

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *A. CHICA*
EM FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS E SEU EFEITO NAS
PROPRIEDADES FÍSICO/MECÂNICAS DE RESINAS
POLI(METILMETACRILATO)

Camila Maria Martins Brandão

CAMILA MARIA MARTINS BRANDÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *A. CHICA*
EM FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS E SEU EFEITO NAS
PROPRIEDADES FÍSICO/MECÂNICAS DE RESINAS
POLI(METILMETACRILATO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Área de Concentração: Odontologia Integrada

Orientador: Prof. Dr. Rudys Rodolfo de Jesus Tavares

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Hass

SÃO LUÍS – MA

2019

B817a Brandão, Camila Maria Martins.

Avaliação da citotoxicidade do extrato de *A. chica* em fibroblastos e queratonócitos e seus efeitos nas propriedades físico/mecânicas de resinas poli(metilmetacrilato). / Camila Maria Martins Brandão. – São Luís: UNICEUMA, 2019.

64f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Odontologia. Universidade CEUMA, 2019.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marina Carvalho CRB13/823
Proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio eletrônico ou mecânico, inclusive através de processos xerográficos, sem permissão expressa do Autor. (Artigo 184 do Código Penal Brasileiro, com a nova redação dada pela Lei n.8.635, de 16-03-1993).

Nome: Camila Maria Martins Brandão

Título: Avaliação da citotoxicidade do extrato de *A. chica* em fibroblastos e queratinócitos e seu efeito nas propriedades físico/mecânicas de resinas poli(metilmetacrilato)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rudys Rodolfo de Jesus Tavarez

Instituição: Universidade Ceuma

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Letícia Machado Gonçalves

Instituição: Universidade Ceuma

Assinatura: _____

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa

Instituição: Universidade Ceuma

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão. Vocês são a razão pela qual batalho diariamente em busca de excelência profissional. Dedico esta, assim como todas as outras vitórias, a vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma vez me mostrar que, mesmo quando os objetivos parecem impossíveis, com muita determinação, podemos alcançá-los.

Aos meus pais, Marcos e Tatiana, por todo apoio e incentivo. Com vocês eu aprendi que é preciso lutar e perseverar todos os dias.

Ao meu irmão, Ciro, por sempre torcer em cada novo obstáculo que decido enfrentar.

Ao meu noivo, Felipe, por não medir esforços em me ajudar, mesmo que de longe, e me mostrar que a calma, paciência e dedicação nos permitem chegar exatamente onde desejamos.

Aos meus avós, Antônio Augusto, Conceição Brandão (*in memoriam*), Carlos César (*in memoriam*) e Conceição Martins (*in memoriam*). Vocês sempre serão exemplos a serem seguidos.

Aos meus amigos, por se fazerem presentes, principalmente nos momentos mais estressantes.

A toda a minha família, por entender minhas ausências durante esses dois anos de pós-graduação.

A Universidade Ceuma, seu corpo docente, direção e administração por fazerem parte dessa trajetória.

Ao meu orientador, professor Dr. Rudys Rodolfo de Jesus Tavares, pelo auxílio durante a confecção deste trabalho.

À minha co-orientadora, professora Dr^a. Viviane Hass. Obrigada por toda a orientação e dedicação durante toda a pesquisa.

Aos professores Letícia Gonçalves e Andres Cardenas, pelas considerações durante a qualificação e ajuda sempre que lhes solicitei.

Aos alunos da graduação do curso de Odontologia, Rammon e Lucas por me auxiliarem quando precisei aprender o que eles já dominavam.

Aos meus amigos da pós-graduação. Nosso caminho foi árduo, mas nossa união nos impulsionou a sermos cada dia mais fortes. Vocês foram fundamentais durante toda a trajetória.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha trajetória, obrigada.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

BRANDÃO, CMM. Avaliação da citotoxicidade do extrato de *A. chica* em fibroblastos e queratinócitos e seu efeito nas propriedades físico/mecânicas de resinas poli(metilmetacrilato) [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2019.

RESUMO

Objetivos: Investigar citotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos e efeito nas propriedades físico/mecânicas de resinas poli(metilmetacrilato) (PMMA). **Materiais e Métodos:** Extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* (*A. chica*) foi preparado em concentração de estoque (5.000 µg/mL) e diluído em 10 (AcHE10), 50 (AcHE50) e 100 (AcHE100) µg/mL. Água destilada (controle) e hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) foram utilizados como grupos controles negativo e positivo, respectivamente. Citotoxicidade foi avaliada pelo método MTT em fibroblastos e queratinócitos tratados com as soluções citadas. Para avaliação das propriedades físico/mecânicas, discos de PMMA foram imersos nas soluções durante 14 e 28 dias. Rugosidade superficial, alteração de cor e resistência flexural foram verificadas utilizando rugosímetro, espectrofotômetro portátil e máquina de ensaios universais, respectivamente. Estatística foi analisada por ANOVA 1 e 2 fatores, pos hoc de Tukey e teste de normalidade, nível de significância de 5%. **Resultados:** AcHE10 não apresentou citotoxicidade em células epiteliais, comparando-se ao grupo controle ($p > 0,05$). Demais grupos experimentais foram citotóxicos ($p > 0,05$), porém, com valores

menores quando comparados ao NaOCl ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas nas propriedades físico/mecânicas independente do grupo ou tempo avaliados ($p > 0,05$). **Conclusões:** O extrato de *A. chica*, quando utilizado em altas concentrações, foi citotóxico em células fibroblastos e queratinócitos e, independente das concentrações utilizadas, não interferiu nas propriedades físico/mecânicas das resinas PMMA. **Relevância clínica:** Os achados deste estudo, aliados ao alto potencial antifúngico descrito na literatura, embasam possível utilização do extrato de *A. chica* como substância alternativa no combate à candidose.

Descritores: *Arrabidaea chica*. Citotoxicidade. Fibroblastos. Queratinócitos. Poli(metilmetacrilato).

BRANDÃO, CMM. Evaluation of the cytotoxicity of *A. chica* extract in fibroblasts and keratinocytes and its effect on the physical/mechanical properties of poly(methylmetacrylate) resins [dissertation]. São Luís, Universidade CEUMA; 2019.

ABSTRACT

Objectives: To investigate cytotoxicity in fibroblasts and keratinocytes and effect on the physical/mechanical properties of poly(methylmethacrylate) (PMMA) resins. **Materials and Methods:** Hydroalcoholic extract of *Arrabidaea chica* (*A. chica*) was prepared in stock concentration (5.000 µg/mL) and diluted in 10 (AcHE10), 50 (AcHE50) and 100 (AcHE100) µg/mL. Distilled water (control) and 1% sodium hypochlorite (NaOCl) were used as negative and positive control groups, respectively. Cytotoxicity was assessed by the MTT method in fibroblasts and keratinocytes treated with the above solutions. To evaluate the physical/mechanical properties, PMMA disks were immersed in the solutions for 14 and 28 days. Surface roughness, color change and flexural strength were verified using rugosimeter, portable spectrophotometer and universal testing machine, respectively. Statistical analysis was analyzed by ANOVA 1 and 2 factors, Tukey pos hoc and normality test, significance level of 5%. **Results:** AcHE10 did not show cytotoxicity in epithelial cells, comparing to the control group ($p>0,05$). Other experimental groups were cytotoxic ($p>0,05$), however, with lower values when compared

to NaOCl ($p < 0,05$). There were no significant differences in physical/mechanical properties independent of the group or time evaluated ($p > 0,05$). **Conclusions:** The extract of *A. chica*, when used at high concentrations, was cytotoxic in fibroblast cells and keratinocytes and, regardless of the concentrations used, did not interfere in the physical/mechanical properties of PMMA resins. **Clinical Relevance:** The findings of this study, allied to the high antifungal potential described in the literature, support the possible use of *A. chica* extract as an alternative substance in the fight against candidosis.

Key words: *Arrabidaea chica*. Cytotoxicity. Fibroblasts. Keratinocytes. Polymethylmethacrylate

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
±	Mais ou menos
Δ	Varição
a*	Coordenada vermelho/verde
<i>A. chica</i>	<i>Arrabidaea chica</i>
AcHE 10	Extrato hidroalcoólico de <i>A. chica</i> na concentração de 10 µg/mL
AcHE100	Extrato hidroalcoólico de <i>A. chica</i> na concentração de 100 µg/mL
AcHE50	Extrato hidroalcoólico de <i>A. chica</i> na concentração de 50 µg/mL
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
b	Largura do espécime
b*	Coordenada amarelo/azul
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAP	Candidose Associada à Prótese
Cgen	Conselho de gestão do patrimônio genético
CIE	Comissão Internacional de Iluminação
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
d	Espessura do espécime

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Cor
h	Hora
kgf	Quilograma-força
L	Comprimento de distância entre dois pontos
L	Litro
L*	Luminosidade
MIC	Mínima Concentração Inibitória
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MPa	Mega pascal
MTT ..	Bromídeo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil-tetrazólio
n	Tamanho da amostra
N ₂	Gás nitrogênio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
°C	Grau celsius
P	Carga máxima aplicada
PMMA	Poli(metilmacrilato)
Ra	Rugosidade

RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
S	Resistência flexural
s	Segundo
SFB	Soro Fetal Bovino
T1	Absorbância da suspensão celular sem tratamento
TA	Média da absorbância da célula tratada
U	Unidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média e desvio-padrão obtidos das análises da rugosidade superficial (μm) dos 5 grupos nos tempos avaliados	31
Tabela 2 Média e desvio-padrão obtidos das análises da alteração de cor (ΔE) dos 5 grupos nos tempos avaliados	32
Tabela 3 Média e desvio-padrão obtidos das análises da resistência flexural (MPa) para todos os grupos experimentais	32

LISTA DE FIGURAS

Fig 1 Análise de 48h da citotoxicidade por viabilidade celular (%) pelo método MTT para fibroblastos e queratinócitos	30
Fig 2 Folhas de <i>Arrabidaea chica</i>	48
Fig 3 Esquema demonstrativo: Cultura celular	50
Fig 4 Esquema demonstrativo: Tratamento com os agentes testados	51
Fig 5 Esquema demonstrativo: Avaliação da viabilidade celular	51
Fig 6 Esquema demonstrativo: Avaliação da rugosidade superficial	53
Fig 7 Esquema demonstrativo: Avaliação da alteração de cor	54

SUMÁRIO

RESUMO	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>A. CHICA</i>	23
2.2 CITOTOXICIDADE	24
2.3 EFEITO DO EXTRATO DE <i>A. CHICA</i> NAS PROPRIEDADES FÍSICO/MECÂNICAS DA RESINA ACRÍLICA (PMMA)	26
2.3.1 RUGOSIDADE SUPERFICIAL	26
2.3.2 ALTERAÇÃO DE COR	27
2.3.3 RESISTÊNCIA FLEXURAL	28
2.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	29
3. RESULTADOS	29
3.1 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE	29
3.2 ANÁLISE DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL	31
3.3 ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DE COR	31
3.4 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA FLEXURAL	32
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO 1	48
ANEXO 2	56

CAPÍTULO 1

BRANDÃO, CMM. Avaliação da citotoxicidade do extrato de *A. chica* em fibroblastos e queratinócitos e seu efeito nas propriedades físico/mecânicas de resinas poli(metilmetacrilato) [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2019.

RESUMO

Objetivos: Investigar citotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos e efeito nas propriedades físico/mecânicas de resinas poli(metilmetacrilato) (PMMA). **Materiais e Métodos:** Extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* (*A. chica*) foi preparado em concentração de estoque (5.000 µg/mL) e diluído em 10 (AcHE10), 50 (AcHE50) e 100 (AcHE100) µg/mL. Água destilada (controle) e hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) foram utilizados como grupos controles negativo e positivo, respectivamente. Citotoxicidade foi avaliada pelo método MTT em fibroblastos e queratinócitos tratados com as soluções citadas. Para avaliação das propriedades físico/mecânicas, discos de PMMA foram imersos nas soluções durante 14 e 28 dias. Rugosidade superficial, alteração de cor e resistência flexural foram verificadas utilizando rugosímetro, espectrofotômetro portátil e máquina de ensaios universais, respectivamente. Estatística foi analisada por ANOVA 1 e 2 fatores, pos hoc de Tukey e teste de normalidade, nível de significância de 5%. **Resultados:** AcHE10 não apresentou citotoxicidade em células epiteliais, comparando-se ao grupo controle ($p>0,05$). Demais grupos experimentais foram citotóxicos ($p>0,05$), porém, com valores

menores quando comparados ao NaOCl ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas nas propriedades físico/mecânicas independente do grupo ou tempo avaliados ($p > 0,05$). **Conclusões:** O extrato de *A. chica*, quando utilizado em altas concentrações, foi citotóxico em células fibroblastos e queratinócitos e, independente das concentrações utilizadas, não interferiu nas propriedades físico/mecânicas das resinas PMMA. **Relevância clínica:** Os achados deste estudo, aliados ao alto potencial antifúngico descrito na literatura, embasam possível utilização do extrato de *A. chica* como substância alternativa no combate à candidose.

Descritores: *Arrabidaea chica* · Citotoxicidade · Fibroblastos · Queratinócitos · Polimetilmetacrilato.

1. INTRODUÇÃO

A resina acrílica à base de polimetilmetacrilato (PMMA) é o material comumente utilizado como base de próteses totais e parciais removíveis, graças ao seu fácil processo de fabricação e preço relativamente baixo [1, 2]. Contudo, o PMMA se encontra integralmente em contato com a mucosa oral e, propriedades inerentes a esse material como porosidade e rugosidade, resultam no acúmulo [3, 4] e proliferação de microrganismos [5]. Associada a isso, a deficiência na higienização das próteses, principal medida utilizada para o controle da colonização fúngica nas superfícies desses

aparelhos, levam à aglomeração de restos alimentares com formação de biofilme. Assim, as atividades inflamatória e infecciosa são intensificadas na mucosa oral, causando candidose associada à prótese (CAP) [3, 4, 6, 7].

Para o controle dessa infecção, são utilizadas soluções como nistatina, clorexidina [8] e fluconazol [9]. Contudo, apesar de eficazes, alguns destes medicamentos são potencialmente citotóxicos [9], e podem desencadear reações alérgicas, insuficiência adrenal, necrose hepática e resistência a drogas [8]. Tais estratégias podem, ainda, falhar na remoção do biofilme [10], seja pela incapacidade inerente dos fármacos, ou pela seleção de cepas resistentes [11].

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução mais comumente indicada para higiene de próteses totais e parciais removíveis graças ao seu alto potencial desinfetante [12, 13]. Todavia, algumas desvantagens do seu uso são alta toxicidade [14], capacidade de corroer os metais presentes nas próteses [15, 16], possibilidade de clarear a resina acrílica [15-18] e aumentar sua rugosidade superficial [19].

Considerando o desafio do combate à CAP e buscando menos efeitos deletérios, novas alternativas têm sido estudadas na tentativa de serem desenvolvidos fármacos cada vez mais eficazes e seguros para o controle microbiano em pacientes desdentados [20]. Nesse sentido, verifica-se que entre 1981 e 2010 diversas drogas de origem

natural revelaram potencial terapêutico contra diversas espécies de fungos [21].

Desde 2009, o Brasil conta com a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), cujo objetivo é estimular o desenvolvimento de fitoterápicos nacionais e assim, promover melhorias na atenção à saúde da população [22]. A espécie *Arrabidaea chica* Verlot (*A. chica*), conhecida popularmente por "Pariri", "Crajiru", "Carajuru" ou "Carajiru" [23, 24], é uma planta pertencente à essa relação e nativa da região amazônica, ocorrendo em todas as regiões tropicais da América do Sul e África [25]. É empregada pelos habitantes da Amazônia em forma de chá feito de suas folhas para tratar inflamação da pele, distúrbios gastrointestinais, melena, enterocolite, leucemia, anemia e albuminúria. Os índios da Amazônia usam ainda, uma decocção das folhas para a realização de limpeza de feridas crônicas e tratamento de infecções fúngicas e herpes [26].

Na literatura, diversos efeitos biológicos e farmacológicos da *A. chica* foram relatados, como seu grande potencial antimicrobiano [27-29], demonstrando ação antifúngica contra espécies de *Candida* [27-30], eficácia quando utilizado na cicatrização de feridas, efeito anti-inflamatório e atividade antioxidante [31-35], sendo utilizada geralmente na forma de extrato hidroalcoólico [36] ou diclorometano [28].

Buscando uma possível substância de imersão para próteses dentárias que promovam menos efeitos deletérios e graças aos efeitos da *A. chica* encontrados na literatura, este estudo teve como objetivo investigar a utilização do extrato de *A. chica* quanto a citotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos e as possíveis alterações nas propriedades físico/mecânicas de resinas acrílicas PMMA. A hipótese nula a ser testada é que o extrato de *A. chica* não irá afetar as atividades de citotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos, bem como as propriedades físico/mecânicas da resina acrílica PMMA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DO EXTRATO DE *A. CHICA*

Folhas de *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) Verlot foram obtidas no Centro de Pesquisas Pluridisciplinar Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas, Brasil (banco de germoplasma do acesso 06; exsicata 1865; Aprovação nº 010150 / 2012- 9 para Acesso e Remessa do Patrimônio Genético para fins de pesquisa científica – CGen/MMA, CNPq) .

O extrato padronizado hidroalcoólico de *A. chica* foi obtido pelo método descrito por Jorge et al. [31] com modificações [37]. Um quilo de folhas secas e moídas foi extraído usando 5L de mistura acidificada (0,3% de ácido cítrico) de solução de hidroalcoólica a 70%

durante uma hora e meia, à temperatura ambiente, por maceração, repetindo o procedimento três vezes. Após a filtração, o solvente orgânico foi evaporado usando vácuo e removeu-se a água residual por secagem por pulverização (Mini Spray Dryer B-290, alça B-295; Büchi®, Suíça) com temperatura de entrada $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e temperatura de saída de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, aspiração de 250 mL/h de N_2 ambiente não filtrado, pressão de injeção de 414 L/h e fluxo de alimentação de 5 mL/min à temperatura ambiente, produzindo o produto final.

A solução mãe foi confeccionada com 5.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato de *A. chica* diluídos em dimetilsulfóxido DMSO (100%). A esterilização do extrato foi realizada quimicamente pelo uso do próprio DMSO.

Após toda caracterização, o extrato hidroalcoólico de *A. chica* foi preparado, de acordo com estudo piloto prévio, nas concentrações 10 (AcHE10), 50 (AcHE50) e 100 (AcHE100) $\mu\text{g}/\text{mL}$ para serem testadas nesse estudo. Água destilada (controle) foi utilizada como grupo controle negativo e hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) como um grupo controle positivo. Dessa forma, 5 agentes de tratamento foram avaliados (controle, NaOCl, AcHE10, AcHE50 e AcHE100).

2.2 CITOTOXICIDADE

Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO 10993) [38], o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o método de escolha para avaliação de toxicidade.

Fibroblastos murinos de linhagem comercial NIH 3T3 (*American Type Culture Collection* - ATCC CRL-1658TM - Rockville, MD, EUA) e queratinócitos humanos HaCaT (*Cell Lines Service* - CLS 300493, Alemanha) foram mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂ em atmosfera úmida, e cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB; *Atlanta biologicals*®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 ng/mL Fungizone (anfotericina B; Gibco®). O procedimento adotado foi desenvolvido com base na literatura [31]. O teste consistiu na inoculação das células (4x10⁴ células/mL) em placa de 96 compartimentos (K12-096, KASVI, China).

Após 24h de incubação (37°C, 5% de CO₂), todo o meio dos poços contendo as células foi aspirado para adição de novo meio DMEM 5% SFB contendo as soluções testadas neste estudo (AcHE10, AcHE50 e AcHE100), PBS e NaOCl. As placas foram novamente incubadas por 48h (37°C, 5% de CO₂).

Ao final de 48h, todo meio foi aspirado e substituído por novo meio de cultura contendo DMEM/SFB acrescido de MTT [bromídeo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio 0,5%]. As placas foram incubadas por 4h (37°C, 5% de CO₂). Depois desse período, o meio foi solubilizado por DMSO a 100% (100 µL/poço) e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 570 nm. A partir dos valores de absorbância obtidos, foram calculadas as porcentagens de viabilidade

celular. O cálculo considerou: % Viabilidade = $TA / T1 \times 100$ (onde: TA = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra; T1 = absorbância da suspensão celular sem tratamento).

2.3 EFEITO DO EXTRATO DE *A. CHICA* NAS PROPRIEDADES FÍSICO/MECÂNICAS DA RESINA ACRÍLICA (PMMA)

2.3.1 RUGOSIDADE SUPERFICIAL

Vinte e cinco discos (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram confeccionados em resina acrílica rosa (PMMA) (JET, Clássico, São Paulo, SP, Brasil). Uma matriz metálica com as respectivas dimensões foi utilizada para padronização dos espécimes. A proporção de pó e líquido, bem como a manipulação da resina acrílica, prensagem e imersão em água fervente seguiu as instruções do fabricante (imersão em água a 73°C por 90 min e fervura por 30 min). Os espécimes então foram imersos em água destilada a 37°C por 48h de modo a permitir a lixiviação de monômeros residuais [5].

Os espécimes receberam polimento com lixas sequenciais acopladas na politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil) sob irrigação (#400, #600, #1000, #1500, #2000, disco de feltro) por 60 s cada lixa [39], padronizando-se valor inicial de $Ra = 0,13 \pm 0,03 \mu m$.

Cada disco teve então uma das faces marcada com uma ranhura ao longo eixo do disco, permitindo identificação para que as leituras de rugosidade fossem sempre realizadas nesta face.

Em seguida, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente entre os 5 grupos de agentes de tratamento (controle, NaOCl, AcHE10, AcHE50 e AcHE100) (n=5). Os mesmos espécimes foram armazenados nos agentes de tratamento (100 mL) nos tempos de armazenamento (imediate, 14 dias e 28 dias) a 37°C. A cada respectivo tempo, os espécimes foram avaliados e depois disso eram novamente armazenados seguindo os próximos períodos. As soluções eram trocadas ao final de cada período de armazenamento [40].

A análise de rugosidade foi realizada com um rugosímetro (Surftest SJ-201P, Mitutoyo, Japão). Para cada amostra, três leituras foram realizadas a uma velocidade de 5 mm/s. A rugosidade de cada disco foi calculada usando a média aritmética das três medições (Ra) em micrômetros (μm) [40].

2.3.2 ALTERAÇÃO DE COR

Os mesmos espécimes, em cada respectivo tempo, na face oposta à destinada para avaliação de rugosidade, foram avaliados quanto à alteração de cor. A análise da alteração de cor foi realizada por meio do método colorimétrico quantitativo pelo sistema CIEL $*a*b*$, seguindo protocolo pré-estabelecido [41].

Os discos foram posicionados em um molde confeccionado em silicone com uma abertura destinada a permitir o contato das amostras a um espectrofotômetro portátil *Easyshade* (Vita, Wilcos,

Alemanha). Este molde foi utilizado para reposicionar com precisão os discos e medir as cores da superfície de cada um [40].

A alteração de cor (ΔE) foi calculada usando a seguinte equação:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Onde ΔE^* é variação de cor, ΔL^* é variação de luminosidade, Δa^* é variação de vermelho/verde e Δb^* é variação de amarelo/azul.

2.3.3 RESISTÊNCIA FLEXURAL

Setenta e cinco espécimes retangulares (65 x 10 x 3 mm) foram confeccionados com o auxílio de uma matriz metálica. Os espécimes foram confeccionados com mesma resina acrílica (PMMA) seguindo as mesmas etapas de confecção de acordo com o fabricante (descritos anteriormente). Os espécimes foram aleatorizados entre as 15 condições experimentais previamente descritas (n=5) [40].

A resistência flexural foi realizada utilizando o teste de três pontos em uma máquina de ensaios universais (DL 2000, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil). O teste foi aplicado a uma distância de 50 mm entre os dois pontos de suporte, no centro do espécime com uma célula de carga de 50 kgf. Os valores obtidos foram submetidos à seguinte fórmula de resistência flexural:

$$S = 3PL / 2bd^2$$

Onde S é resistência flexural, P é carga máxima aplicada, L é comprimento da distância entre os dois pontos, b é largura do espécime e d é espessura do espécime [42].

2.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados de citotoxicidade e resistência flexural foram analisados com o *software* do programa estatístico SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Rugosidade e alteração de cor foram analisados pelo programa Statistica versão 10 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Todos os grupos de medidas passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados de citotoxicidade foram analisados por ANOVA-1 fator e pos hoc de Tukey. Para comparação entre os tempos e entre os grupos nos testes de rugosidade superficial e alteração de cor, foi utilizado ANOVA-2 fatores com medidas repetidas no tempo. Os dados obtidos da resistência flexural foram submetidos à ANOVA-2 fatores. Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram descritos em tabelas e gráficos por média e desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE

A ANOVA 1-fator detectou que houve diferença significativa (Fig 1) entre os grupos testados ($p < 0,0001$). Considerando fibroblastos, maior viabilidade celular foi detectada para os grupos PBS (PBS=100±6,29) e AcHE10 (AcHE10=99,43±3,71), os quais

foram estatisticamente similares entre si ($p>0,05$) e considerados não-citotóxicos. Os grupos AcHE50 e AcHE100 foram semelhantes estatisticamente ($p>0,05$) e apresentaram-se entre moderadamente e severamente tóxicos (AcHE50= $52,57\pm 3,27$ e AcHE100= $50,57\pm 2,45$) ($p<0,05$). Já o grupo NaOCl foi severamente tóxico ($p<0,0001$) [38].

Em relação à viabilidade celular de queratinócitos, também houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos experimentais ($p<0,0001$). O grupo AcHE10 não foi tóxico (AcHE10= $106,93\pm 3,53$) ($p<0,0001$), com valores comparados ao grupo PBS (PBS= $100\pm 3,41$) ($p>0,05$). Os grupos AcHE50 e AcHE100 mostraram resultados semelhantes estatisticamente ($p>0,05$), e foram considerados severamente tóxicos (AcHE50= $48,51\pm 1,02$ e AcHE100= $42,18\pm 0,26$) ($p<0,0001$). O grupo NaOCl apresentou-se severamente tóxico [38].

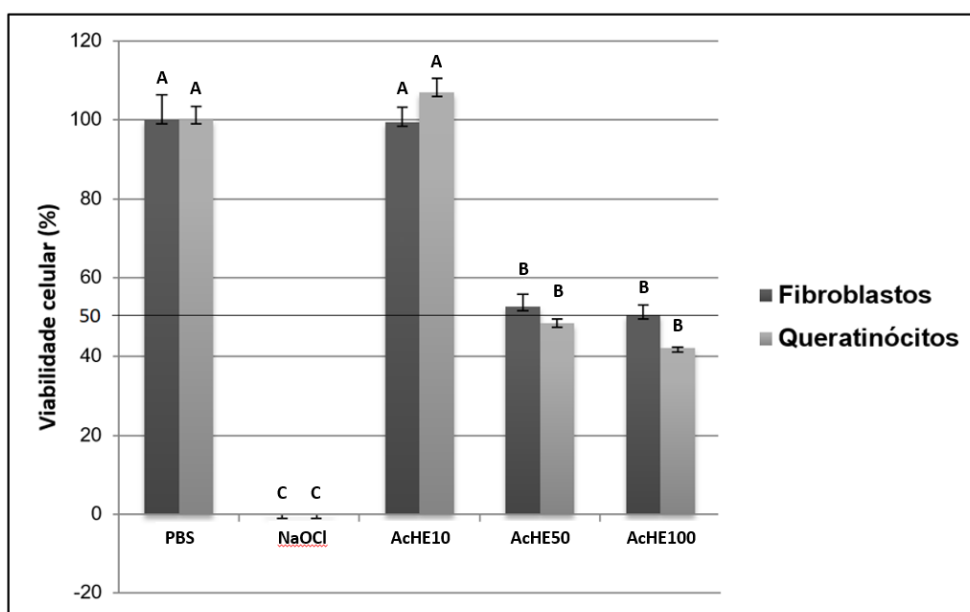


Fig 1 Análise de 48h da citotoxicidade por viabilidade celular (%) pelo método MTT para fibroblastos e queratinócitos

3.2 ANÁLISE DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento ($p>0,05$) independente do tempo avaliado (Tabela 1).

Tabela 1 Média e desvio-padrão obtidos das análises da rugosidade (μm) dos 5 grupos nos tempos avaliados

Grupo	Imediato	14 dias	28 dias
<i>Controle</i>	0,12±0,03	0,13±0,02	0,10±0,02
<i>NaOCl</i>	0,16±0,04	0,15±0,02	0,10±0,01
<i>AcHE10</i>	0,13±0,02	0,12±0,05	0,10±0,05
<i>AcHE50</i>	0,11±0,04	0,13±0,02	0,13±0,08
<i>AcHE100</i>	0,14±0,05	0,14±0,04	0,12±0,03

ANOVA: entre grupos $p=0,200$; entre tempos $p<0,001^*$; interação $p=0,034^*$

3.3 ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DE COR

Apesar do grupos AcHE10 e AcHE100 apresentarem respectivamente menores e maiores valores de ΔE , essa alteração não foi significativa, visto que, uma diferença de cor $<3,7$ é relatada como clinicamente imperceptível [43]. Todos os grupos de tratamento foram semelhantes estatisticamente ao longo dos 28 dias de tratamento ($p>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 Média e desvio-padrão obtidos das análises da alteração de cor (ΔE) dos 5 grupos nos tempos avaliados

Grupo	14 dias	28 dias
Controle	1,57±0,75	1,41±0,62
NaOCl	1,67±0,67	2,11±1,37
AcHE10	0,80±0,56	1,35±0,50
AcHE50	3,30±1,44	2,35±1,86
AcHE100	3,40±0,73	3,13±1,13

ANOVA: entre grupos $p=0,051$; entre tempos $p=0,684$; interação $p=0,509$.

3.4 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA FLEXURAL

A ANOVA-2 fatores não detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento ($p>0,05$) independente do tempo avaliado (Tabela 3).

Tabela 3 Média e desvio-padrão obtidos das análises da resistência flexural (MPa) para todos os grupos experimentais

Grupo	Imediato	14 dias	28 dias
Controle	60,73±6,83	62,75±7,09	72,83±10,12
NaOCl	67,84±12,62	62,53±19,77	59,77±7,64
AC10	63,04±13,63	59,78±3,58	70,34±11,69
AC50	67,33±4,99	73,46±8,43	69,51±7,10
AC100	65,40±9,10	57,35±10,77	69,07±9,24

ANOVA-2 fatores medidas repetidas.

4. DISCUSSÃO

Diversas espécies de *Candida sp* fazem parte da microbiota normal da mucosa, vivendo como microrganismos comensais [44].

Todavia, quando ocorre desequilíbrio da flora normal ou algum tipo de alteração que comprometa as defesas imunitárias, suas leveduras são capazes de invadir as superfícies das mucosas levando à candidose [44]. A candidose associada à prótese (CAP) é a infecção fúngica mais encontrada em pacientes usuários de próteses totais removíveis [45].

A resina acrílica à base de poli(metilmetacrilato) (PMMA), polímero mais comumente utilizado para a confecção desse tipo de prótese, possui características como energia livre de superfície e rugosidade superficial, as quais facilitam a fixação e a proliferação de fungos [5]. No mercado, existem diversos medicamentos para o combate de infecções por *Candida albicans* (*C. albicans*), no entanto, além de serem potencialmente tóxicos [9], podem causar efeitos deletérios [8], ou ainda, falhar na remoção do biofilme [11]. Devido a esses fatores, novas terapias devem ser produzidas a fim de controlar quimicamente a CAP, sem que as desvantagens dos produtos disponíveis no mercado estejam presentes.

Pesquisas envolvendo compostos com propriedades antifúngicas provenientes de plantas vêm crescendo em diversos campos [50], inclusive na Odontologia. A espécie *Arrabidaea chica* (*A. chica*) apresenta grande potencial antimicrobiano [27-29], demonstrando ação antifúngica contra espécies de *Candida* [27-30]. Além disso, apresenta eficácia quando utilizado na cicatrização de feridas, efeito anti-inflamatório e atividade antioxidante [31-35].

Este estudo foi realizado em resinas acrílicas (PMMA) utilizadas rotineiramente para confecção de próteses totais e parciais removíveis a fim de garantir relevância clínica. As concentrações do extrato investigadas nesse estudo basearam-se em estudos prévios bem como em estudo piloto reproduzido, certificando-se da escolha das concentrações empregadas.

No estudo de Jorge et al. [31], o extrato de *A. chica* verlot foi investigado em diversas concentrações variando de 0,25 a 250 µg/mL em fibroblastos e, além de ter demonstrado ser viável em todas as concentrações, estimulou síntese de colágeno. Nesse mesmo estudo, concentrações mais elevadas (até 100 mg/mL) foram avaliadas *in vivo* em ratos, e em até 100 mg/mL o extrato demonstrou segurança em ser utilizado com potencial cicatrizador. Servat-Medina et al. [37] avaliou o mesmo extrato numa concentração de 0,5 mg/mL (500 µg/mL) e demonstrou viabilidade celular de aproximadamente 100% em 48h.

Além disso, Hofling et al. [28] investigou o extrato de *A. chica* verlot na inibição de diversas espécies de *Candida*. Por meio da análise da Mínima Concentração Inibitória (MIC) até mesmo baixas concentrações (de 1 até 7 µg/mL) o extrato demonstrou atividade antifúngica para todas as espécies, apresentando efeito inibitório contra *Candida albicans* quando utilizado em concentrações mais altas. Assim, após a realização de estudo piloto, concentrações que demonstraram melhores resultados foram selecionadas.

Diversos tempos de exposição ao extrato também foram avaliados. Então, a combinação de concentrações e tempo de exposição investigaram as possíveis alterações físico/mecânicas, citotóxicas causadas por esse extrato.

Neste estudo, com relação à citotoxicidade, o extrato de *A. chica* foi menos citotóxico aos fibroblastos e queratinócitos quando comparado ao grupo NaOCl, solução mais comumente indicada para higiene de próteses totais e parciais removíveis [12, 13]. Entretanto, apenas o grupo AcHE10 foi considerado não-citotóxico. Os grupos AcHE50 e AcHE100 foram considerados severamente citotóxicos, visto que, promoveram viabilidade celular menor que 50% [38]. Nossos resultados foram contrários aos encontrados por Jorge et al. [31], onde este investigou o extrato de *A. chica* verlot em diversas concentrações, variando de 0,25 a 250 µg/mL, em fibroblastos, e o extrato demonstrou ser viável em todas as concentrações, estimulando ainda, a síntese de colágeno. Os diferentes achados sugerem que as diferentes metodologias aplicadas nos estudos podem interferir nos resultados.

Considerando as propriedades físico/mecânicas, estudos de Felipucci et al. [15], Paranhos et al. al. [46], Porta et al. [41], demonstraram que a imersão e algumas soluções químicas pode alterar a rugosidade da superfície, a cor bem como a resistência flexural de resinas PMMA. Essas alterações interferem diretamente na estética e longevidade das próteses dentárias.

Em nosso estudo, não foram encontradas alterações nas propriedades físico/mecânicas testadas em comparação aos grupos controle e NaOCl ao longo dos 28 dias de imersão. Apesar de 28 dias de imersão parecer ser um curto período de tempo quando comparado à vida útil de uma prótese dentária, a exposição constante às soluções é capaz de envelhecer de forma significativa a matriz acrílica, criando uma situação desafiadora para o material testado.

Segundo Paranhos et al. [46], o aumento da rugosidade superficial facilita o acúmulo de biofilme na superfície acrílica. Nosso resultado mostrou-se favorável, ao demonstrar que, mesmo na concentração mais elevada testada, não alterou de forma significativa a rugosidade superficial dos discos.

Considerando a alteração de cor (ΔE), apesar de o extrato de *A. chica* apresentar maiores valores na mais alta concentração testada, ele não foi capaz de impregnar na matriz acrílica não causando diferenças estatisticamente significantes quando comparado aos demais grupos testados, inclusive ao hipoclorito de sódio. Além disso, não foram encontradas diferenças clinicamente perceptíveis, visto que, uma diferença de cor $<3,7$ é relatada como clinicamente imperceptível [43]. Apesar do NaOCl ser uma solução química com propriedade branqueadora [43], no nosso estudo, ele não foi capaz de alterar a coloração da resina acrílica. Heidrich et al. [47], encontraram alteração de cor em todos os grupos de seu estudo

quando espécimes de resina acrílica eram imersos em outros extratos (óleo de rícino, óleo de alecrim, extrato glicólico de própolis), bem como em água destilada e hipoclorito de sódio, porém por maior período de tempo que neste trabalho. Nossos diferentes achados podem se relacionar com o menor tempo de imersão utilizado e o fenômeno de sorção de água que a resina acrílica apresenta quando imersa em água por longos períodos [48].

Com relação à resistência flexural da resina acrílica (PMMA), os resultados sugerem que, mesmo quando imersa em diferentes concentrações, o extrato de *A. chica* não foi capaz de alterar esta propriedade. Este é um aspecto favorável, visto que, uma possível redução da resistência aumenta as chances de fratura da resina PMMA [41, 46], demonstrando uma vantagem no uso deste extrato.

5. CONCLUSÃO

O extrato de *A. chica*, quando utilizado em concentrações a partir de 50 µg/mL, foi citotóxico em fibroblastos e queratinócitos e, independente das concentrações utilizadas, não interferiu nas propriedades físico/mecânicas das resinas PMMA.

REFERÊNCIAS

1. El Bahra S, Ludwig K, Samran A, Freitag-Wolf S, Kern M (2013) Linear and volumetric dimensional changes of injection-molded PMMA denture base resins. *Dent Mater* 29:1091–1097.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.020>
2. Cuijpers VM, Jaroszewicz J, Anil S, Al Farraj Aldosari A, Walboomers XF, Jansen JA (2014) Resolution, sensitivity, and *in vivo* application of high-resolution computed tomography for titanium-coated polymethyl methacrylate (PMMA) dental implants. *Clin Oral Implants Res* 25:359–65.
<https://doi.org/10.1111/clr.12128>
3. Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, Sedaghat F, Vosoghi M (2011) Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol* 49:208–211.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.507605>
4. Pattanaik S, Vikas BVJ, Pattanaik B, Sahu S, Lodam S (2010) Denture stomatitis: a literature review. *J Indian Acad Oral Med Radiol* 22:136–140.
<https://doi.org/10.5005/jp-journals-10011-1032>
5. Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Cury AADB, Garcia RCMR (2006) Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent* 96: 205-11.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2006.07.004>

6. Lee JH, El-Fiqi A, Jo JK, Kim DA, Kim SC, Jun SK, Kim HW, Lee HH (2016) Development of long-term antimicrobial poly(methyl methacrylate) by incorporating mesoporous silica nanocarriers. *Dent Mater* 32:1564-1574.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.001>
7. Budtz-Jorgensen E (1981) Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol* 10:65–80.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1981.tb01251.x>
8. Little JW, Falace DA (1987) Dental management of medically compromised patients. St Louis: CV Mosby CO.
9. Correa RMS, Mota TC, Guimarães AC, Bonfim LT, Burbano RR, Bahia MO (2018) Cytotoxic and genotoxic effects of fluconazole on african green monkey kidney (vero) cell line. *Biomed Res Int* 2018:1-7.
<https://doi.org/10.1155/2018/6271547>
10. Lucena-Ferreira SC, Ricomini-Filho AP, da Silva WJ, Cury JA, Cury AADB (2014) Influence of daily immersion in denture cleanser on multispecies biofilm. *Clin Oral Investig* 18:2179–2185.
<https://doi.org/10.1007/s00784-014-1210-9>
11. Cowen LE, Sanglard D, Calabrese D, Sirjusingh C, Anderson JB, Kohn LM (2000) Evolution of drug resistance in

experimental populations of *Candida albicans*. J Bacteriol 182:1515–1522.

<https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1515-1522.2000>

12. Orsi IA, Junior AG, Villabona CA, Fernandes FH, Ito IY (2011) Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerized acrylic resin. Gerodontology 28:253–257.

<https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2010.00400.x>

13. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T (2005) A 2-year of Candida-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. Gerodontology 22:168–176.

<https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2005.00065.x>

14. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH (1985) Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. J Endod 11:525-528.

[https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(85\)80197-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(85)80197-7)

15. Felipucci DN, Davi LR, Paranhos HF, Bezzon OL, Silva RF, Barbosa Júnior F, Pagnano VO (2011) Effect of different cleansers on the weight and ion release of removable partial denture: an in vitro study. J Appl Oral Sci 19:483–487.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572011000500008>

16. Paranhos HF, Bezzon OL, Davi LR, Felipucci DN, Silva CH, Pagnano VO (2014) Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. Braz Oral Res 28:1–7.

<http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2014.vol28.0017>

17. Barbosa DB, de Souza RF, Pero AC, Marra J, Compagnoni MA (2007) Flexural strength of acrylic resins polymerized by different cycles. *J Appl Oral Sci* 15:424-428.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572007000500010>
18. Paranhos HF, Davi LR, Peracini A, Soares RB, Lovato CH, Souza RF (2009) Comparison of physical and mechanical properties of microwavely polymerized acrylic resin after disinfection in sodium hypochlorite solutions. *Braz Dent J* 20:331-335.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402009000400012>
19. Vieira APC, Senna PM, Da Silva WJ, Del Bel Cury AA (2010) Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida* spp. biofilm recolonization on liner surface. *Braz Oral Res* 24: 342–348.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242010000300014>
20. Nett JE (2014) Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:375–382.
<https://doi.org/10.1586/14787210.2014.885838>
21. Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75:311–335.
<https://doi.org/10.1021/np200906s>
22. Ministério da Saúde (2006) Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html. Acessado em 10 de fevereiro de 2019.

23. Corrêa MP (1931) Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas. Vol. II. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
24. van den Berg ME (1993) Plantas medicinais na Amazônia, 2ª Ed. Belém: CNPq/Programa Trópico Úmido.
25. Devia B, Llabres G, Wouters J, Dupont L, Escribano-Bailon MT, Pascual-Teresa S, Angenot L, Tits M (2002) New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochemical Analyss* 13:114-120.
<https://doi.org/10.1002/pca.632>
26. Lorenzi H, Matos FJA (2008) Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
27. Barbosa WL, Pinto LN, Quignard E, Vieira JM, Silva JO, Albuquerque S (2008) *Arrabidaea chica* (HBK) verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Braz J Pharmacog* 18:544-548.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400008>
28. Hofling JF, Anibal PC, Obando-Pereda GA, Peixoto IAT, Furletti VF, Foglio MA, Gonçalves RB (2010) Antimicrobial potential of some plant extract again *Candida* species. *Braz J Biol* 70:1065-1068.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010000500022>

29. Mafioleti L, Silva Junior IF, Colodel EM, Flach A, Martins DTO (2013) Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. J Ethnopharmacol 150:576-582.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.008>
30. Giordani C, Santin R, Cleff MB (2015) Levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida* no período de 2005-2013. Rev Bras Plantas Med 17:175-185.
http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_072
31. Jorge MP, Madjarof C, Ruiz ALTG, Fernandes AT, Rodrigues RAF, Souza IMO, Foglio MA, Carvalho JE (2008) Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* verlot extract. J Ethnopharmacol 118:361-366.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.024>
32. Oliveira DPC, Borrás MRL, Ferreira CLF, López-Lozano JL (2009) Atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. Rev Bras Farmacogn 19:643-649.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400024>
33. Medeiros BJL, Costa KS, Ribeiro JFA, Silva JOC, Barbosa Júnior WLR, Carvalho JCT (2011) Liver protective activity of a hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. and Bonpl.) B. Verl. (pariri). Pharmacognosy Res 3:79-84.
<https://doi.org/10.4103/0974-8490.81954>

34. Aro AA, Simões GF, Esquisatto MAM, Foglio MA, Carvalho JE, Oliveira ALR, Gomes L, Pimentel ER (2012) *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury* 44:884-892.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.08.055>
35. Santos VC, Garcia AL, Richter MF, Guecheva TN, Henriques JA, Ferraz AB, Picada JN (2013) Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoneaceae), an Amazon plant with medicinal properties. *J Toxicol Environ Health A* 76:381-390.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2012.761947>
36. Berla SMC (2008) Atividade inibitória *in vitro* de extratos de *Arrabidaea chica* (verlot.) sobre *Candida albicans*. Dissertação, Universidade de Taubaté.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00038-3)
37. Servat-Medina L, González-Gómez A, Reyes-Ortega F, Sousa IMO, Queiroz NCA, Zago PMW, Jorge MP, Monteiro KM, de Carvalho JE, Román JS, Foglio MA (2015) Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *Int J Nanomedicine* 10:3897-3909.
<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S83705>

38. ISO – 10993-5, International Standard Organization (2009)
Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 3rd ed. Geneva: International Standard Organization.
39. Wieckiewicz M, Opitz V, Richter G, Boening KW (2014)
Physical properties of polyamide-12 versus PMMA denture base material. *Biomed Res Int* 2014:1-8.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/150298>
40. Madeira PLB, Carvalho LT, Paschoal MAB, de Sousa EM, Moffa EB, da Silva MAS, Tavares RJR, Gonçalves LM (2016)
In vitro effects of lemongrass extract on *Candida albicans* biofilms, human cells viability, and denture surface. *Front Cell Infect Microbiol* 6:1-9.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00071>
41. Porta SRS, de Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Cury AADB (2015) Evaluation of sodium hypochlorite as a denture cleanser: a clinical study. *Gerodontology* 32:260-266.
<https://doi.org/10.1111/ger.12104>
42. ISO – 1567, International Standard Organization (1999)
Dentistry – Denture base polymers. 3rd ed. Geneva: International Standard Organization.
43. Moon A, Powers JM, Kiat-Amnuay S (2014). Color stability of denture teeth and acrylic base resin subjected daily to various consumer cleansers. *J Esth and Rest Dentistry* 26:247-255.
<https://doi.org/10.1111/jerd.12109>.

44. Arendorf TM, Walker DM (1987) Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil* 14:217-227.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1987.tb00713.x>
45. Al-Dwairi ZN, Al-Quran FA, Al-Omari OY (2012) The effect of antifungal agents on surface properties of poly(methylmethacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res* 56:272-280.
<https://doi.org/10.1016/j.jpor.2012.02.006>
46. Paranhos HF, Peracini A, Pisani MX, Oliveira VC, Souza RF, Silva-Lovato CH (2013) Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. *Braz Dent J* 24:152–156.
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201302151>
47. Heidrich D, Fortes CBB, Mallmann AT, Vargas CM, Arndt PB, Scroferneker ML (2018) Rosemary, castor oils, and propolis extract: activity against *Candida albicans* and alterations on properties of dental acrylic resins. *J Prosthodont* 00:1–6.
<https://doi.org/10.1111/jopr.12746>
48. Fernandes FSF, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Ricomini Filho AP, Straioto FG, Cury AADB (2011) Efficacy of denture cleansers on *Candida spp.* biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *J Prosthet Dent* 105:51-58.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(10\)60192-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(10)60192-8)

ANEXOS

ANEXO 1 – METODOLOGIA DETALHADA

1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DO EXTRATO DE *A. CHICA*

Folhas de *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) Verlot foram obtidas no Centro de Pesquisas Pluridisciplinar Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas, Brasil (banco de germoplasma do acesso 06; exsicata 1865; Aprovação nº 010150 / 2012- 9 para Acesso e Remessa do Patrimônio Genético para fins de pesquisa científica – CGen/MMA, CNPq) .



Fig 2 Folhas de *Arrabidaea chica*

O extrato padronizado hidroalcoólico de *A. chica* foi obtido pelo método descrito por Jorge et al. [31] com modificações [37]. Um quilo de folhas secas e moídas foi extraído usando 5L de mistura acidificada (0,3% de ácido cítrico) de solução de hidroalcoólica a 70% durante uma hora e meia, à temperatura ambiente, por maceração, repetindo o procedimento três vezes. Após a filtração, o solvente orgânico foi evaporado usando vácuo e removeu-se a água residual por secagem por pulverização (Mini Spray Dryer B-290, alça B-295;

Büchi®, Suíça) com temperatura de entrada $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e temperatura de saída de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, aspiração de 250 mL/h de N_2 ambiente não filtrado, pressão de injeção de 414 L/h e fluxo de alimentação de 5 mL/min à temperatura ambiente, produzindo o produto final.

A solução mãe foi confeccionada com 5.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato de *A. chica* diluídos em dimetilsulfóxido DMSO (100%). A esterilização do extrato foi realizada quimicamente pelo uso do próprio DMSO.

Após toda caracterização, o extrato hidroalcoólico de *A. chica* foi preparado, de acordo com estudo piloto prévio, nas concentrações 10 (AcHE10), 50 (AcHE50) e 100 (AcHE100) $\mu\text{g}/\text{mL}$ para serem testadas nesse estudo. Água destilada (controle) foi utilizada como grupo controle negativo e hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) como um grupo controle positivo. Dessa forma, 5 agentes de tratamento foram avaliados (controle, NaOCl, AcHE10, AcHE50 e AcHE100).

2. CITOTOXICIDADE

Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO 10993) [38], o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o método de escolha para avaliação de toxicidade.

Fibroblastos murinos de linhagem comercial NIH 3T3 (*American Type Culture Collection* - ATCC CRL-1658TM - Rockville, MD, EUA) e queratinócitos humanos HaCaT (*Cell Lines Service* - CLS 300493, Alemanha) foram mantidos em estufa a 37°C e 5% CO_2 em atmosfera úmida, e cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's*

Medium (DMEM - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB; *Atlanta biologicals*®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 ng/mL Fungizone (anfotericina B; Gibco®). O procedimento adotado foi desenvolvido com base na literatura [31]. O teste consistiu na inoculação das células (4×10^4 células/mL) em placa de 96 compartimentos (K12-096, KASVI, China).

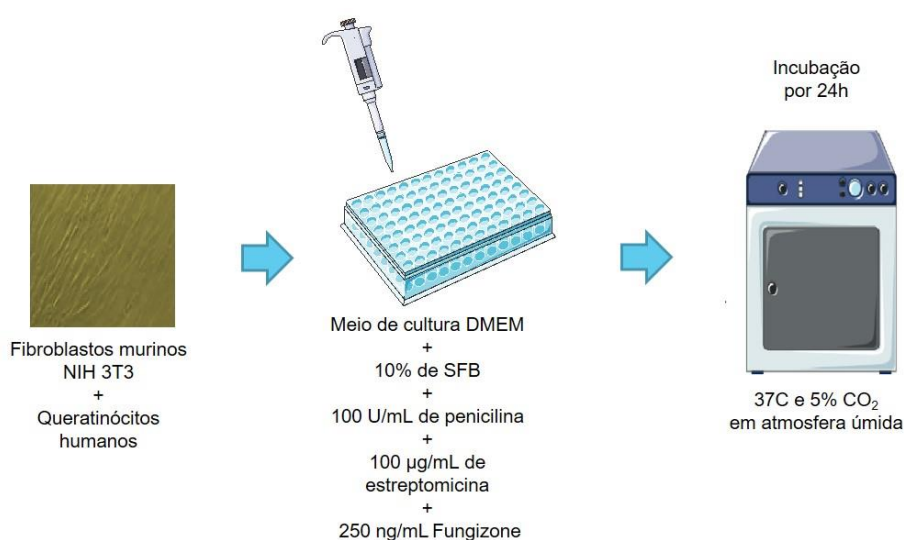


Fig 3 Esquema demonstrativo: Cultura celular

Após 24h de incubação (37°C, 5% de CO₂), todo o meio dos poços contendo as células foi aspirado para adição de novo meio DMEM 5% SFB contendo as soluções testadas neste estudo (AcHE10, AcHE50 e AcHE100), PBS e NaOCl. As placas foram novamente incubadas por 48h (37°C, 5% de CO₂).



Fig 4 Esquema demonstrativo: Tratamento com os agentes testados

Ao final de 48h, todo meio foi aspirado e substituído por novo meio de cultura contendo DMEM/SFB acrescido de MTT [bromídeo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio 0,5%]. As placas foram incubadas por 4h (37°C, 5% de CO₂). Depois desse período, o meio foi solubilizado por DMSO a 100% (100 µL/poço) e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 570 nm. A partir dos valores de absorbância obtidos, foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular. O cálculo considerou: % Viabilidade = $TA / T1 \times 100$ (onde: TA = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra; T1 = absorbância da suspensão celular sem tratamento).

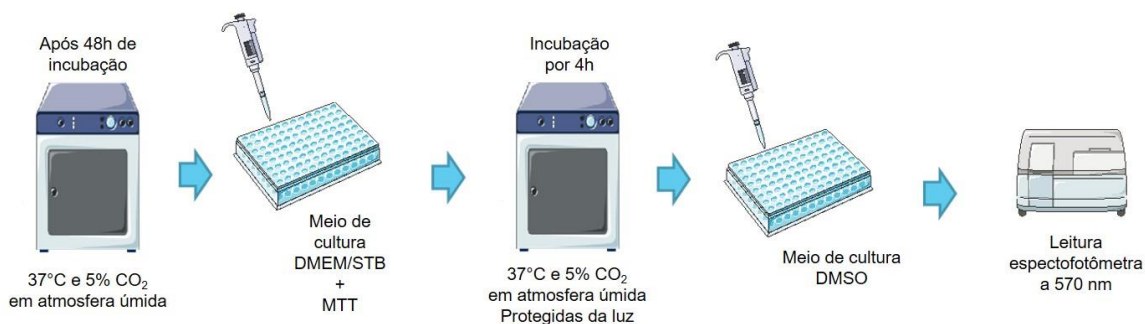


Fig 5 Esquema demonstrativo: Avaliação da viabilidade celular

3. EFEITO DO EXTRATO DE *A. CHICA* NAS PROPRIEDADES FÍSICO/MECÂNICAS DA RESINA ACRÍLICA (PMMA)

3.1 RUGOSIDADE SUPERFICIAL

Vinte e cinco discos (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram confeccionados em resina acrílica rosa (PMMA) (JET, Clássico, São Paulo, SP, Brasil). Uma matriz metálica com as respectivas dimensões foi utilizada para padronização dos espécimes. A proporção de pó e líquido, bem como a manipulação da resina acrílica, prensagem e imersão em água fervente seguiu as instruções do fabricante (imersão em água a 73°C por 90 min e fervura por 30 min). Os espécimes então foram imersos em água destilada a 37°C por 48h de modo a permitir a lixiviação de monômeros residuais [5].

Os espécimes receberam polimento com lixas sequenciais acopladas na politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil) sob irrigação (#400, #600, #1000, #1500, #2000, disco de feltro) por 60 s cada lixa [39], padronizando-se valor inicial de $R_a = 0,13 \pm 0,03 \mu\text{m}$.

Cada disco teve então uma das faces marcada com uma ranhura ao longo eixo do disco, permitindo identificação para que as leituras de rugosidade fossem sempre realizadas nesta face.

Em seguida, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente entre os 5 grupos de agentes de tratamento (controle, NaOCl, AcHE10, AcHE50 e AcHE100) (n=5). Os mesmos espécimes foram armazenados nos agentes de tratamento (100 mL) nos tempos de armazenamento (imediate, 14 dias e 28 dias) a 37°C. A cada

respectivo tempo, os espécimes foram avaliados e depois disso eram novamente armazenados seguindo os próximos períodos. As soluções eram trocadas ao final de cada período de armazenamento [40].

A análise de rugosidade foi realizada com um rugosímetro (Surftest SJ-201P, Mitutoyo, Japão). Para cada amostra, três leituras foram realizadas a uma velocidade de 5 mm/s. A rugosidade de cada disco foi calculada usando a média aritmética das três medições (Ra) em micrômetros (μm) [40].



Fig 6 Esquema demonstrativo: Avaliação da rugosidade superficial

3.2 ALTERAÇÃO DE COR

Os mesmos espécimes, em cada respectivo tempo, na face oposta à destinada para avaliação de rugosidade, foram avaliados quanto à alteração de cor. A análise da alteração de cor foi realizada por meio do método colorimétrico quantitativo pelo sistema CIEL*a*b*, seguindo protocolo pré–estabelecido [41].

Os discos foram posicionados em um molde confeccionado em silicone com uma abertura destinada a permitir o contato das amostras a um espectrofotômetro portátil *Easyshade* (Vita, Wilcos,

Alemanha). Este molde foi utilizado para reposicionar com precisão os discos e medir as cores da superfície de cada um [40].

A alteração de cor (ΔE) foi calculada usando a seguinte equação:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Onde ΔE^* é variação de cor, ΔL^* é variação de luminosidade, Δa^* é variação de vermelho/verde e Δb^* é variação de amarelo/azul.

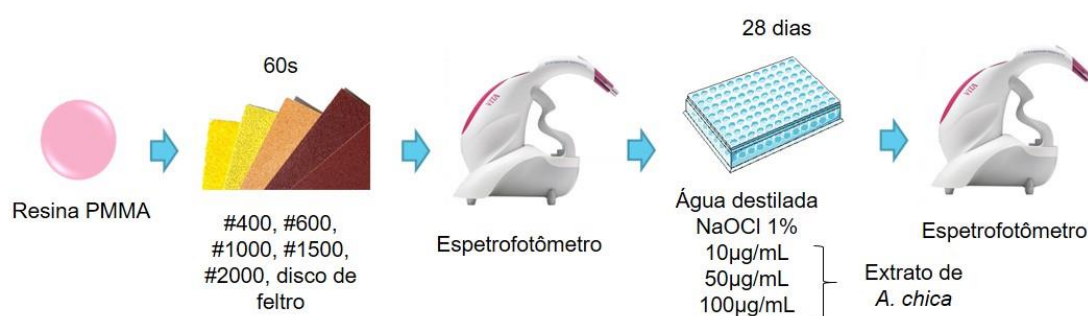


Fig 7 Esquema demonstrativo: Avaliação da alteração de cor

3.3 RESISTÊNCIA FLEXURAL

Setenta e cinco espécimes retangulares (65 x 10 x 3 mm) foram confeccionados com o auxílio de uma matriz metálica. Os espécimes foram confeccionados com mesma resina acrílica (PMMA) seguindo as mesmas etapas de confecção de acordo com o fabricante (descritos anteriormente). Os espécimes foram aleatorizados entre as 15 condições experimentais previamente descritas (n=5) [40].

A resistência flexural foi realizada utilizando o teste de três pontos em uma máquina de ensaios universais (DL 2000, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil). O teste foi aplicado a uma distância de 50 mm entre os dois pontos de suporte, no centro do espécime com

uma célula de carga de 50 kgf. Os valores obtidos foram submetidos à seguinte fórmula de resistência flexural:

$$S = 3PL / 2bd^2$$

Onde S é resistência flexural, P é carga máxima aplicada, L é comprimento da distância entre os dois pontos, b é largura do espécime e d é espessura do espécime [42].

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados de citotoxicidade e resistência flexural foram analisados com o *software* do programa estatístico SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Rugosidade e alteração de cor foram analisados pelo programa Statistica versão 10 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Todos os grupos de medidas passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados de citotoxicidade foram analisados por ANOVA-1 fator e pos hoc de Tukey. Para comparação entre os tempos e entre os grupos nos testes de rugosidade superficial e alteração de cor, foi utilizado ANOVA-2 fatores com medidas repetidas no tempo. Os dados obtidos da resistência flexural foram submetidos à ANOVA-2 fatores. Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram descritos em tabelas e gráficos por média e desvio padrão.

ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA: CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Papers may be submitted for the following sections:

- Original articles
- Invited reviews
- Short communications – with up to 2000 words and up to two figures and/or tables
- Letters to the editor

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

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. <https://doi.org/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*. <https://doi.org/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

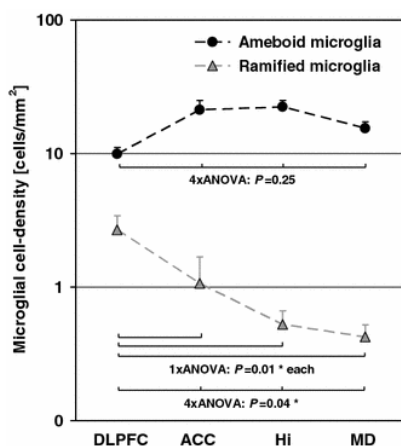
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in 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.

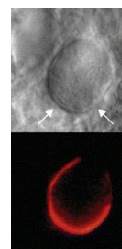
Line Art



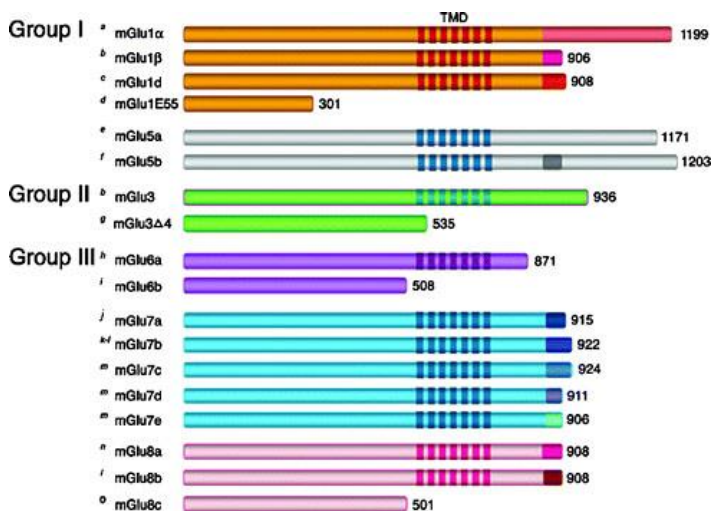
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should 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

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.
- English language tutorial
- Nature Research Editing Service
- American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

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.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- 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. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

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. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- 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.

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.

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.

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.