biocompatibilidade, anticariogenicidade, retentividade, boa integridade marginal, resistência à abrasão e ao desgaste, além de baixo custo [6].

Os materiais mais utilizados para selamento de fôssulas e fissuras são os resinosos ou ionoméricos [7]. Os selantes resinosos atuam através da criação de uma zona microrretentiva, através do condicionamento ácido do substrato dentário e da formação de microporos que facilitam a penetração do material selador, funcionando como barreira física à formação de biofilme [8]. Devido a sua elevada taxa de retenção, os selantes resinosos são os materiais de escolha para selar fôssulas e fissuras [9]. Os selantes a base de resinas podem ainda se apresentar com ou sem incorporação de fluoretos, apresentando boa adesão à estrutura dentária; e a liberação de flúor pode ocorrer inibindo a desmineralização e favorecendo a remineralização [10]. O material selador mais comumente usado é a resina composta [11]. Os selantes à base de resinas utilizados atualmente são basicamente monômeros de dimetacrilatos que são resinas hidrofóbicas, com base de BIS-GMA (bisfenol glicidil metacrilato) ou TEGDMA (trietileno dimetacrilato). Outros dimetacrilatos como o UDMA (uretano dimetacrilato) são utilizados na composição dos selantes [12].

O uso de cimentos de ionômero de vidro (CIV) é bastante amplo na Odontologia restauradora e estes foram introduzidos como materiais alternativos para selar fôssulas e fissuras. O que os difere dos selantes resinosos é que a adesão dos CIVs ocorre por meio de trocas iônicas, produzindo uma retenção inferior [7]. Por apresentarem uma adesão relativamente baixa [13],

os CIVs são mais indicados por serem um veículo de liberação de fluoreto do que por serem um selante de fissura tradicional [14]. Eles são derivados de ácidos orgânicos, geralmente um ácido polimérico aquoso e um componente de vidro, como o flúor-aluminossilicato, embora possam ser encontrados outros componentes em produtos comerciais diferentes [15]. O CIV é considerado um material restaurador de alta relevância clínica, especialmente por sua capacidade de adesão química à estrutura do dente, sem a necessidade de um agente de união adicional [16]. Além disso, apresenta estética aceitável, adequado coeficiente de expansão térmica [17], boa compatibilidade biológica [18] e ação anticariogênica através da liberação prolongada de fluoretos.

Apesar das taxas de adesão dos selantes resinosos às estruturas dentárias serem clinicamente aceitáveis, alguns estudos laboratoriais mostram a ocorrência de infiltrações marginais em volta dos selantes [19]. Os patógenos podem permanecer viáveis por longo período de tempo na cavidade dentária, o que favorece a progressão de lesões de cárie e de falhas nas restaurações [20]. A infiltração marginal pode permitir a adesão de bactérias cariogênicas ao redor do selante, provocando falhas na atividade seladora [21] e redução do número de estreptococos mutans na saliva [22].

Dessa forma, tem sido proposta a adição de agentes antimicrobianos aos selantes, como triclosan [23] e a utilização de selante associado a vernizes com clorexidina [24]. Entre os diferentes agentes antimicrobianos usados a clorexidina tem se mostrado a substância mais segura e eficaz. A clorexidina (CX) é uma bis-biguanida e se caracteriza por ser uma base dicatiônica forte, o que a torna muito interativa com ânions. Estudos sugerem que um dos cátions fixa-se à película adquirida sobre o dente e o outro fica livre para interagir com as bactérias que estão tentando colonizar as superfícies bucais, característica altamente relevante para eficácia e substantividade da CX [25]. A CX possui ação ampla contra uma grande variedade de bactérias gram-positivas, especialmente estreptococos mutans, e gram-negativas, sendo também eficaz contra fungos, leveduras e alguns vírus [26]. A CX tem sido incorporada em vários materiais resinosos, como polímeros experimentais [27], cimentos resinosos [28], primers [29], adesivos dentinários [30] e nanocompósitos com fosfato de cálcio e fluoretos de cálcio [31]. Os estudos demonstram a viabilidade de incorporação de clorexidina em formulações de sistemas resinosos, sem comprometimento das suas propriedades físico-químicas [27] e também com potencial de inibição de crescimento bacteriano [31].

Em Odontologia, o desenvolvimento de materiais que forneçam atividades antimicrobianas, seria importante no controle das infecções da cavidade bucal. A incorporação de componentes dotados de propriedades antimicrobianas em selantes pode ser uma estratégia eficaz para modificar a cariogenicidade do biofilme e inibir o desenvolvimento das lesões de cárie, tornando o tratamento preventivo-restaurador global mais eficaz, através do controle do biofilme por meio da liberação de um agente antimicrobiano in loco. Adicionalmente, uma combinação de flúor e liberação de clorexidina pode apresentar resultados terapêuticos promissores. O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da incorporação de digluconato de clorexidina sobre a rugosidade e propriedades anticárie de um selante resinoso e um selante ionomérico quimicamente ativado.

2. PROPOSIÇÃO

Geral - Comparar o efeito anticárie de materiais utilizados como selantes de fósulas e fissuras incorporados por digluconato de clorexidina.

Objetivos específicos - Analisar a severidade da desmineralização produzida com o modelo microbiológico de alto desafio cariogênico, *in vitro*, ao redor de cavidades preenchidas com materiais seladores incorporados por digluconato de clorexidina. Analisar a influência do efeito do digluconato de clorexidina na composição microbiológica de biofilme de *S. Mutans* formado *in vitro*, através da contagem de micro-organismos.

3. CAPÍTULOS

Este trabalho de conclusão de curso está baseado nas normas da coordenação do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta os formatos de trabalho de conclusão de curso e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato. Assim sendo, este trabalho de conclusão de curso é composto por capítulo contendo um artigo a ser submetido para publicação no periódico “Clinical Oral Investigations”.

3.1. Capítulo 1

Effect of Chlorhexidine Addition on the Antibacterial Activity, Roughness and Anticaries Properties of Sealants: An *in vitro* Study.

Short title: Effect of Chlorhexidine Addition on the Anticaries Properties of Sealants: An *in vitro* Study.

Autors: Marcella Maria Rocha Lima¹ Ernanda Maria de Araújo Sales² Weslanny de Andrade Morais², Pedro Henrique Acioly Guedes Peixoto Vieira², David Queiroz de Freitas², Ramille Araújo Lima³, Lidiany Karla Azevedo Rodrigues²

Affiliations:

¹Graduation student in Dentistry, Federal University of Ceará, Rua Mosenhor Furtado, s/n, 60430-355, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Brazil

²Post-Graduation Program in Dentistry, Federal University of Ceará, Rua Mosenhor Furtado, s/n, 60430-355, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Brazil

³ School of Dentistry, Christus University Center, Av Dom Luís- 911, 60160-230, Meireles, Fortaleza, Brazil.

*Corresponding autor: Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Rua Monsenhor Furtado S/N - Bairro- Rodolfo Teófilo - CEP 60430-355 Fortaleza-CE

Brazil

E-mail: lidianykarla@yahoo.com

Tel.: +558533668232

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, do tipo investigação experimental em laboratório ou *in vitro*. Os procedimentos laboratoriais foram executados nos laboratórios de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Seleção dos dentes

Foram incluídos no estudo apenas incisivos bovinos hígidos, ficando excluídos dentes que apresentem coroas com áreas hipoplásicas ou quaisquer defeitos no esmalte; dentes com presença de trincas ou fraturas e dentes que não foram devidamente conservados em timol após a exodontia. Os dentes foram raspados manualmente com cureta periodontal (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para remoção dos restos teciduais, cálculos e outros detritos e então armazenados em solução de timol a 0,1% sob refrigeração (4°C) e utilizados por um período não superior a seis meses.

Delineamento experimental

O estudo *in vitro* foi conduzido de acordo com um delineamento em blocos onde os fatores em estudo foram: tipo de material em dois níveis, selante resinoso e selante ionomérico, bem como a incorporação do digluconato de clorexidina também em dois níveis: sem incorporação e com incorporação direta; resultando em 4 grupos experimentais.

Tabela 1- Descrição dos grupos

GRUPOS	DESCRIÇÃO
SR (Controle)	Selante resinoso puro
SI (Controle)	Selante a base de ionômero de vidro puro
SRDC	Selante resinoso com digluconato de clorexidona
SIDC	Selante a base de ionômero de vidro com digluconato de clorexidina

Tabela 2 – Descrição dos materiais utilizados

MATERIAL	FABRICAÇÃO	FORMULAÇÃO
RIVA PROTECT		Pó: Fluoreto de silicato
CÁPSULAS-	SDI BRASIL	de alumínio e ácido
Ionômero de vidro	INDÚSTRIAS E	poliacrílico
para fissuras e	COMÉRCIO LTDA.	Líquido: Ácido
protetor dental	SÃO PAULO- SP, BRAZIL	poliacrílico, ácido tartárico e ingredientes balanceados (não perigosos) Bisfenol A glicidilmetacrilato
SELANTE BIOSEAL	BIODINÂMICA. CURITIBA-PR, BRAZIL	(35,60%); Grupos dimetacrilatos, B.H.T, dióxido de silício, fluoreto de sódio, fluoreto de cálcio e catalisador
DIGLUCONATO DE	PANREAC,	
CLOREXIDINA	BARCELONA, SPAIN	20% em solução

Preparo das cavidades restauradoras

Os dentes incisivos bovinos foram fixados com cera pegajosa (Kota Ind. E Com. Ltda, São Paulo, SP) no centro de uma placa de acrílico (40 x 40 x 5mm) e seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, com o emprego de disco diamantado dupla face (Modelo 12205, Exttec®, Enfield, CT, EUA), montado em uma cortadeira metalográfica (Isomet®, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob baixa rotação e irrigação abundante. Nas faces vestibulares dos dentes foram realizados cortes seriados para a obtenção de blocos de esmalte ($\approx 8 \times 8 \times 2$ mm).

Para a realização do preparo cavitário, cavidades cilíndricas classe I foram realizadas com pontas diamantadas cilíndricas (# 3053, diâmetro 2 mm, KG Sorensen, Barueri, São Paulo), trocadas a cada 5 preparos. Os espécimes preparados foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos de acordo com o delineamento previamente descrito. Os blocos foram mergulhados em solução salina e esterilizados em autoclave em 121°C, por 15 minutos. Em uma câmara de fluxo laminar (Filtracom, Valinhos, SP), as cavidades presentes nos blocos de esmalte foram

preenchidas com os materiais, seguindo as instruções fornecidas pelos fabricantes de acordo com o grupo de tratamento. Nos grupos experimentais a incorporação de digluconato de clorexidina deu-se através da pré-pesagem, segundo cálculos estabelecidos, dos materiais estudados, acrescidos de 7,5 μ L de DG quando selante ionomérico e de 5,77 μ L de DG quando selante resinoso. Após a realização das restaurações, os blocos de esmalte foram desinfetados por meio da luz ultravioleta durante 30 minutos.

Formação de biofilme *in vitro* e indução de cárie

Os blocos de esmalte restaurados foram imersos em TSB, enriquecido com extrato de levedura contendo sacarose a 10% em placas de 24 poços. *S. mutans* UA 159 foi utilizado como inóculo a fim de proporcionar desafio cariogênico aos blocos de esmalte. Para tanto, inicialmente *S. mutans* foram primeiramente crescidos por 18 h em BHI em uma atmosfera de CO₂ a 5%, em 37°C. Foi feita a inoculação prévia de 100 μ l de cultura de *S. mutans* crescidos *overnight* em 45 mL de meio BHI, sendo distribuídos 2mL de meio em cada poço das placas de 24 poços. A inoculação das placas de 24 poços contendo TSB + extrato com *S. mutans* foi realizada uma única vez, no primeiro dia do experimento. Durante o período de formação de biofilme, uma vez por dia, os blocos foram lavados, três vezes por imersão numa placa contendo solução de NaCl a 0,89%, a fim de remover o biofilme fracamente ligado e então transferidos para novas placas de 24 cavidades com meio estéril.

Ao final desse período, os biofilmes foram coletados com cureta estéril e colocados em microtubos pré-pesados. O conjunto microtubo e biofilme foi pesado analiticamente para cálculo das diluições seriadas.

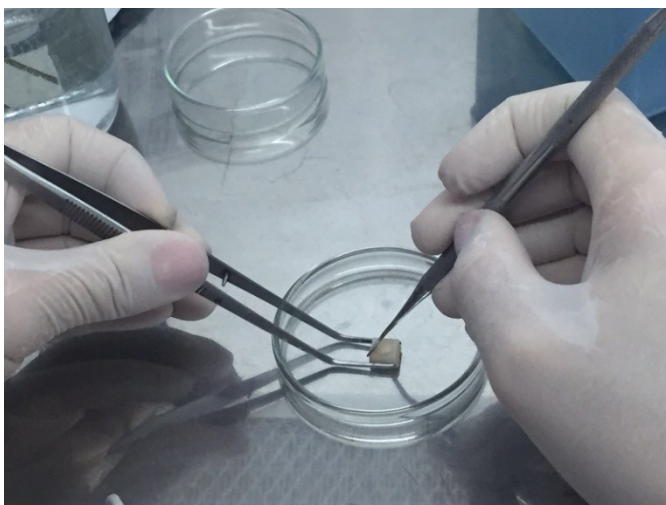


Figura 1: Coleta de biofilme sobre a face vestibular do bloco restaurado.

Análise microbiológica

Ao final da cultura, os biofilmes foram pesados, mergulhados em solução salina de NaCl a 0,9% (1µL/mg de biofilme) e sonicados em sonicador (Branson Ultrasonics 250,USA) durante 45 segundos, em intervalos de 15 em 15 segundos, com a finalidade de se obter suspensões contendo células simples. Em seguida, a suspensão foi diluída (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:000000, 1:10000000), e 10 µL das alíquotas foram plaqueadas em triplicata em meio BHI ágar para contagem de estreptococos do grupo mutans. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica em 37°C em uma pressão parcial de 5% de CO₂ por 48 horas. Após a incubação, a viabilidade celular bacteriana foi mensurada pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), e os valores finais expressos em UFC por miligrama de biofilme (UFC/mg).

Análise de peso seco do biofilme

Para a análise do peso seco do biofilme formado ao final dos 5 dias de experimento, após a semeadura, alíquotas de 200 µL da suspensão de biofilme de cada bloco foram coletados em microtubos limpos e pré-pesados. Adicionou-se 600 µL de álcool etílico 99,9% previamente armazenado em -20°C e as suspensões foram também armazenadas em -20°C pelo período mínimo de 24 horas.

Após a remoção do congelador, as suspensões foram vortexadas e centrifugadas durante 10 minutos em 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de álcool etílico a 70% foram novamente adicionados. A nova suspensão foi vortexada e centrifugada por mais 5 minutos em 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Sequencialmente, os microtubos contendo os precipitados foram armazenados em um dissecador até a remoção total da umidade interna e em seguida foram pesados em balança de precisão.

Análise da microdureza em corte longitudinal

Os blocos submetidos ao modelo microbiológico foram analisados pelo teste de microdureza em corte longitudinal do esmalte, para determinar a desmineralização ao redor das restaurações (Delta S). O ΔS corresponde à área de perda de dureza das amostras, sendo calculado pela diferença da área da projeção de cada amostra hígida e da área da amostra cariada. Os blocos foram seccionados em corte longitudinal na região central. Os cortes foram realizados com disco diamantado, acoplado à cortadeira elétrica (Isomet® 1000, Buehler, Lake Buff, USA). As análises foram efetuadas utilizando-se o microdurômetro (Future Tech

9000 FM, Future-Tech Corp. ,Kanagawa, Japan) acoplado a um software FM-ARS® e penetrador do tipo Knoop, sob carga de 25 g por 5 segundos. Foram feitas 20 identações em 10 diferentes profundidades abaixo da superfície externa do esmalte cariado de cada espécime, a 50 μm e a 100 μm da restauração, formando 2 fileiras de identações longitudinais nas profundidades: 10 μm , 20 μm , 30 μm , 40 μm , 50 μm , 70 μm , 100 μm , 150 μm , 200 μm e 300 μm , obtendo-se as médias dos valores de microdureza (KHN- Knoop Hardness Number) em cada profundidade para cada espécime.

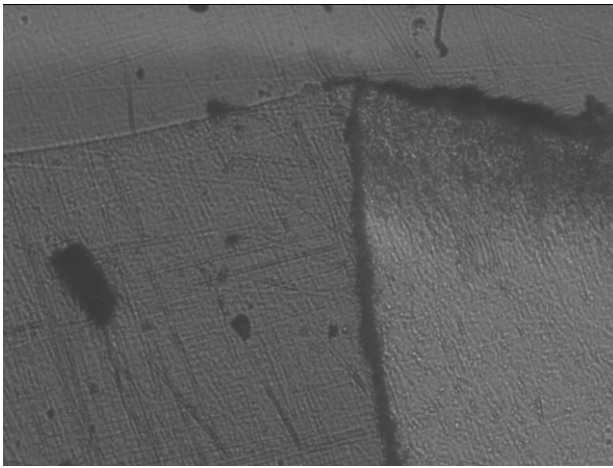


Figura 2: Análise da interface da restauração vista através do microdurômetro (Future Tech 9000 FM, Future-Tech Corp., Kanagawa, Japan)

Análise da rugosidade

Três espécimes em forma de disco (5 mm de diâmetro e 2mm de profundidade) foram preparadas para cada grupo em um molde de plástico. O molde de plástico foi colocado numa placa de vidro comum a matriz de poliéster sobre ele. Os corpos de prova foram analisados quanto ao seu padrão de rugosidade superficial por meio do rugosímetro Hommel Tester T 1000 (Hommelwerke, GmbH, Alte Tuttinger Strebe 20 D-7730 VS-Schwenningen). A ponta sensora de 1,6 μm de diâmetro realizou traçados em uma velocidade de 0,100 mm/s, totalizando 2 leituras por corpo de prova. O comprimento da amostragem ou cut-off empregado foi 2 mm. Foram realizadas mensurações através do parâmetro que se baseia em medida vertical ($R_a/ \mu\text{m}$). A média das 2 leituras foi utilizada como a média de cada espécime.

Análise estatística

Previamente, foram avaliadas as análises de normalidade e homogeneidade dos dados. Os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância a dois critérios (Two way ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para comparação múltiplas aos pares, o intervalo de significância foi estabelecido em 95%. O programa utilizado foi SigmaStart3.5(Sistaty).

4. RESULTADOS

Atividade antimicrobiana

Na análise do efeito antibacteriano, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de selante resinoso e ionomérico ($p=0,011$), não havendo diferença entre os grupos com incorporação ou não de clorexidina ($p=0,190$). Também não houve interação entre os dois fatores estudados, ou seja, tipo de material e incorporação de clorexidina ($p=0,403$), como observado no gráfico 1.

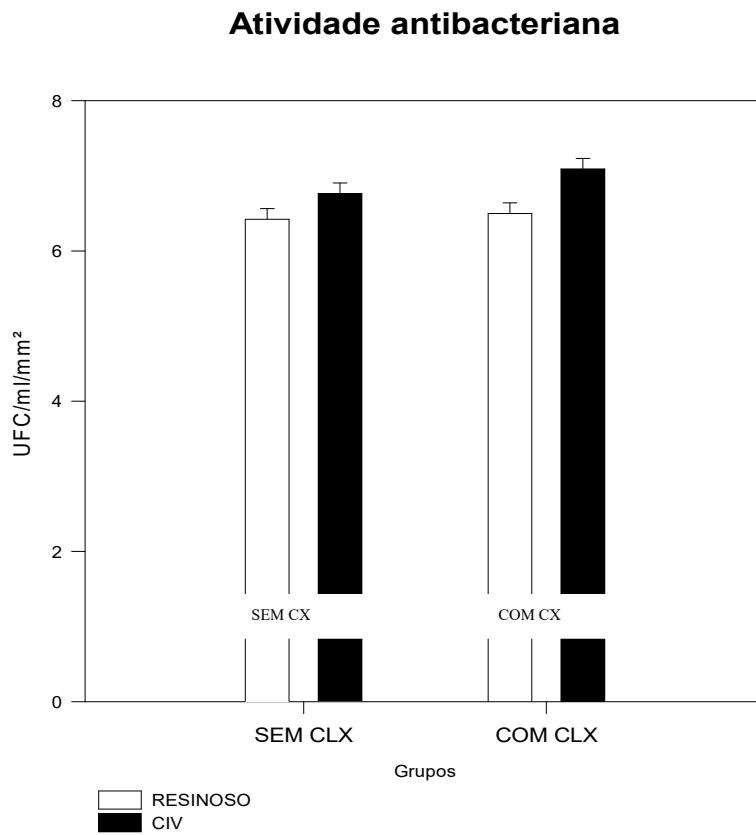


Gráfico 1 : Média e desvio padrão do efeito antibacteriano da incorporação de digluconato de clorexidina em selante resinoso e ionomérico.

Análise Peso Seco

Não houve diferença significativa entre os grupos selantes resinosos e ionomérico ($p=0,387$). Assim como não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com

clorexidina e sem clorexidina ($p=0,589$). Não houve diferença significativa entre a comparação dos grupos ($p=0,651$).

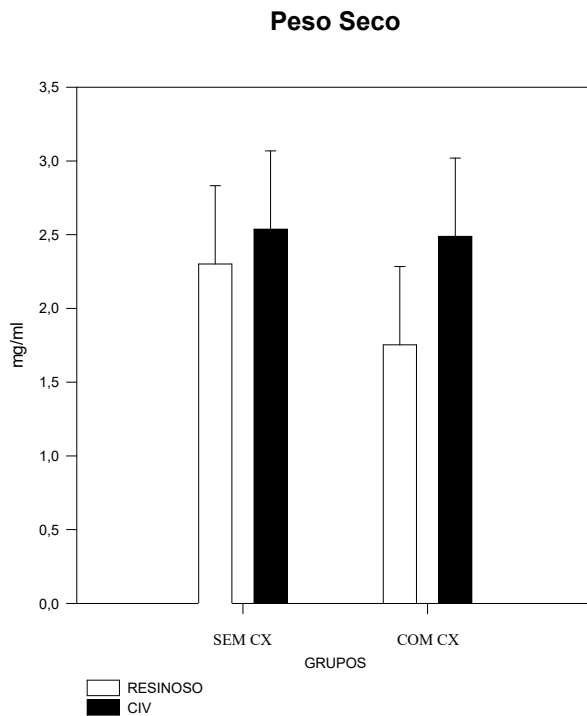


Gráfico 2: Apresenta valores medianos, bem como valores mínimos e máximos de inibição bacteriana para cada grupo estudado, de acordo com as condições analisadas

Microdureza Longitudinal

Na análise de dureza à $50\mu\text{m}$, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com selantes resinosos e ionoméricos ($p<0,001$), assim como entre os grupos com e sem clorexidina ($p=0,026$). Sendo o DeltaS do grupo ionomérico e do grupo com adição de clorexidina estatisticamente menor em relação aos outros grupos, não havendo interação estatisticamente significativa entre o tipo de material utilizado e a incorporação ou não de clorexidina ($p=0,259$).

Já na análise de dureza à $100\mu\text{m}$, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos com selantes resinosos e ionoméricos ($p<0,001$), sendo no último onde houve a menor perda de dureza.

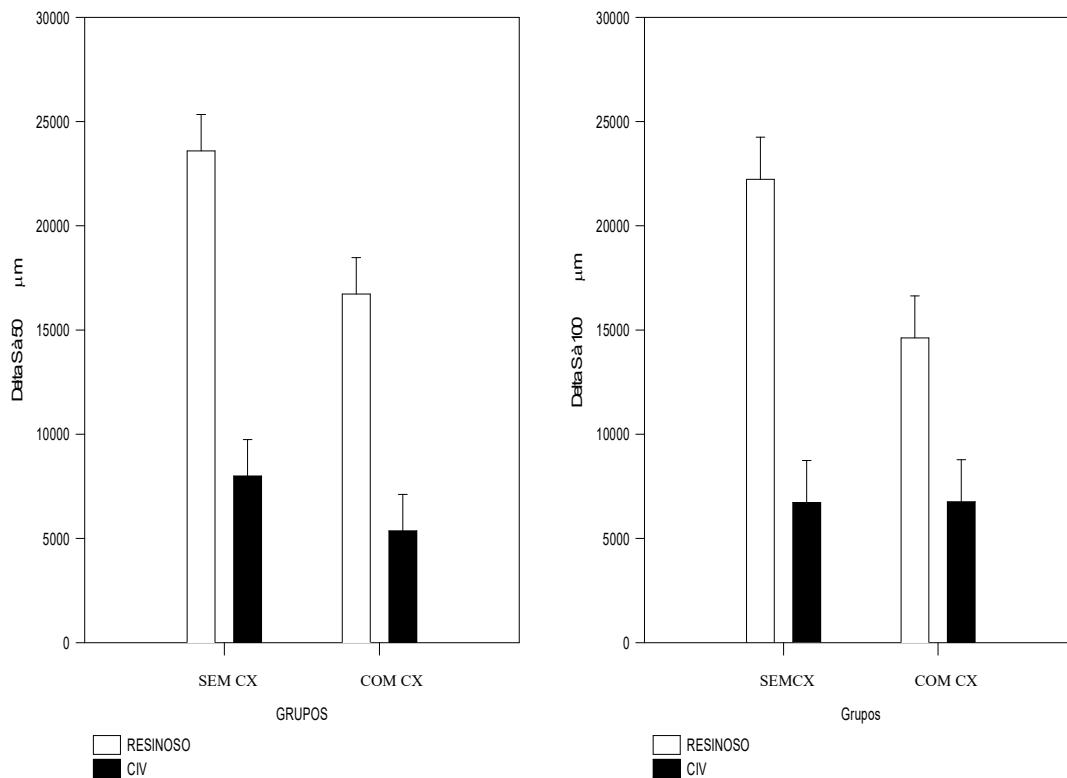


Gráfico 3: Valores de perda de dureza (DeltaS) de acordo com o material e a profundidade à 50µm(A) e à 100µm (B) a partir da margem da restauração. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significante entre os grupos a cada distância ($p < 0,05$)

Rugosidade

Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos nem avaliando o tipo de material ($p=0,340$) e nem avaliando a incorporação de clorexidina ($p=0,470$). Também não houve interação entre os dois fatores: material e incorporação de clorexidina ($p= 0,191$).

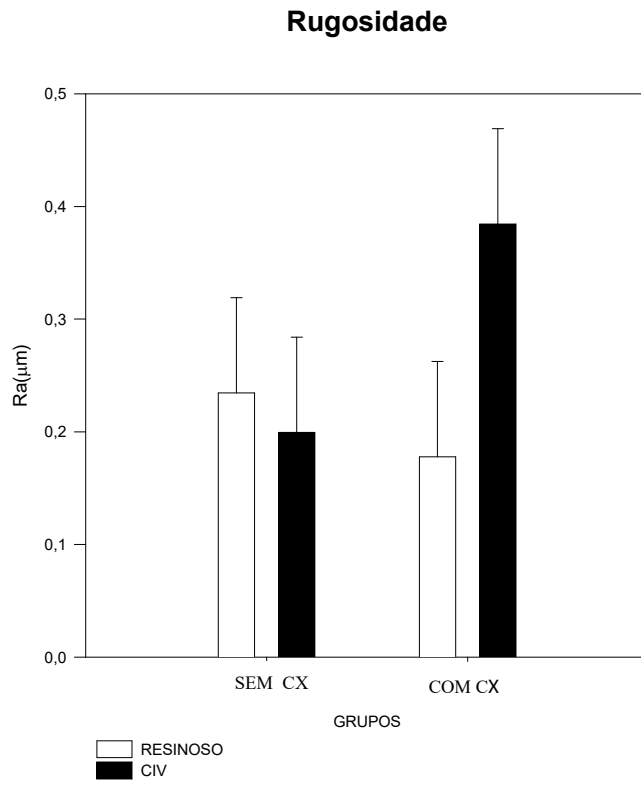


Gráfico 4: Média e desvio padrão da rugosidade de superfície dos materiais avaliados.

5. DISCUSSÃO

Um estudo prévio utilizando espécimes de material, selantes ionoméricos (SIG;VII Fuji, Japão) e resinosos (Clinpro 3M ESPE, EUA) incorporados com digluconato de clorexidina (20%) ajustados a uma concentração final de 1%, mostrou aumento significativo da atividade antibacteriana em ambos os selantes.

Tais resultados discordam dos dados antimicrobianos do presente estudo, onde houve alteração na capacidade antimicrobiana entre os grupos de selantes ionoméricos e selantes resinosos ($p=0,011$), porém não houve diferença estatisticamente significativa em relação à incorporação ou não de clorexidina ($p=0,190$). Devem-se considerar alguns fatores quanto ao corpo de prova usado, tendo em vista que no presente trabalho, a coleta de biofilme foi dada diretamente sobre o bloco restaurado no 5º dia de formação de biofilme, sendo a concentração de digluconato de apenas 0,5%. No estudo anterior [32], o biofilme foi coletado sobre um espécime cilíndrico do material estudado no 7º e 30º dias de formação do biofilme, sendo avaliado sobre mensuração do halo de inibição criado ao redor do espécime. Adicionalmente, a concentração de digluconato era de 1%.

O uso de corpos de prova feitos somente com o material analisado pode-se levar a uma maior liberação de clorexidina, haja vista que o tamanho do espécime utilizado anteriormente era de 6 mm de diâmetro, ocorrendo liberação de clorexidina em todos os planos do espécime. Já a liberação de clorexidina no bloco de dente bovino restaurado, do trabalho em tela, onde a restauração possuía aproximadamente 2mm de diâmetro, ocorreu somente em um plano que está em contato direto com o biofilme.

A coleta de biofilme posterior no 7º e 30º dias, relatadas no estudo anterior, pode significar uma maior liberação de clorexidina, gerando maior efeito antimicrobiano em comparação à do presente trabalho, onde a coleta de biofilme dava-se apenas no 5º dia de formação de biofilme. É importante ressaltar ainda que o método usado anteriormente (halo de inibição), não possuiu uma precisão analítica para análise do efeito antibacteriano quanto à contagem de UFCs.

Outro estudo anterior [33] mostrou um aumento significativo na rugosidade do cimento de ionômero quando incorporado com clorexidina, mostrando-se coerentes aos resultados encontrados neste estudo, onde há uma tendência ao aumento da rugosidade quando o digluconato de clorexidina é incorporado ao selante ionomérico. Fato que poderia ter

ocasionado um menor efeito antibacteriano do selante ionomérico com clorexidina quando comparado ao selante resinoso com clorexidina, devido à tendência ao maior acúmulo de biofilme, apresentando predisposição a maior rugosidade do selante ionomérico incorporado com digluconato de clorexidina, tendência encontrada também após a análise do peso seco do biofilme formado após 5 dias.

Com relação à inibição de cárie em esmalte, estudos mostram que o flúor é liberado de maneiras diferentes, dependendo do tipo de material utilizado. Diante disso, o flúor é liberado em ambos os materiais testados, porém com uma liberação de 20 a 30 vezes maior em selantes ionoméricos, quando comparado a selantes resinosos [34]. O flúor age diretamente no processo anticárie, atuando sobre o processo de desmineralização-rem mineralização, não tendo efeito antimicrobiano. Diante disto, pode-se concluir, segundo os resultados avaliados na microdureza longitudinal a 50 μm , que o selante ionomérico tem uma tendência maior a proporcionar efeito anticárie do que o selante resinoso, possivelmente pelo fato já discutido que o selante ionomérico tem uma liberação de flúor muito maior, quando comparado ao resinoso. Assim, a incorporação de clorexidina aos selantes mostrou ter uma ação conjunta ao flúor, reduzindo a progressão da desmineralização, demonstrando uma maior dureza naqueles materiais que não sofreram incorporação com clorexidina. Quando se compara o valor de DeltaS em 50 μm e em 100 μm , pode-se perceber que o efeito de incorporação da clorexidina, potencializando ao efeito do flúor, que se dá nas áreas mais próximas à restauração(50 μm).

Baseado nos dados encontrados nesse estudo, pode-se indicar o selante ionomérico incorporado por digluconato de clorexidina, como o grupo que mais apresentou atividade anticárie, apresentando, assim, um importante aliado aos profissionais que buscam alternativas que visam diminuir o processo de desmineralização e estimular a remineralização dentária.

6. CONCLUSÃO

A incorporação de CX nos selantes não mostrou resultados positivos na análise antibacteriana na concentração de 0,5%, entretanto quando se compara apenas selantes ionoméricos e resinosos puros, o selante resinoso apresenta melhor efeito antibacteriano.

Ao se comparar melhor efeito anticárie pela microdureza longitudinal à 50 μ m, o selante ionomérico mostra melhor efeito quando comparado ao resinoso, apresentando menor desmineralização no esmalte. Ao analisar a microdureza á 100 μ m, não houve diferenças significativas devido à maior distância da margem da restauração.

REFERÊNCIAS

- [1] Fejerskov, O. (2004) Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*, 38, pp. 182–191
- [2] Paes Leme, A.F.; Koo, H.; Bellato, C.M.; Bedi, G.; Cury, J.A. (2006) The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. *J Dent Res*, 85, pp. 878-887
- [3] Ahovuo- Saloranta A. *et al.* Pit and fissure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, CD001830.
- [4] Berger, S.; Goddon, I.; Chen, C.M.; *et al.* (2010) Are pit and fissure sealants needed in children with a higher caries risk? *Clinical Oral Investigation*, v.14, p. 613-620.
- [5] Yengopal, V.; Mickenautsch, S.; Bezerra, A.C.; *et al.* (2009) Caries prevent effect of glass ionomer and resin based fissure sealants on permanent teeth: a metaanalysis. *Journal of Oral Science*, v.51, p. 373-382.
- [6] Perez- Lagarin, L.; Cortés-Lillo, O.; Garcia-Ballesta, C.; *et al.* (2003) Marginal microleakage of two fissure sealants: A comparative study. *Journal of Dentistry for Children*, v.70, p. 24-28.
- [7] Frencken, J. E. The State of the art of ART sealant. *Dental update*, v.41, n 2, p. 119-120, 122-124.
- [8] Feigal, R.J. (2002) The use of pit and fissure sealants. *Pediatric Dentistry*, v. 24, p. 415-422.
- [9] Kloukos, D.; Pandis, N.; Eliardes, T. (2013) In vivo bisphenol a release from dental pit and fissure sealants: a systematic review. *Journal of a Dentistry*, v. 41, n. 8, p. 659- 667.
- [10] Featherstone, J.D. (2006) Delivery challenges for fluoride chorhexidine and xylitol. *BMC Oral Health*, v. 6, p. S8.
- [11] Adair, S.M. (2003) The role of sealants in caries prevention programs. *J Calif Dent Assoc*. 31:227.
- [12] Mc Donald, R.; Avery, D.R. (2001) *Odontopediatria*. 7a ed. Guanabara, Koogan.
- [13] Raadal, M.; Utkilen, A.B.; Nilsen, O.L. (1996) Fissure sealing with a light cured resin reinforced glass ionomer cement (Vitrebond) compared with a resin sealant. *International Journal of Pediatric Dentistry*, v. 6, p. 236-239.
- [14] Welbury, R.; Raadal, M.; Lygidakis, N.A. (2004) EAPD guidelines for the use of a pit and fissure sealants. *European Journal of Pediatric Dentistry*, v. 5, n. 3, p. 179- 184.
- [15] Van Noort, R. (2002) *Glass-ionomer cements and resin-modified glass-ionomer cements, Introduction to dental materials*, Edinburgh, UK: Mosby; v.2, p.129-130.
- [16] Lin, A.; McIntyre, N. S.; Davidson, R. D. (1992) Studies on the adhesion of glass-ionomer cements to dentin. *Journal of Dental Research*, v.71, p.1836-1841.

- [17] Naasan, M. A.; Watson, T. F. (1998) Conventional glass ionomers as posterior restorations. A status report for the American Journal of Dentistry. American Journal of Dentistry, v. 11, p.36-45.
- [18] Hatton, P. V.; Hurrell-Gillingham, K.; Brook, I. M. (2006) Biocompatibility of glass ionomer bone cements. Journal of Dentistry, v.34, p. 598- 601.
- [19] Koyuturk, A.E. *et al.*(2006) Effect of thermal cycling on microleakage of a fissure sealant polymerized of different light sources. Dent Mater J. 25: 713-718.
- [20] Lula, E. C.; Monteiro-Neto, V.; Alves, C. M.; Ribeiro, C. C. (2009) Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin in primary teeth: a randomized clinical trial. Caries Research, v.43, n.5, p.354-358.
- [21] Jodkwska, E. (2008) Efficacy of pit and fissure sealing: long- term clinical observations. Quintessence Int; 39: 593-602.
- [22] Volpato,F. C.; Jeremias,F.; Spolidório,D. M. P.; Corrêa Da Silva,S. R, Valsecki Junior,A.; Rosell, F. L. (2011) Effects of oral environment stabilization procedures on *Streptococcus mutans* counts in pregnant women. Brazilian Dental Journal, v.22, n.4, p.280-284.
- [23] Rathke, A.*et al.* (2010) Antibacterial activity of a triclosan containing resin composite matrix against three common oral bacteria. J Mater Sci Mater Med. 21: 2971- 2977.
- [24] Wicht, M.J. *et al.* (2003) Treatment of root caries lesions with chlorhexidine containing varnishes and dentin sealants. Am J Dent. 16 Spec: 25A- 30A.
- [25] Jenkins, S.; Addy, M.; Wade, W. (1988) The mechanism of action of chlorhexidine. A study of a plaque growth on enamel inserts in vivo. J Clin Periodontol, 15: 415- 424.
- [26] Wade, W. G.; Addy, M. (1989) In vitro activity of chlorhexidine containing mouthwash against subgingival bacteria. J Periodontol. 60: 521-525
- [27] Pallan, S. *et al.* (2012) Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporation catechin or chlorhexidine. Dent Mater. 28: 687- 684.
- [28] Hiraishi, N. *et al.* (2010) Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine incorporated polymethyl methacrylate based resin cement. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 94: 134- 140.
- [29] Hiraishi, N. *et al.* (2010) Effect of chlorhexidine incorporated into a self-etching primer on dentin bond strength of a luting cement. J Dent. 38: 496- 502.
- [30] Candemaro, M. *et al.* (2009) Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch and rinse dentin bonds: a 12 month in vitro study. J Adhes Dent. 11: 191- 198.
- [31] Cheng, L. *et al.* (2012) Antibacterial and physical properties of calcium phosphate and calcium fluoride nanocomposites with chlorhexidine. Dent Mater. 28: 573- 583.
- [32] Shanmugaavel, A. K.; Asokan, S.; John, J. B.; Priya, P.R.; Devi, J. G. (2015) Effect of one percent chlorhexidine addition on the antibacterial activity and mechanical properties of

sealants: an in vitro study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 8(3): 196-201.

[33] Korkmaz, F.M.; Tuzuner, T.; Baygin, O.; Buruk, C. K.; Durkan, R.; Bagis, B. (2013) Antibacterial activity, surface, roughness, flexural strength, and solubility of conventional luting cements containing chlorhexidine diacetate/ cetrimide mixtures. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. Vol 110. Issue 2.

[34] Bayrak, S.; Tunc, E.S.; Aksoy, A.; Ertas, E.; Guvenc, D.; Ozer, S. (2010) Fluoride release and recharge from different materials used as fissure sealants. *European Journal of Dentistry*. Vol 4.

ANEXO A: NORMAS DA REVISTA CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS

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.

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* 341:325–329

- 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

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
- 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.
- 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.

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.

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.

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

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.

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."