



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA



**AILA MARIA CIPRIANO LEAL**

**DENTIFRÍCIO EXPERIMENTAL COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO E  
NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA E SEU EFEITO NA  
DESMINERALIZAÇÃO DA DENTINA RADICULAR**

Teresina-PI

2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA



**AILA MARIA CIPRIANO LEAL**

**DENTIFRÍCIO EXPERIMENTAL COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO E  
NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA E SEU EFEITO NA  
DESMINERALIZAÇÃO DA DENTINA RADICULAR**

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

Área de Concentração: Clínica Odontológica  
Linha de Pesquisa: Estudo de Materiais e Técnicas Odontológicas

Orientador: Prof. Dr. Gláuber Campos Vale

Teresina-PI

2019

**DENTIFRÍCIO EXPERIMENTAL COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO E  
NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA E SEU EFEITO NA  
DESMINERALIZAÇÃO DA DENTINA RADICULAR**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

1) Prof. Gláuber Campos Vale

Titulação: Doutor em Odontologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas

Titulação: Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, Universidade de São Paulo – USP.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof. Dr. Patrick Veras Quelemes

Titulação: Doutor em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí – UFPI.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Suplente: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Ferraz Mendes

Titulação: Doutora em Dentística, Universidade de São Paulo – USP.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Teresina – PI

2019

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que estiveram ao meu lado quando achei que não conseguiria concluí-lo, todo o apoio que recebi foi e é fundamental.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por acalmar meu coração em todos os momentos de dificuldades e por todas as bênçãos que concede diariamente em minha vida;

Agradeço aos meus avôs e às minhas avós, pelo exemplo de caráter, honestidade e amor à família que são;

Aos meus pais, pelo amor e abdições em prol do investimento sempre feito em minha educação, às minhas irmãs e cunhados pelo amor e zelo de nossas relações;

Agradeço aos meus tios e tias pelo amor e carinho com que me tratam desde o dia em que nasci. Esse amor se estende aos meus primos e primas, que comemoram minhas vitórias como se fossem suas, muito obrigada por existirem e serem tão presentes em minha vida;

Agradeço às minhas amigas do Colégio Sagrado Coração de Jesus, Amanda, Beatriz, Cinthia, Dandara, Josefa e Monique, pelos anos de amizade e pelo incentivo nos momentos de desafios e de vitórias;

Agradeço aos amigos da Graduação em Odontologia, em especial Ademar, Helly Karinny, Jéssica e Sarah, pois independente da correria de nossas rotinas sei que posso contar com vocês. Aos amigos do Mestrado em Odontologia, em especial à Ana Victória, amiga desde a graduação, com quem eu compartilho sonhos, medos, dúvidas e muitas conquistas;

Ao colega graduando em farmácia, André Cruz e ao doutorando em Ciências dos Materiais, Marcus Vinícius, pelas colaborações;

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pela possibilidade de execução de parte deste trabalho no Laboratório de Bioquímica Oral;

Aos professores Altair Cury, Cíntia Tabchoury, Jaime Cury e Pedro Ricomini pelas considerações e apoio dados a este trabalho;

Ao Seu Alfredo, técnico do Laboratório de Bioquímica Oral da Unicamp, por ter sido gentil e solícito sempre;

Aos colegas da Unicamp, pela boa convivência durante minhas estadias e pela disponibilidade em ajudar;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Marina de Deus Moura de Lima;

Agradeço aos professores de Graduação e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPI, por todos os ensinamentos;

Ao funcionário da Secretaria de Pós-Graduação Plínio José da Paz e Silva, pela responsabilidade e dedicação ao seu ofício;

Aos Professores que compuseram minha banca examinadora, pelo esforço em contribuir no crescimento e evolução desta dissertação;

Ao Prof. André Luís Menezes, pelas contribuições, orientações, amizade e solicitude;

Ao Prof. Edson Cavalcanti da Silva Filho, coorientador deste trabalho;

E, por fim, agradeço à confiança do meu querido orientador Prof. Gláuber Campos Vale, que acreditou na minha competência para execução deste trabalho. Agradeço pelo respeito com que sempre me tratou e por ter me dado a liberdade de sempre expor minhas ideias e opiniões, ainda que eu estivesse equivocada. Trabalhar com alguém tão humano, inteligente e prestativo foi muito bom.

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmF – fluoreto de amina

Ca(OH)<sub>2</sub> – hidróxido de cálcio

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

DF – dentifrício fluoretado

DMEM – meio Dulbecco

DRX – difração por raios X

EGF – fator de crescimento epidérmico

F – fluoreto

FFA – fluorfosfato acidulado

FMMI – fibroblastos gengivais humanos

FST – flúor solúvel total

g – grama

HAP - hidroxiapatita

HD – hipersensibilidade dentinária

KCl – cloreto de potássio

KNO<sub>3</sub> – nitrato de potássio

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MFA – microscópio de força atômica

mL – microlitro

mM - milimolar

mm – milímetro

NaF – fluoreto de sódio

Nano-HA – nanohidroxiapatita

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – fosfato de amônio dibásico

nm – nanômetro

OBA – células epiteliais gengivais imortalizadas

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

QLF – quantitativo de luz fluorescente induzida

rpm – rotações por minuto

SAS – “Statistical Analysis Software”

TISAB – solução tampão para ajuste de força iônica total

UFPI – Universidade Federal do Piauí

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrômetro



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Análise por DRX da nano-HA sintetizada.....	33
Figura 2. Análise da nano-HA em MEV.....	34
Figura 3. Concentração de F ( $\mu\text{g F/g}$ ) encontrada em cada dentifrício em relação à esperada.....	34
Figura 4. Viabilidade celular de OBA-9 após 5 min e 24 h de contato com os dentifrícios testados pelo ensaio de MTT.....	37
Figura 5. Viabilidade celular de FMML após 5 min e 24 h de contato com os dentifrícios testados pelo ensaio de MTT.....	38
Figura 6. Comparação da média da área de lesão para interação entre os fatores concentração de F e presença de nano-HA.....	39
Figura 7. Gráfico da regressão linear da área de lesão em função da concentração de F nos dentifrícios com e sem nano-HA.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do ANOVA dois fatores para as variáveis utilizadas.....	32
Tabela 2. pH e espalhabilidade dos dentifrícios antes e após o ciclo gelo-desgelo.....	36

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	23
4. <i>PRESS RELEASE</i> .....	47
5. PRODUÇÃO INTELECTUAL.....	49
ANEXOS	

## 1. RESUMO

Cárie dentária é a doença bucal mais prevalente no mundo e o uso de dentifrício fluoretado (DF) mostra-se eficaz no controle desta condição. O aumento da concentração de fluoreto (F) é associado à maior eficácia destes dentifrícios e outros compostos podem ter efeito inibidor na formação de lesões cariosas. Entre estes compostos destaca-se nano-hidroxiapatita (nano-HA) e estudos sugerem que este biomaterial pode atuar na desmineralização de esmalte e de dentina. Este estudo *in vitro* foi realizado para avaliar efeito de dentifrício experimental com alta concentração de fluoreto e nano-HA na desmineralização da dentina radicular. Nano-HA foi sintetizada e incorporada aos dentifrícios experimentais formulados. Sessenta espécimes de dentina radicular bovina com dureza inicial pré-determinada foram alocados aleatoriamente em seis grupos que utilizaram diferentes tratamentos: (1) dentifrício placebo; (2) dentifrício com nano-HA e sem F; (3) dentifrício com 1100 µg F/g; (4) dentifrício com 1100 µg F/g + nano-HA; (5) dentifrício com 5000 µg F/g; (6) dentifrício com 5000 µg F/g+ nano-HA. Ciclagem de pH foi realizada durante 10 dias, na qual os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia. Após esse período a dureza longitudinal foi avaliada e a área de lesão ( $\Delta S$ ) foi calculada. Os dentifrícios formulados foram avaliados quanto à estabilidade primária, citotoxicidade e outros parâmetros. Análise estatística foi realizada utilizando Two-way ANOVA e teste de Tukey com p fixado em 5%. Os dentifrícios formulados contendo nano-HA apresentaram maior pH e menor espalhabilidade que os demais. Não houve diferença entre as formulações com relação à citotoxicidade. Na análise da desmineralização da dentina radicular houve diferença estatisticamente significativa entre o placebo e todos os outros grupos de tratamento e os espécimes tratados com formulação contendo 5000 µg F/g, independente da presença da nano-HA apresentaram menor desmineralização. Os achados deste estudo sugerem que dentifrício com 5000 µg F/g + nano-HA promove maior redução da desmineralização, entretanto, não houve diferença significativa entre os dentifrícios com 5000 µg F/g, independente da presença de nano-HA.

**Palavras-chave:** dentina; dentifrício; fluoreto; nano-hidroxiapatita.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Critérios de busca

As bases de dados PubMed, Scielo e Science Direct foram utilizadas para a busca dos artigos. Os artigos publicados entre os anos 2010 e 2019, sem restrição de idioma, foram incluídos na busca. Descritores relacionados ao estudo e operadores booleanos foram utilizados, sendo estes: “*dentifrice*” OR “*toothpaste*” AND “*fluoride*” OR “*nanohydroxyapatite*” OR “*remineralization*”. Busca direta também foi realizada.

### 2.2 Efeito de dentifício com alta concentração de fluoreto

Ensaio clínico duplo cego foi realizado por Baysan *et al.*, em 2001, com o objetivo de comparar efeito de dentifícios com diferentes concentrações de fluoreto. Este estudo foi conduzido durante seis meses e foram utilizados dentifícios com 1100 e 5000 ppm F, na forma de NaF. O efeito destes dentifícios na paralisação de lesões de cárie radicular foi avaliado. Para isso, 201 voluntários foram selecionados. Os voluntários foram instruídos a realizar escovação com o dentifício pelo menos uma vez ao dia. Parâmetros clínicos das lesões existentes foram avaliados no início do estudo, após três e seis meses. Foi possível observar que após três meses houve inativação de lesões cariosas. No grupo que utilizou dentifício com 5000 ppm F, esta inativação foi observada em 38,2% dos voluntários. No grupo que realizou tratamento com dentifício com 1100 ppm F houve paralisação em 10,7% dos participantes. Após os seis meses de estudo, observou-se que 56,9% dos voluntários que utilizaram dentifício com alta concentração tiveram lesões paralisadas e em 28,6% dos participantes do grupo que utilizou dentifício com 1100 ppm F também houve paralisação das lesões. Assim, concluiu-se que há remineralização de lesões cariosas radiculares com uso de dentifícios fluoretados, sendo esta remineralização ou paralisação mais efetiva quando dentifício com alta concentração de fluoreto é utilizado.

Em 2009, Nordström & Birkhed realizaram ensaio clínico randomizado com 26 pacientes. Estes pacientes tinham entre 19 e 53 anos e o objetivo do estudo foi avaliar o efeito de dentifícios com 1450 e 5000 ppm F na forma de NaF. A

escovação com dentifrício de 5000 ppm F foi realizada sem enxágue com água e a escovação com dentifrício de 1450 ppm F foi finalizada por enxágue com água. A quantidade de F retido no biofilme e na saliva foi mensurada. Concluiu-se que escovação utilizando dentifrício com 5000 ppm F e sem enxágue com água promoveu presença de concentrações mais altas de F. Tal concentração foi observada no biofilme proximal e na saliva. O uso de dentifrício com 1450 ppm F com enxágue resultou em menores concentrações de F no biofilme interproximal e na saliva.

Modelo *in situ* foi desenvolvido e 20 voluntários utilizaram bandas ortodônticas para avaliação do efeito de escovação com e sem enxágue. Os grupos utilizaram dentifrícios com 1450 e 5000 ppm F. As bandas ortodônticas foram fixadas em pré-molares com indicação ortodôntica de extração. Após a realização do experimento, os dentes foram extraídos e avaliados pelo método quantitativo de luz fluorescente induzida (QLF) e foi mensurada a quantidade de F retido. Houve menor perda de fluorescência e maior quantidade de F retido no grupo que utilizou como tratamento dentifrício com 5000 ppm F e não realizou enxágue (Al-Mulla *et al.*, 2010).

Nordström & Birkhed, em 2010, realizaram ensaio clínico com duração de dois anos. O objetivo era avaliar a eficácia de dentifrícios com 1450 e 5000 ppm F, na forma de NaF, em adolescentes com atividade de cárie. Duzentos e setenta e nove voluntários participaram do estudo. Os parâmetros avaliados foram incidência e progressão de cárie proximal e oclusal. Após os dois anos de acompanhamento foi possível observar que no grupo que utilizou dentifrício com 5000 ppm F houve menor progressão de lesões cariosas. Além disso, houve menor incidência de cárie nos voluntários deste grupo quando comparados ao grupo que utilizou dentifrício com 1450 ppm F. Os resultados do estudo sugerem que uso de dentifrício com 5000 ppm F é um importante meio de prevenção e tratamento de lesões cariosas em pacientes adolescentes com alto risco à cárie.

Ekstrand *et al.* (2013) realizaram estudo com o objetivo de comparar os efeitos do uso de dentifrício com 1450 ppm F e com 5000 ppm F em residentes de lar para idosos. Os participantes foram selecionados em seis lares na Dinamarca. Os critérios de elegibilidade foram capacidade de escovar os dentes, número de dentes, presença de lesão cariosas e estado de saúde geral. O estudo teve duração de oito

meses e comparou a eficácia de dentifrícios com 1450 e 5000 ppm F. Participaram do estudo 176 idosos cuidados por 6 enfermeiros. Os participantes foram distribuídos aleatoriamente entre grupos que utilizaram dentifrício com diferente concentração. Os voluntários foram instruídos a realizar escovação com dentifrício indicado duas vezes ao dia. Os resultados obtidos indicam que o uso de dentifrício com 5000 ppm F foi mais eficaz no controle e na remineralização das lesões cáries. Houve diferença significativa e dentifrício com 5000 ppm F foi mais eficaz no controle da progressão e na remineralização das lesões.

Fernández *et al.* (2017) realizaram estudo que comparou efeito de dentifrício com 5000 ppm F e aplicação de fluorofosfato acidulado (FFA) combinado com dentifrício 1100 ppm F. O objetivo era avaliar efeito destes na prevenção e remineralização de lesões de cárie em esmalte e dentina. Para isso, foi realizado estudo *in situ* e duplo-cego. Dezoito voluntários passaram por três fases de 14 dias e em cada fase os participantes do estudo usaram dispositivos palatinos. Nestes dispositivos, previamente foram fixados blocos de esmalte e dentina radicular, hígidos ou desmineralizados, com objetivo de avaliar o efeito dos tratamentos realizados na inibição ou na paralisação das lesões cáries. O estudo foi cruzado e todos os voluntários passaram por todos os grupos de tratamento. Os tratamentos foram dentifrício não fluoretado, que funcionou como controle negativo, dentifrício com 5000 ppm F ou única aplicação de FFA + dentifrício 1100 ppm F. Foi realizada avaliação da dureza de superfície e longitudinal para avaliar redução da desmineralização ou remineralização. No biofilme formado sobre os blocos foi mensurada a concentração de F presente. Concluiu-se que a utilização de FFA associado ao dentifrício de 1100 ppm F teve efeito similar na redução da desmineralização e na ativação da remineralização, quando comparado ao dentifrício com 5000 ppm F.

### **2.3 Efeito de dentifrício com nanohidroxiapatita**

Estudo *in vitro* foi realizado por Huang *et al.* (2009) com objetivo de avaliar efeito de diferentes concentrações de nano-hidroxiapatita em lesões de cárie iniciais no esmalte. Sessenta blocos foram obtidos de incisivos bovinos e foram aleatorizados em seis grupos de tratamento. Ciclagem de pH foi realizada durante 12 dias e lesões iniciais foram produzidas. Seis tratamentos foram utilizados:

dentifrício com 1000 ppm F (controle positivo), água (controle negativo) e suspensões com concentrações crescentes de nano-hidroxiapatita, sendo estas 1%, 5%, 10% e 15% em peso. A dureza de superfície foi realizada antes e após 3, 6, 9 e 12 dias de tratamento. Após os 12 dias de ciclagem, a dureza foi novamente mensurada e os blocos foram examinados por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Dentifrício fluoretado com 1000 ppm F teve maior recuperação de dureza quando comparado aos outros cinco grupos. Observou-se recuperação de dureza significativamente maior nos grupos que receberam suspensão líquida com nano-hidroxiapatita como tratamento, quando comparados ao controle negativo. Não houve diferença significativa entre os grupos que utilizaram suspensões com 10 e 15% de nano-hidroxiapatita. As análises no MEV mostraram partículas depositadas na estrutura do esmalte superficial desmineralizado. Concluiu-se que houve remineralização de lesões iniciais do esmalte com o uso de suspensões com nano-hidroxiapatita, no entanto tratamento com dentifrício fluoretado promoveu maior recuperação de dureza.

Di Giácomo *et al.* (2014) realizaram estudo para avaliar formulação produzida com hidroxiapatita e fluoreto de sódio na desmineralização dentinária. Para isso, estudo *in vitro* foi realizado com 84 blocos de dentina radicular bovina. Estes blocos foram aleatorizados em 7 grupos de tratamento: Nanop plus (HAP 20% + 9000 ppm F, NaF, FGM – Dentscare, Joinville, SC, Brasil); pasta Nanop (HAP 20%, FGM – Dentscare, Joinville, SC, Brasil); dentifrício fluoretado (9000 ppm F, NaF, FGM – Dentscare, Joinville, SC, Brasil); pasta placebo (sem composto ativo, FGM – Dentscare, Joinville, SC, Brasil); MI Paste (caseína e fosfato de cálcio, GC América, AlsipIII., EUA); MI Paste plus (caseína e fosfato de cálcio, 900 ppm F, NaF, GC América, AlsipIII., EUA); sem tratamento (controle). Os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia e os blocos foram submetidos à ciclagem de pH durante 7 dias. Após a ciclagem, os blocos foram avaliados com relação à dureza superficial e longitudinal. Nanop plus e dentifrício fluoretado apresentaram resultados significativos na desmineralização da dentina. No modelo proposto, Nanop, sem flúor na composição, não teve eficácia em reduzir desmineralização dentinária.



Em 2014, Vano *et al.* realizaram ensaio clínico randomizado para avaliar a eficácia de dentifrício com nano-HA na redução da hipersensibilidade dentinária. A amostra do estudo foi composta por 105 voluntários divididos em três grupos que empregaram os tratamentos: dentifrício com 15% de nano-hidroxiapatita e 0 ppm F; dentifrício com 1450 ppm F e placebo. Os voluntários foram instruídos a escovar os dentes com o dentifrício fornecido por 2 minutos, duas vezes ao dia. Após 2 e 4 semanas os resultados foram analisados e a sensibilidade dentinária teve maior redução quando dentifrício com nano-HA e livre de F foi utilizado.

Realizou-se estudo *in situ*, duplo-cego e cruzado com 13 voluntários, com idade entre 19 e 28 anos. O objetivo foi avaliar efeito de pasta experimental com hidroxiapatita. Foram realizadas quatro fases de tratamento, com 14 dias de duração cada uma. Blocos de dentina e esmalte foram obtidos de incisivos bovinos. Estes blocos foram fixados em dispositivos palatinos utilizados pelos participantes do estudo. Quatro tratamentos foram utilizados: Nanop plus (HAP a 10% + 0,2% NaF, nano-HA/fluoreto, FGM – Dentscare, Joinville, SC, Brasil); MI Paste plus (fosfato de caseína - fosfato de cálcio, 0,2% NaF, GC América, AlsipIII, EUA); dentifrício com 0,2% NaF (FGM – Dentscare, Joinville, SC, Brasil) e placebo FGM – Dentscare, Joinville, SC, Brasil). Os blocos foram selecionados após mensuração da dureza de superfície. Alguns blocos foram submetidos à desmineralização prévia. Os blocos hígidos foram expostos a desafio cariogênico com sacarose 20% e os blocos previamente desmineralizados não foram submetidos à desafio cariogênico. Solução na proporção de 1/3 (dentifrício/água), denominada *slurry* foi utilizada durante 4 min. Após realização da fase experimental, desmineralização ou remineralização foi avaliada por microrradiografia transversal. Concluiu-se que Nanop Plus foi o único tratamento capaz de reduzir significativamente a desmineralização da dentina e aumentar a remineralização do esmalte quando comparada ao placebo, no entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos empregados (Souza *et al.*, 2015)

Estudo randomizado, duplo cego e paralelo foi realizado para avaliar e comparar a eficácia entre nano-HA e dentifrício de uso convencional no controle da hipersensibilidade dentinária. Foram selecionados 36 pacientes e estes foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Avaliação clínica foi realizada usando três

estímulos diferentes: tátil, jato de ar e jato água fria. As respostas do paciente foram registradas usando escala analógica visual já existente. Os pacientes foram reavaliados após 4 semanas de tratamento. Os pacientes dos dois grupos mostraram reduções nas medidas de sensibilidade, no entanto, os dados sugerem que dentifrício com nano-HA foi mais eficaz (Gopinath *et al.*, 2015).

Ensaio clínico randomizado realizado durante três meses avaliou o efeito dessensibilizador de diferentes formulações com nano-HA. Para o estudo, 28 indivíduos foram selecionados e o tratamento foi empregado em 137 dentes avaliados como sensíveis. Os indivíduos foram submetidos aos seguintes tratamentos: dentifrício com 20% de nano-HA + nitrato de potássio + NaF; dentifrício com 10% de nano-HA + citrato de potássio + NaF; dentifrício com 8% de arginina + carbonato de cálcio + 1450 ppm F; verniz com 22600 ppm F. Os resultados sugerem que todos os dentifrícios tiveram efeito similar sobre a hipersensibilidade dentinária (Wang *et al.*, 2016).

Ajami *et al.* (2016) realizaram estudo prospectivo *in vitro* com objetivo de avaliar efeito de suspensão com nano-hidroxiapatita na rugosidade da superfície do esmalte e na estabilidade da cor do dente após procedimento de descolagem ortodôntica. Para isso, foram utilizadas coroas de 30 pré-molares. Os tratamentos utilizados foram: suspensão com hidroxiapatita e dentifrício com nano-hidroxiapatita, ambos sem fluoreto. Valores primários de rugosidade foram mensurados com microscópio de força atômica (MFA). Após análise da rugosidade primária foi realizado condicionamento ácido e colagem dos bráquetes ortodônticos com resina. Após 24h, os bráquetes foram removidos. Os segundos parâmetros de rugosidade foram mensurados. Foi realizado tratamento durante 10 dias e a rugosidade após tratamento foi mensurada. Parâmetros iniciais de cor também foram avaliados. Os espécimes foram imersos em solução de café e após 1 semana foi realizada a segunda avaliação de cor. A rugosidade foi elevada após o procedimento de descolagem e não houve redução desta após os 10 dias de tratamento com solução ou com dentifrício com HAP. Os dois grupos apresentaram mudança significativa de cor após a imersão na solução de café. Concluiu-se que nenhum dos tratamentos conseguiu restaurar as condições iniciais da superfície do esmalte.

Esteves-Oliveira *et al.* (2017) realizaram estudo para avaliar o efeito de dentifrícios desenvolvidos para prevenção de erosão dentária. Para isso, espécimes foram obtidos a partir de dentes bovinos, que foram previamente desmineralizados para a criação de lesão de cárie artificiais. Para avaliação, perda mineral e profundidade da lesão foram determinadas por meio de microrradiografia. Noventa espécimes foram selecionados e alocados aleatoriamente em cinco grupos (n = 18). Foi realizada ciclagem de pH durante 14 dias e os tratamentos foram escovação duas vezes ao dia com os dentifrícios: (1) dentifrício com 1400 ppm F de AmF; (2) dentifrício com 700 ppm F de AmF e NaF / SnCl<sub>2</sub> / quitosano; (3) dentifrício com 1400 ppm F de NaF / KNO<sub>3</sub>; (4) nano-HA livre de F; (5) dentifrício sem F (controle negativo). Após ciclagem de pH, variações na perda mineral e profundidade da lesão foram calculados. Menor desmineralização foi observada em todos os grupos, exceto no tratamento com dentifrício com nano-HA e livre de F. Concluiu-se que os dentifrícios fluoretados reduziram perda mineral de maneira semelhante. No entanto, no modelo utilizado, dentifrício com nano-HA e sem fluoreto não foi eficaz na inibição da desmineralização da cárie.

Vano *et al.* (2017) realizaram ensaio clínico randomizado duplo-cego para comparar a eficácia na redução da hipersensibilidade dentinária de três formulações, sendo estas: dentifrício com 2% de nano-HA e livre de F; dentifrício fluoretado e placebo. Para isso, 105 voluntários participaram do estudo. Os voluntários foram instruídos a realizarem escovação por 10 min, duas vezes ao dia com dentifrício fornecido. Para avaliar o efeito de cada tratamento, a hipersensibilidade dentinária de cada voluntário foi avaliada no início do estudo, após 2 e 4 semanas. Foram utilizados como parâmetros sensibilidade ao jato de ar e a estímulo tátil. Além disso, avaliação subjetiva com escala analógica visual foi realizada. Concluiu-se que dentifrício com nano-HA e livre de flúor foi agente dessensibilizante eficaz.

Suresh-Anand *et al.* (2019) realizaram ensaio clínico randomizado duplo cego com objetivo de avaliar os efeitos de dentifrício com nano-hidroxiapatita no tratamento da hipersensibilidade dentinária. Sessenta pacientes foram divididos entre dois grupos de tratamento: dentifrício com arginina e dentifrício com nano-hidroxiapatita. O tratamento foi realizado e os pacientes foram avaliados com

relação ao alívio após 5 minutos, 1 e 4 semanas. Com este estudo, concluiu-se que ambos dentifícios foram eficazes como agentes dessensibilizantes.

### **Referências da revisão de literatura**

1. Ajami S, Pakshir HR, Neda Babanouri N. Impact of nanohydroxyapatite on enamel surface roughness and color change after orthodontic debonding. *Progress in Orthodontics* (2016) 17:11. DOI 10.1186/s40510-016-0124-2.
2. Al-Mulla A, Karlsson L, Kharsa S, Kjellberg H, Birkhed D. Combination of high-fluoride toothpaste and no post-brushing water rinsing on enamel demineralization using an in-situ caries model with orthodontic bands. *Acta Odontol Scand*. 2010 Nov;68(6):323-8.
3. Anand S, Rejula F, VG SJ, Christaline R, MG Nair, Dinakaran S. Comparative Evaluation of Effect of Nano-hydroxyapatite and 8% Arginine Containing Toothpastes in Managing Dentin Hypersensitivity: Double Blind Randomized Clinical Trial. *Acta Medica (HradecKrálové)* 2017; 60(3): 114–119. <https://doi.org/10.14712/18059694.2018.3>
4. Baysan A, Lynch E, Ellwood R, Davies R, Peterson L, Borsboom P. Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5.000 and 1.100 ppm fluoride. *Caries Res*. 2001; 35: 41-6.
5. Di Giácomo V, Comar LP, Salomão PMA, Magalhães AC. Efeito de pasta com nanopartículas de hidroxiapatita e fluoreto sobre a desmineralização da dentina. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2014;68(2):112-6.
6. Ekstrand KR, Martignon S, Holm-Pedersen P. Development and evaluation of two root caries controlling programmes for home-based frail people older than 75 years. *Gerodontology*. 2008; 25: 67-75.
7. Ekstrand KR, Poulsen JE, Hede B, Twetman S, Qvist V, Ellwood RP. A randomized clinical trial of the anti-caries efficacy of 5000 compared to 1450 ppm fluoridated toothpaste on root caries lesions in elderly disabled nursing home residents. *Caries Res*. 2013; 47: 391-8.

8. Esteves-Oliveira M, Santos NM, Meyer-Lueckel H, Wierichs JR, Rodrigues JA. Caries preventive effect of anti-erosive and nano-hydroxyapatite containing toothpastes in vitro. *Clin Oral Invest* (2017) 21:291–300. DOI 10.1007/s00784-016-1789-0.
9. Gopinath et al. Evaluation of Dentifrice Containing Nano-hydroxyapatite for Dentinal Hypersensitivity: A Randomized Controlled Trial. *Journal of International Oral Health* 2015; 7 (8): 118 -122.
10. Fernández CE, Tenuta LMA, Cury AADB, Nóbrega DF, Cury JA. Effect of 5,000 ppm Fluoride Dentifrice or 1,100 ppm Fluoride Dentifrice Combined with Acidulated Phosphate Fluoride on Caries Lesion Inhibition and Repair. *Caries Res* 2017;51:179–187. doi: 10.1159/000453624. Epub 2017 Feb 22.
11. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater* 2009;4:034104.
12. Nordström A, Birkhed D. Fluoride Retention in Proximal Plaque and Saliva. Using Two NaF Dentifrices Containing 5,000 and 1,450 ppm F with and without Water Rinsing. *Caries Res.* 2009; 43: 64–9.
13. Nordström A, Birkhed D. Preventive effect of high-fluoride dentifrice (5,000 ppm) in caries-active adolescents: a 2-year clinical trial. *Caries Res.* 2010;44(3):323-31. 44
14. Nordström A, Birkhed D. Effect of a third application of toothpastes (1450 and 5000 ppm F), including a 'massage' method on fluoride retention and pH drop in plaque. *Acta Odontol Scand.* 2012; 1-7.
15. Reis PQR, Calazans FS, Poubel LA, Da Silva EM, Alves WV, Barceleiro MO. Avaliação in vitro do efeito de um dentifício à base de nanohidroxiapatita na rugosidade de superfície do esmalte dental bovino. *Rev. Bras. Odontol.*, Rio de Janeiro, v. 74, n. 2, p. 133-7, abril/jun. 2017. DOI: 10.18363/rbo.v74n2.p.133.
16. Souza BM, Comar LP, Vertuan M, Neto CF, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ. *Caries Res* 2015;49:499–507. DOI: 10.1159/000438466.

17. Vano M, Derchi G, Barone A, Covani U. Effectiveness of nano-hydroxyapatite toothpaste in reducing dentin hypersensitivity: A double-blind randomized controlled trial. Quintessence International General Dentistry 2014; vol 8: 703-711.
  
18. Vano et al. Reducing dentine hypersensitivity with nano-hydroxyapatite toothpaste: a double-blind randomized controlled trial. Clin Oral Invest 2017.
  
19. Wang et al. Treatment of Dentin Hypersensitivity Using Nano-Hydroxyapatite Pastes: A Randomized Three-Month Clinical Trial. Operative Dentistry 2016; 41-3.

### **3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

#### **ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO**

“Clinical Oral Investigations” (ISSN: 1432-6981)

#### **Dentifricio experimental com alta concentração de fluoreto e nanopartículas de hidroxiapatita e seu efeito na desmineralização da dentina radicular**

#### **Experimental dentifrice with high fluoride concentration and nanohydroxyapatite and its effect on root dentine demineralization**

Aila Maria Cipriano Leal<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Beserra dos Santos<sup>2</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>3</sup>, André Luiz Menezes Carvalho<sup>4</sup>, Gláuber Campos Vale<sup>5</sup>

Autores:

1 – Aila Maria Cipriano Leal - Estudante do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí – Teresina (PI) – ailamcl@hotmail.com

2 – Marcus Vinícius Beserra dos Santos – Aluno do Doutorado em Ciências dos Materiais – Teresina (PI) – mvbeserradossantos@gmail.com

3 – Edson Cavalcanti da Silva Filho – Professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia dos Materiais – Teresina (PI) – edsonfilho@ufpi.edu.br

4 – André Luiz Menezes de Carvalho – Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí – Teresina (PI) – aluismenezes@yahoo.com.br

5 – Gláuber Campos Vale – Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí – Teresina (PI) – valeglauber80@gmail.com

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Gláuber Campos Vale

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella – Bloco 5 – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Bairro Ininga / CEP: 64049-550 Teresina - Piauí –Brasil  
Fone: (86) 3237-1517/ e-mail: valeglauber80@gmail.com

## RESUMO

Objetivos: Estudo *in vitro* foi realizado para avaliar efeito de dentifrício experimental com alta concentração de fluoreto e nano-HA na desmineralização da dentina radicular. Materiais e métodos: Após formulação dos dentifrícios, sessenta espécimes de dentina radicular bovina com dureza inicial pré-determinada foram alocados aleatoriamente em seis grupos que utilizaram diferentes tratamentos: (1) dentifrício placebo; (2) dentifrício com nano-HA e sem F; (3) dentifrício com 1100 µg F/g; (4) dentifrício com 1100 µg F/g + nano-HA; (5) dentifrício com 5000 µg F/g; (6) dentifrício com 5000 µg F/g + nano-HA. Ciclagem de pH foi realizada durante 10 dias, na qual os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia, após esse período a dureza longitudinal foi avaliada e a área de lesão ( $\Delta S$ ) foi calculada. Os dentifrícios formulados foram avaliados quanto à estabilidade primária, citotoxicidade e outros parâmetros. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA twoway e teste de Tukey com p fixado em 5%. Resultados: Os dentifrícios formulados mantiveram-se estáveis e não possuem citotoxicidade. Na análise da desmineralização da dentina houve diferença significativa entre o placebo e todos os outros grupos de tratamento ( $p < 0.001$ ). Os dentifrícios contendo 5000 µg F/g, independente da presença de nano-HA, levaram a menor área de lesão em relação aos demais tratamentos ( $p < 0.001$ ). Conclusões: Os achados deste estudo sugerem que nano-HA possui efeito na desmineralização dentinária e dentifrício com 5000 µg F/g + nano-HA promove maior redução da desmineralização. Relevância clínica: Pacientes com risco ao desenvolvimento de cárie radicular podem se beneficiar com o uso de dentifrício fluoretado de alta concentração e nano-HA.

**Palavras-chave:** dentina; dentifrício; fluoreto; nano-hidroxiapatita.

## ABSTRACT

Objectives: In vitro study was carried out to evaluate the effect of experimental dentifrice with high fluoride concentration and nano-HA on root dentin demineralization. Materials and methods: After formulation of dentifrices, sixty specimens of bovine root dentin with pre-determined initial hardness were randomly assigned to six groups using different treatments: (1) placebo dentifrice; (2) dentifrice with nano-HA and without F; (3) dentifrice with 1100 µg F / g; (4) dentifrice with 1100



$\mu\text{g F / g}$  + nano-HA; (5) dentifrice with 5000  $\mu\text{g F / g}$ ; (6) dentifrice with 5000  $\mu\text{g F / g}$  + nano-HA. pH cycling was performed for 10 days, in which treatments were performed twice a day. After that period the longitudinal hardness was evaluated and the area of injury ( $\Delta\text{S}$ ) was calculated. The formulated dentifrices were evaluated for primary stability, cytotoxicity and other parameters. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA and Tukey test with p set at 5%. Results: The experimental dentifrices were stable and had no cytotoxicity. In the analysis of dentin demineralization there was a statistically significant difference between placebo and all other treatment groups ( $p < 0.001$ ). The dentifrices containing 5000  $\mu\text{g F/g}$ , regardless of the presence of nano-HA, led to a smaller lesion area in relation to the other treatments ( $p < 0.001$ ). Conclusions: The findings of this study suggest that nano-HA has an effect on dentin demineralization and dentifrice with 5000  $\mu\text{g F / g}$  + nano-HA promotes a greater reduction of demineralization. Clinical Relevance: Patients at risk for root caries development can benefit with the use of high fluoride dentifrice and nano-HA.

**Keywords:** dentin; dentifrice; fluoride; nanohydroxyapatite.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas foi observada diminuição da prevalência de cárie no Brasil e em outros países, especialmente devido à fluoretação das águas de abastecimento público e ampliação do uso de dentifício fluoretado [1]. Apesar desta diminuição, cárie é a doença bucal mais prevalente no mundo. Alguns estudos mostram associação entre concentração de F e declínio na experiência de cárie [2]. Evidências sugerem que o uso de dentifício com alto teor de fluoreto é mais eficaz que uso de dentifícios com concentrações convencionais especialmente para cárie radicular e pacientes com alto risco à cárie [3; 4].

Além do fluoreto, outros materiais também atuam inibindo a formação de lesões cariosas. Hidroxiapatita (HAP) é um biomaterial à base de fosfato e cálcio, utilizado como biomaterial. Os biomateriais têm aplicabilidade na substituição de partes do corpo e na recuperação de estruturas afetadas por doenças. A HAP é o

principal constituinte da matriz inorgânica dos dentes e dos ossos. Por ser biocompatível, produtos com HAP podem ser utilizados como material odontológico [5].

Estudos têm avaliado o efeito de nanopartículas de hidroxiapatita na desmineralização da superfície dentária [6; 7; 8]. Estas nanopartículas apresentam elevada área superficial e isso faz com que este produto tenha capacidade de atuar na reorganização dos íons cálcio e fosfato, perdidos durante o processo de desmineralização. Estudos mostram resultados positivos do uso de nano-HA como material remineralizante e dessensibilizante na odontologia [6; 9; 10; 11; 12].

Considerando a busca de alternativas mais eficazes para a prevenção e controle da cárie radicular, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito na desmineralização dentária de dentifrício experimental com alta concentração de fluoreto associada à nanopartículas de hidroxiapatita.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Desenvolvimento de dentifrício experimental**

#### **Síntese e caracterização da nano-HA**

##### **- Síntese da nano-HA**

A síntese da nano-HA foi realizada através do método de precipitação, por reação química entre fosfato de amônio dibásico  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e hidróxido de cálcio  $(\text{CaOH}_2)$ . Quantidades de cada reagente foram pesadas em balança analítica de precisão e colocadas separadamente em agitação com água destilada até formação de solução homogênea. Posteriormente, a solução obtida foi centrifugada a 4000 rpm durante 3 min. Após a centrifugação, o pó concentrado no tubo foi acrescida e misturada água destilada. Este processo foi realizado quatro vezes com o objetivo de remover impurezas do pó. A solução foi colocada em placa de Petri e ficava em estufa a 100 °C durante 16h. Após a secagem, o pó obtido foi macerado e armazenado em coletores plásticos.

##### **- Caracterização por Difração de Raios X (DRX)**

A difração de raios (DRX) foi realizada em um LabX-XDR 600, Shimadzu,  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) com  $2\theta$  no intervalo de 5° a 75°, com taxa de varredura de 2 °.min<sup>-1</sup> e tempo de exposição de 40 min. Para calcular o tamanho dos cristalitos foi utilizada a

equação:  $t_c = 0,9 \cdot \lambda / \beta \cos \theta$  onde  $t_c$  é o tamanho do cristalito (nm),  $\lambda$  é o comprimento de onda para a radiação  $\text{CuK}\alpha$ ,  $\beta$  é a largura a meia altura do pico de difração em consideração (rad) e  $\theta$  é o ângulo de difração (grau).

#### **- *Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)***

Para avaliar o tamanho dos cristais produzidos foi realizada análise em MEV. As micrografias foram realizadas com canhão a emissão por campo, marca FEI, modelo Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (Silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001, detector Apollo X-SDD. As amostras foram fixadas em fita adesiva dupla face de carbono, aterradas com tinta adesiva de prata e recobertas com Au na metalizadora, marca Quorum, modelo Q150R, durante 30 seg, a 20 mA, por plasma gerado em atmosfera de argônio.

#### **Formulação de dentifrício experimental**

##### **- *Formulação dos dentifrícios e determinação da quantidade de flúor***

Dentifrícios experimentais foram formulados para a execução do presente estudo. Os dentifrícios tinham como composição básica água, glicerina, sorbitol, sacarina, lauril sulfato de sódio, goma xantana, dióxido de titânio, metilparabeno flavorizante e sílica. Diferentes dentifrícios foram produzidos: dentifrício 1 – não continha nano-HA ou F na composição (placebo), dentifrício 2 – continha 20% de nano-HA na composição, dentifrício 3 – continha 1100  $\mu\text{g}$  F/g, dentifrício 4 – continha 20% de nano-HA + 1100  $\mu\text{g}$  F/g, dentifrício 5 – continha 5000  $\mu\text{g}$  F/g, dentifrício 6 – 5000  $\mu\text{g}$  F/g + nano-HA. Após a formulação dos dentifrícios, estes foram colocados em estabilidade durante 48h, ao abrigo de luz e calor. Foi realizada quantificação de fluoreto nos dentifrícios obtidos para confirmar os valores de 0, 1100 e 5000  $\mu\text{g}$  F/g nas respectivas formulações. Para isso, foi utilizado eletrodo íon-específico para fluoreto (Orion model 96-09, Orion Research, Cambridge, MA, USA) acoplado a um analisador de íons (Orion EA – 740). A curva de calibração foi realizada previamente à análise das amostras, ambos realizados em triplicata. Padrões de flúor de concentração de F conhecidas de 0,5 a 64  $\mu\text{g}$  F/mL foram utilizados. A concentração de F foi calculada por regressão linear da curva de calibração e expressa em  $\mu\text{g}$  F/mL.

## **Caracterização dos dentifrícios**

As formulações foram analisadas de acordo com o guia de estabilidade para produtos cosméticos [13].

### **- Análise macroscópica**

Os dentifrícios formulados foram analisados quanto às características organolépticas. Após 48h, as formulações foram analisadas visando identificar quaisquer indícios de instabilidade, alteração de cor ou separação de fases [14].

### **- Determinação do pH**

O pH foi mensurado de maneira direta, através de peagômetro de bancada digital modelo PHS – 3B, calibrado com as soluções determinadas pelo próprio equipamento. A mensuração do pH foi realizada em triplicata para cada amostra, em temperatura 25,6°C.

### **- Determinação da espalhabilidade**

Placa base de peso conhecido foi colocada sobre 1 g de amostra. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em duas direções opostas, com auxílio da escala de papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Os resultados foram expressos de acordo com a equação abaixo:  $Ei = d^2 \times \pi/4$ . Onde:  $Ei$  = espalhabilidade da amostra para um determinado peso ( $\text{mm}^2$ );  $d$  = diâmetro médio (mm) [15].

### **- Estresse térmico**

Os dentifrícios formulados foram submetidos a aumentos gradativos e significativos de temperatura para verificar possíveis alterações. Ciclos: 30 min em 40 °C, 30 min em 50 °C, 30 min em 60 °C, 30 min em 70 °C, 30 min em 80 °C [15].

### **- Ciclo gelo-desgelo**

Estabilidade preliminar foi realizada de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos [13]. Ciclos de 24h a  $45 \pm 2$  °C e 24h a  $-5 \pm 2$  °C foram realizados. Após os 12 dias do ciclo de gelo e degelo, as amostras foram submetidas novamente à dosagem de pH e determinação da espalhabilidade, com a utilização dos mesmos protocolos. As condições extremas de temperatura visaram acelerar possíveis reações.

### **-Citotoxicidade dos dentifrícios**

Para testar a viabilidade celular após o tratamento com os dentifrícios, foram utilizadas dois tipos celulares: células epiteliais gengivais imortalizadas (OBA-9) e fibroblastos gengivais humanos (FMMI). O OBA-9 foi cultivado em meio isento de soro de queratinócito (K-SFM GIBCO™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) fornecido com fator de crescimento epidérmico recombinante (EGF) humano, PenStrep GIBCO™ (10.000 unidades.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 10.000 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina) e 25 µg.mL<sup>-1</sup> de anfotericina B, a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Os FMMI foram rotineiramente cultivados em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas a 6x 10<sup>5</sup> culas/poço em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas a 37 °C. Em seguida, as células foram expostas a 200 µL dos cremes dentais testados, diluídos a 1: 3 em meio específico para cada célula. Após 5 min e 24 horas, o meio foi removido. A sobrevivência celular foi determinada usando o ensaio MTT. Um volume de 10 µl de solução de MTT foi adicionado a cada poço e as células foram incubadas durante 1 hora. Os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos removendo o meio de cultura e adicionando 100 µL de solvente de sulfóxido de dimetilo a cada poço. As placas foram agitadas à temperatura ambiente durante 10 minutos para dissolver os cristais e foram depois analisadas utilizando um leitor de microplacas. A quantificação da inibição enzimática foi realizada utilizando um espectrofotômetro a 570 nm. Quatro culturas de células replicadas foram expostas a cada um dos dentifrícios testados em dois experimentos independentes [16]. As leituras do valor de absorvância foram normalizadas para culturas de controle não tratadas (100%).

### **Delineamento experimental do ensaio *in vitro***

#### **- Obtenção e seleção dos blocos de dentina**

Blocos de dentina foram obtidos de incisivos bovinos, previamente esterilizados em solução de timol 0,5% [9]. Discos diamantados separados por espaçador de 4 mm foram utilizados para realizar corte na junção amelocementária, com o objetivo de separar coroa e raiz. As raízes obtidas foram seccionadas no sentido méso-distal e os blocos de dentina foram obtidos da superfície mais plana obtida. Em seguida, os blocos foram lixados e polidos, apresentando no final dimensões aproximadas de 4 x

4 x 2 mm [17]. Para calcular dureza inicial, três indentações no centro da superfície dos blocos foram realizadas com ponta Knoop sob carga de 5 kgf por 5 segundos com espaçamento de 100 µm entre elas [18]. A média dos três valores de cada bloco foi e amostras com variações até 15% foram selecionadas. Após seleção, os blocos foram aleatorizados em seis grupos de tratamento. Foi realizada ANOVA *oneway* para avaliar se havia diferença estatisticamente significativa entre a dureza dos blocos alocados em cada grupo.

#### **- *Tratamentos empregados***

Dentifrícios experimentais foram produzidos com concentrações de 0, 1100 e 5000 µg F/g na forma de NaF. Sessenta blocos de dentina foram utilizados. Blocos de dentina foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes tratamentos (n=10): (1) Placebo; (2) dentifrício placebo + nano-HA; (3) dentifrício 1100 µg F/g; (4) dentifrício de 1100µg F/g + nano-HA; (5) dentifrício 5000 µg F/g; (6) dentifrício 5000 µg F/g + nano-HA.

#### **- *Preparo dos blocos dentais para ciclagem de pH***

Os blocos selecionados foram isolados com verniz ácido-resistente. Fita dupla face com tamanho de 2 x 4 mm foi colocada na superfície central de cada bloco e as outras superfícies foram protegidas com o verniz. Após a utilização do verniz, a fita era retirada e deixava área de 8 mm<sup>2</sup> para realização do tratamento.

#### **- *Modelo de ciclagem de pH***

Para este estudo foi utilizado modelo de ciclagem desenvolvido por Queiroz [19], com modificações. A ciclagem de pH utilizada foi composta por 10 ciclos. Os blocos foram mantidos por 6h em solução desmineralizante (1,4 mM de Ca, 0,91 mM de P, 0,06 µg F/mL, tampão acetato 0,05 M pH 5,0) e em 18h em solução remineralizante (1,5 mM de Ca, 0,9 mM de P, KCl 150 mM, 0,05 µg F/mL, tampão Tris 0,1 M, pH 7,0) a cada dia. As concentrações de Fósforo, Cálcio e Fluoreto foram determinadas nas soluções des e remineralizadoras para assegurar a concentração desejada. Ao final da ciclagem realizada, os blocos permaneceram na solução desmineralizante por um período total de 60h. O volume de solução des e remineralizante proporcionalmente utilizada por área do bloco foi de respectivamente 6,25 mL/mm<sup>2</sup> e 3,12 mL/mm<sup>2</sup>. Assim como na pesquisa anteriormente realizada [19], ambas as soluções foram trocadas na metade do período de ciclagem, ou seja, no sexto dia de

ciclagens de cada experimento. Ainda, duas vezes por dia, antes e após a imersão na solução desmineralizante, os blocos dentais foram mantidos por 5 min e sob agitação (60 rpm) em *slurry* com solução de tratamento, produzido com 1 parte de dentifrício para 3 de água. Após o término do período de 10 dias de ciclagens, os blocos de dentina permaneceram por mais 24 horas na solução remineralizante [19].

#### **- Determinação da dureza longitudinal dos blocos dentais**

Após a ciclagem de pH, os blocos de dentina radicular bovina foram colados em placas de acrílico e cortados no sentido longitudinal. Para isso, foi utilizado disco diamantado acoplado à cortadeira elétrica. Após o corte, o hemibloco obtido foi embutido (embutidora Arotec Pre 30) em resina acrílica incolor, para que a dureza da parte interna do bloco fosse avaliada. A superfície seccionada da dentina foi lixada e polida com lixas de granulação 320, 600 e 1200 sob refrigeração com água purificada. Discos de feltro também foram utilizados para polimento final e a dureza longitudinal foi determinada. As indentações foram realizadas no centro do bloco, às distâncias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200  $\mu\text{m}$  da superfície da dentina. Mais duas linhas de impressão foram repetidas 100  $\mu\text{m}$  acima e 100  $\mu\text{m}$  abaixo, todas com carga de 5 g e tempo de 5 s [20]. A área de desmineralização foi calculada. A área da lesão ( $\Delta S$ ) foi calculada pela diferença entre a área sob a curva ( $\text{Kg} / \text{mm}^2 \times \mu\text{m}$ ) do esmalte e a área sob a curva do esmalte desmineralizado.

#### **Análise estatística**

As variáveis resposta foram submetidas à análise estatística utilizando o Software Statistical Analysis System (SAS, Cary, EUA) versão 9.0 para Windows, empregando-se um nível de significância fixado em 5%. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar se houve distribuição normal dos dados, que foram analisados por ANOVA *twoway*, considerando os fatores concentração de F nos dentifrícios (0, 1100 ou 5000  $\mu\text{g F} / \text{g}$ ) e nanohidroxiapatita (presença ou ausência), seguido do teste post-hoc de Tukey. Teste t pareado foi realizado para comparação das variáveis da formulação dos dentifrícios antes e após o ciclo gelo-desgelo. O efeito da concentração de F nos dentifrícios na redução da desmineralização foi avaliado por análise de regressão linear e correlação de Pearson.

## RESULTADOS

A tabela 1 apresenta o sumário da ANOVA dois fatores das variáveis estudadas. Para  $\Delta S$ , pH e espalhabilidade houve significância estatística tanto para os fatores isolados como para a interação entre eles ( $p < 0.001$ ), o mesmo não foi observado para a viabilidade celular ( $p > 0.05$ ).

Tabela 1. Resultados do ANOVA dois fatores para as variáveis utilizadas (valores de p).

Variáveis	Fatores		Interação
	Concetração de F no dentifício	Presença/ausência de nanohidroxiapatita	Concentração de F *Nanohidroxiapatita
$\Delta S$	< 0.001	< 0.001	< 0.001
pH (antes do ciclo gelo-desgelo)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
pH (após o ciclo gelo-desgelo)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Ei (antes do ciclo gelo-desgelo)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Ei (após o ciclo gelo-desgelo)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Viabilidade Celular (OBA-9)	>0.05	>0.05	>0.05
Viabilidade Celular (FMMI)	>0.05	>0.05	>0.05

### Caracterização da nano-HA

#### - *Análise por DRX*



Por meio da análise realizada por DRX, os átomos de um cristal formam padrão de interferência nas ondas presentes em um feixe de Raios X. A análise do padrão obtido confirmou a formação de cristais de nano-HA (Gráfico 1). O material produzido foi analisado antes e após sonicação e a comparação entre o difratograma da HAP sintetizada com arquivo cristalográfico correspondente mostrou que ocorreu síntese da fase desejada, HAP.

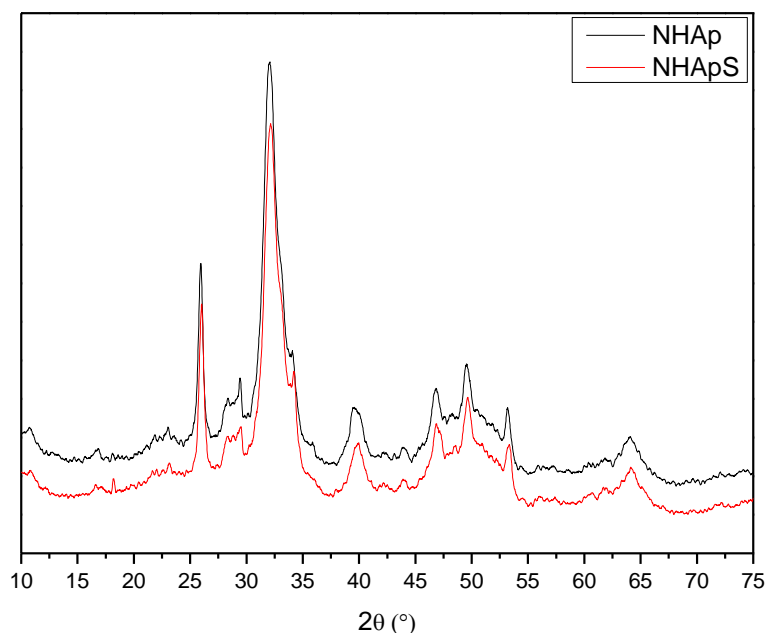


Figura 1. Análise por DRX da nano-HA sintetizada. NHAp: Nano-HA; NHApS: Nano-HA sonicada.

### **- Análise em MEV**

O material sintetizado passou por análise em MEV para que o tamanho médio das partículas fosse quantificado. A análise confirmou a produção de HAP em escala nanométrica (Figura 2).



Figura 2. Imagem obtida na análise após análise da nano-HA em MEV.

### Formulação de dentifrício experimental

#### *Determinação da quantidade de flúor*

A quantidade de flúor foi determinada por eletrodo íon-específico para fluoreto (Figura 3). Foi aceita, para estes dentifrícios, variação em até 15% na quantidade de Flúor Solúvel Total (FST).

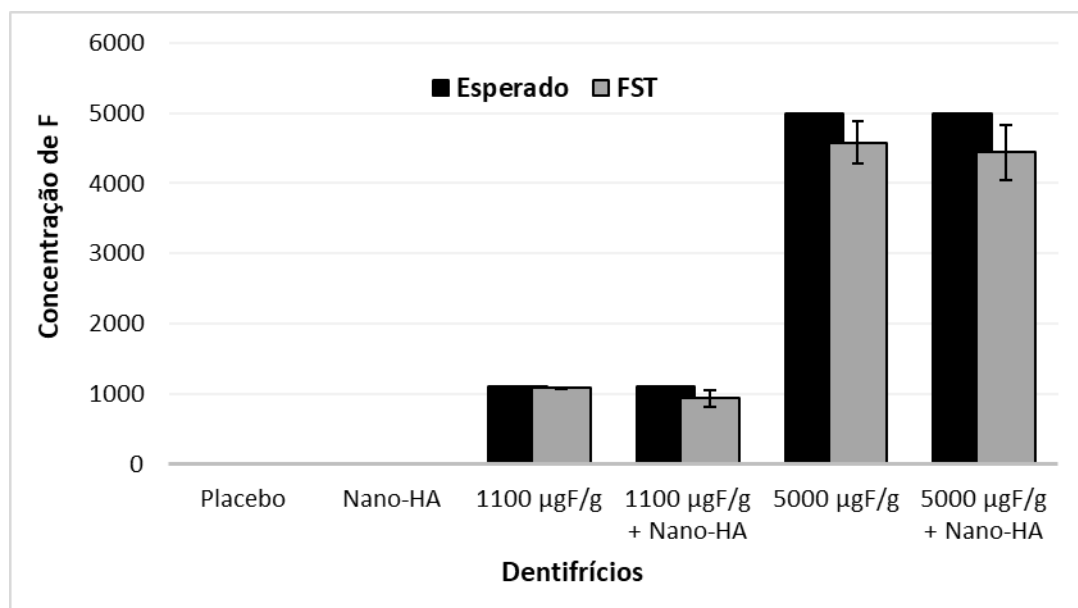


Figura 3. Concentração de F ( $\mu\text{g F/g}$ ) encontrada em cada dentifrício em relação a esperada.

#### **- Ciclo gelo-desgelo**

Este ciclo foi realizado durante 12 dias para avaliar a estabilidade preliminar dos dentifrícios produzidos, que não sofreram alteração macroscópica após o ciclo. Não houve mudança de coloração, segregação, precipitação de compostos ou separação de fase.

#### **- Análise macroscópica**

Não houve alteração macroscópica dos dentifrícios formulados com relação à cor, odor ou sabor após a realização do ciclo gelo-desgelo. Também não houve segregação ou separação de fases.

#### **- Determinação do pH**

De forma geral, os dentifrícios contendo nano-HA apresentaram pH maior (mais básico) do que os dentifrícios sem nano-HA e todos apresentaram diferença estatística ( $p < 0.001$ ). Após o ciclo gelo-desgelo todas as formulações reduziram o valor do pH, exceto o grupo 5000  $\mu\text{g F/g}$  + nano-HA (Tabela 2).

#### **- Determinação da espalhabilidade**

Os resultados de espalhabilidade sugerem a resistência do material ao movimento induzido pelo peso das placas que são sobrepostas. Como pode ser observado na tabela 2, os dentifrícios contendo nano-HA apresentam menor espalhabilidade comparado aos que não contém o biomaterial ( $p < 0.001$ ) e o ciclo gelo-desgelo não alterou a espalhabilidade dos dentifrícios de acordo com teste t pareado ( $p > 0.05$ ).

Tabela 2. pH e espalhabilidade(média ± DP) dos dentifrícios antes e após o ciclo gelo-desgelo.

Variáveis	Condição	Dentifrícios					
		Placebo	Nano-HA	1100 µgF/g	1100 µgF/g + Nano-HA	5000 µgF/g	5000 µgF/g + Nano-HA
pH	Antes do ciclo	6.01 ± 0.04 <sup>A</sup>	8.68 ± 0.03 <sup>B</sup>	7.77 ± 0.06 <sup>C</sup>	8.90 ± 0.05 <sup>D</sup>	7.95 ± 0.02 <sup>E</sup>	9.44 ± 0.06 <sup>F</sup>
	Após o ciclo	5.66 ± 0.07 <sup>A*</sup>	8.35 ± 0.01 <sup>B*</sup>	7.52 ± 0.02 <sup>C*</sup>	8.67 ± 0.07 <sup>D*</sup>	7.73 ± 0.02 <sup>E*</sup>	9.43 ± 0.05 <sup>F</sup>
Ei (mm <sup>2</sup> )	Antes do ciclo	53.94 ± 1.41 <sup>A</sup>	10.52 ± 0.52 <sup>B</sup>	54.09 ± 2.06 <sup>A</sup>	13.65 ± 0.68 <sup>C</sup>	49.76 ± 2.32 <sup>D</sup>	27.43 ± 1.41 <sup>E</sup>
	Após o ciclo	52.02 ± 1.46 <sup>A</sup>	11.88 ± 0.59 <sup>B</sup>	45.24 ± 1.81 <sup>C</sup>	13.33 ± 0.78 <sup>B</sup>	49.62 ± 1.59 <sup>A</sup>	28.65 ± 1.59 <sup>D</sup>

Letras distintas representam diferença estatística entre os grupos (p<0.001). \*Representa diferença em cada grupo antes e após o ciclo gelo-desgelo pelo teste t (p<0.001)

### - Estresse térmico

Após os aumentos de gradativos de temperatura, não houve alteração macroscópica das formulações.

### - Citotoxicidade dos dentifrícios

Nenhum dos dentifrícios apresentou citotoxicidade considerável e não houve diferença estatisticamente significativa entre as formulações analisadas, também não houve diferença significativa entre placebo e demais formulações. A viabilidade de OBA-9 e de FMMI foi menor após 24h de contato com os dentifrícios (Figuras 4 e 5).

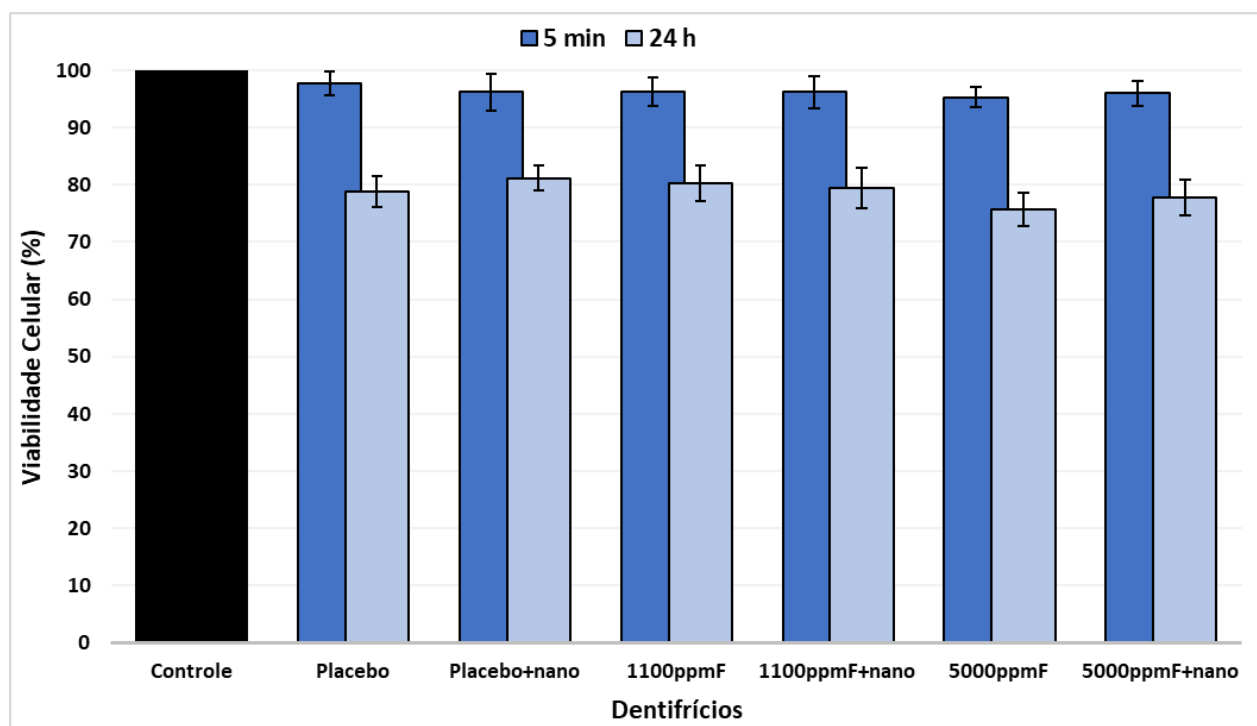


Figura 4. Viabilidade celular de OBA-9 após 5 min e 24 h de contato com os dentifrícios testados pelo ensaio de MTT.

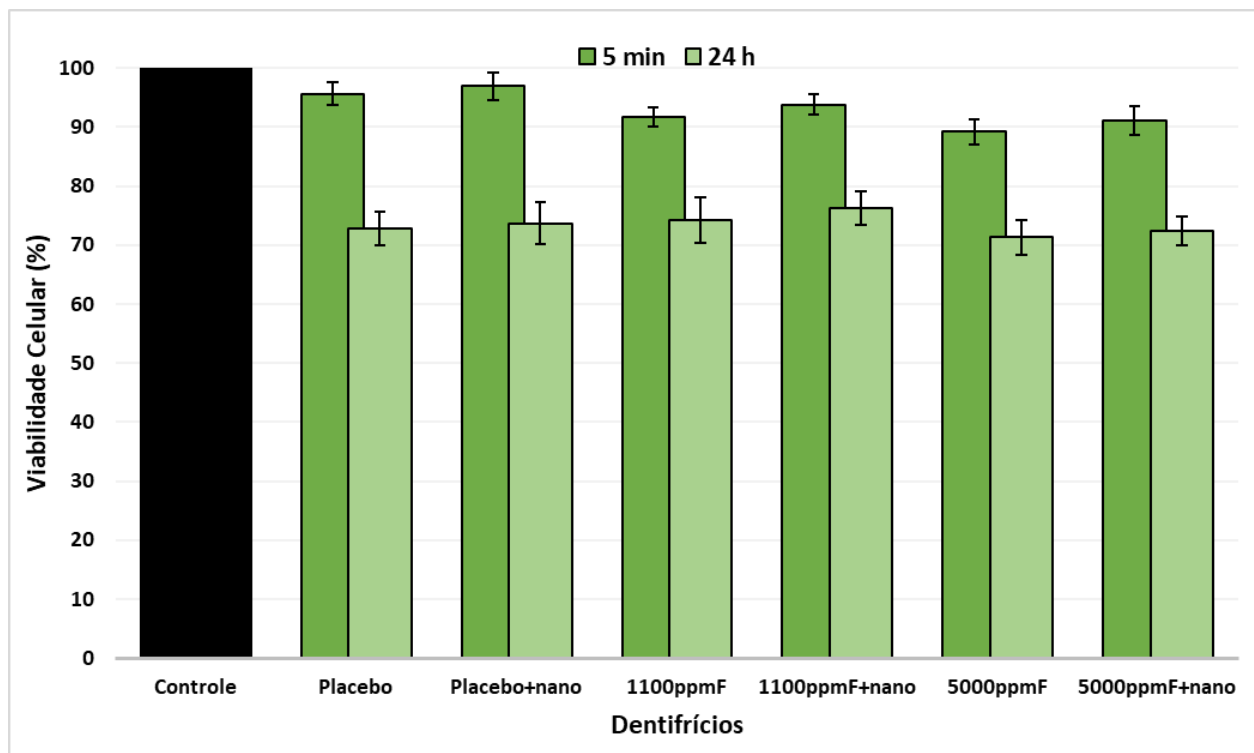


Figura 5. Viabilidade celular de FMML após 5 min e 24 h de contato com os dentifrícios testados pelo ensaio de MTT

## Ciclagem de pH

### - Desmineralização da dentina após ciclagem de pH

No modelo, o grupo placebo apresentou maior área de lesão quando comparado aos demais tratamentos utilizados com diferença significativa ( $p < 0.001$ ). Não houve diferença entre os grupos Nano-HA, 1100 $\mu$ g F/g e 1100 $\mu$ g F/g + nano-HA ( $p > 0.05$ ). Estes apresentaram maior área de lesão do que os grupos com 5000  $\mu$ g F/g, independente da presença de nano-HA ( $p < 0.001$ ), os quais não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0.05$ ). Houve correlação negativa forte entre a concentração de F nos dentifrícios e a área de lesão, independente da presença de nano-HA, mostrando que o aumento da concentração de F leva a diminuição da área da lesão (Figura 7).

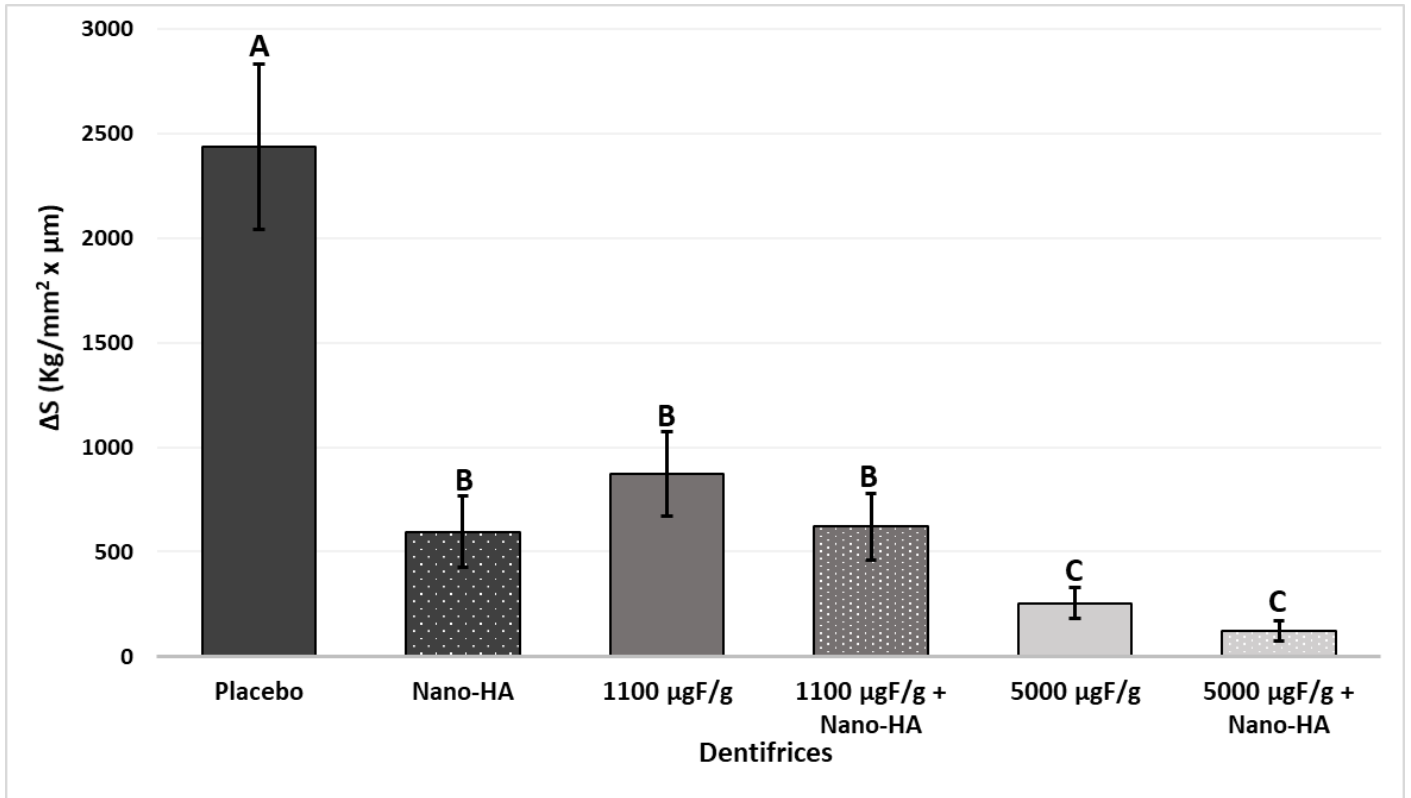


Figura 6. Comparação da média da área da lesão ( $\Delta S$ ) para a interação entre os fatores (concentração de F e presença de nano-HA) pelo teste post-hoc de Tukey. Diferentes letras significam diferença estatística ( $p < 0,001$ ) e barras verticais denotam desvio padrão.

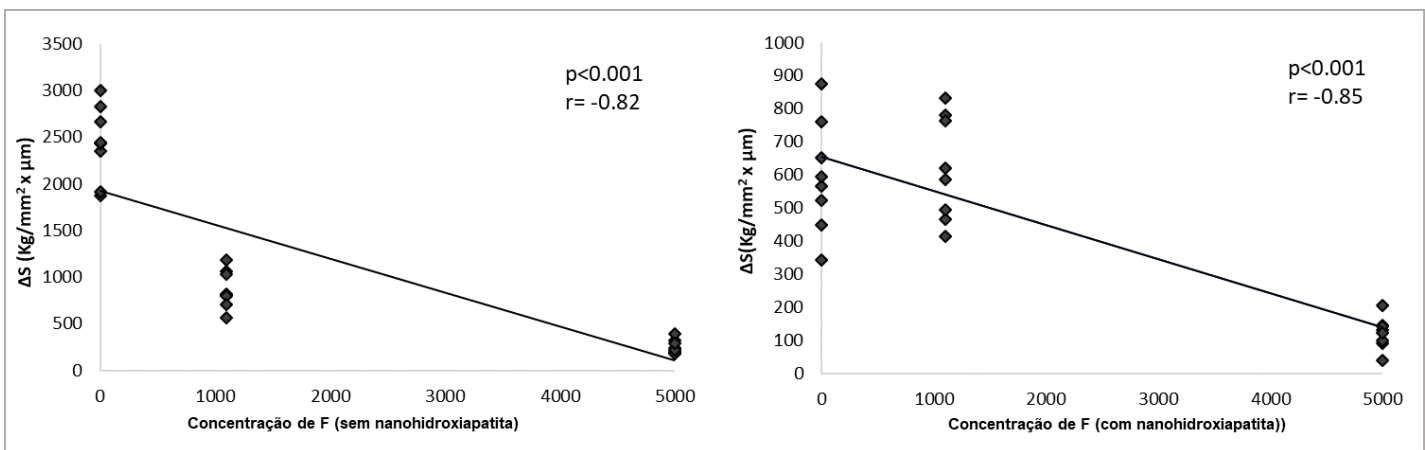


Figura 7. Gráfico da regressão linear da área de lesão em função da concentração de F nos dentifrícios com e sem nano-HA. A significância estatística e o coeficiente de correlação (r) para esta associação estão descritos na figura.

## DISCUSSÃO

Apesar dos avanços em estudos sobre técnicas restauradoras e materiais dentários, terapias eficazes e menos invasivas ainda constituem um desafio na Odontologia. A nanotecnologia é indicada por como via de alternativas eficazes para prevenção e tratamentos menos invasivos [11]. O uso da nanotecnologia é investigado em diversos biomateriais. Biomateriais são utilizados, principalmente, com o objetivo de reparar estruturas e funções biológicas. Entre as características que tais materiais devem possuir, biocompatibilidade e biofuncionalidade são importantes propriedades vistas na hidroxiapatita [5].

A hidroxiapatita é um material à base de fosfato de cálcio, logo, em sua constituição estão presentes os mesmos íons envolvidos no processo de desmineralização e remineralização dentária [5; 6]. Estudos investigam a aplicabilidade de hidroxiapatita em escala nanométrica. A redução do tamanho das partículas de hidroxiapatita promove aumento da superfície de contato destas com a superfície dentária e isso pode promover a reorganização dos íons cálcio e fosfato na forma de HAP sobre o tecido desmineralizado [6]. Além disso, o tamanho das partículas também influencia propriedades intrínsecas deste material, como solubilidade e biocompatibilidade [22, 23].

No presente estudo, foi possível observar a atuação da nano-hidroxiapatita no processo de desmineralização dentinária, mesmo quando fluoreto não estava presente no dentifrício. Os íons constituintes do material são citados como os responsáveis pela remineralização promovida [5; 6]. Após a síntese, DRX confirmou a formação da nano-hidroxiapatita (Figura 1) e a caracterização confirmou a redução das partículas para escala nanométrica (Figura 2), o que pode justificar efeito observado pelo dentifrício em que houve apenas nano-HA, sem a presença de flúor. Este efeito na desmineralização da estrutura radicular foi semelhante ao efeito de dentifrício com 1100 ppm F.



Após a formulação dos dentifrícios foi realizado teste de estabilidade primária por meio do ciclo gelo-desgelo e parâmetros como pH, espalhabilidade e citotoxicidade foram avaliados. Houve alteração no pH e na espalhabilidade. O aumento e a redução de temperatura pode ter alterado propriedades químicas das formulações, o que causou a redução de pH e a mudança da espalhabilidade foi observada devido modificações na área de abrangência do produto e no caso de dentifrício, isso significa dificuldade ou facilidade na aplicação [15].

Devido ao uso de dentifrício experimental foi necessário avaliar a viabilidade celular após contato com a formulação utilizada. Para isso, o ensaio MTT foi realizado e não houve diferença estatística entre as diferentes formulações. As formulações foram colocadas em contato com OBA e FMMI durante 5 min e 24h. O ensaio MTT é um método enzimático confiável, rápido e reproduzível [16]. As formulações foram produzidas com os constituintes comumente presentes em dentifrícios e a ausência de diferença significativa após acréscimo de nano-HA é justificada pela biocompatibilidade desta substância.

O pH dos dentifrícios formulados com nano-HA foi maior (Tabela 2). O processo de solubilização de esmalte e dentina é causado por queda de pH além do valor crítico para solubilização destas estruturas. No ambiente bucal, a saliva (pH = 7,0) funciona como tampão e auxilia na resistência à cárie dental, pois há neutralização dos ácidos. Os dentifrícios com pH mais básico podem ter efeito semelhante, sendo este outro fator associado ao efeito da nano-HA sobre a desmineralização [24; 25].

Na odontologia, a nano-HA atualmente é utilizada para tratamento de hipersensibilidade dentinária [10; 11; 12], remineralização de lesões de cárie [7], reparação e prevenção de lesões iniciais de erosão e formulação de adesivos resinosos [26; 27]. Também são realizados estudos *in vitro* e *in situ* sobre o efeito da nano-HA na formação do biofilme [21], na desmineralização da dentina [8] e na obliteração de túbulos dentinários [28]. A aplicabilidade da nano-HA e os resultados positivos do seu uso podem estar relacionados ao efeito do material no processo de desmineralização e remineralização dentária. O processo de desmineralização ocorre com a solubilização do esmalte e há indícios que os íons cálcio e fosfato

presentes na nano-hidroxiapatita podem repor os íons perdidos e formar uma camada protetora de hidroxiapatita na estrutura dentária [29], o que pode justificar os resultados do presente trabalho, no qual o dentifrício com nano-HA, mesmo quando não havia fluoreto na composição foi capaz de reduzir a desmineralização da dentina. Foi possível observar que não houve somente o efeito do flúor, pois mesmo quando não havia flúor presente na composição, a nano-HA foi capaz de reduzir a desmineralização de forma semelhante ao dentifrício com 1100 ppm F e sem nano-HA em sua constituição.

Além da remineralização de lesões cariosas, nano-HA pode atuar no controle de biofilme, o que justifica resultados similares observados em estudo *in situ* [12; 21]. Evidências demonstram grande similaridade quanto à morfologia e estrutura cristalina das partículas em tamanho nanométrico à apatita dental [29]. A similaridade das partículas e o depósito destas na estrutura que foi desmineralizada pode justificar o efeito promovido pelo dentifrício com nano-HA.

Diversos estudos associam o aumento da concentração de fluoreto à eficácia do dentifrício no processo de desmineralização da superfície dentária. Fluoreto age por meio da incorporação do íon flúor à hidroxiapatita, que resulta na formação de fluorapatita. O pH crítico, que é o pH em que começa a ocorrer dissolução do esmalte é menor para fluorapatita. Sendo assim, este composto é mais resistente à dissolução ácida [29]. A presença constante do íon F promove inibição da desmineralização e ativação da remineralização [6]. No presente estudo, além da diferença significativa, foi possível observar efeito de dose-resposta nos dentifrícios com F, independente da presença de nano-hidroxiapatita, assim, quando a concentração de F no dentifrício foi maior, houve menor a desmineralização da dentina, o que corrobora com estudo que mostra que esse substrato mais sensível é beneficiado com maiores concentrações de F [4].

Os modelos de ciclagem de pH são utilizados para simular a perda e o ganho de minerais que ocorre na cavidade bucal [30]. Este modelo é capaz de mimetizar as condições dinâmicas da cavidade bucal e, por isso, confere dados importantes em modelos *in vitro*. Quando dentina é utilizada como substrato em ciclagem de pH é válido considerar que o processo de difusão é facilitado na

dentina. As lesões em dentina são maiores e mais porosas e por isso a remineralização destas lesões é facilitada [8]. O modelo de ciclagem de pH utilizado no presente trabalho possibilitou observar o efeito sobre a dentina das diferentes formulações de dentifrício empregadas. A diferença estatisticamente significativa observada entre os dentifrícios com 1100 e com 5000 µg F/g também foi encontrada em outros estudos [3; 31].

O ensaio *in vitro* realizado possui limitações, pois trata-se de um ensaio laboratorial. Na literatura, há poucos estudos [6; 26] sobre efeito de dentifrício com flúor associado à nano-HA. Muitos trabalhos comparam dentifrício com nano-HA e sem flúor ao dentifrício fluoretado, sem investigações sobre possível efeito sinérgico da nano-HA e flúor. O delineamento de estudos *in situ* e ensaios clínicos poderá fornecer dados mais consistentes do efeito promovido por dentifrício que associa flúor à nano-HA. A maior redução da desmineralização dentinária em dentifrício com 1100 e com 5000 µg F/g associados à nano-HA observada no presente estudo, evidencia a importância da realização de mais investigações.

## CONCLUSÃO

Os achados deste estudo sugerem que nano-HA reduz a desmineralização da dentina e que os dentifrícios com 5000 µg F/g, independente da presença de nano-HA apresentaram maior redução na desmineralização da dentina radicular.

## REFERÊNCIAS

1. Cury JA, Tenuta LMA, Ribeiro CCC, Paes Leme AF. The Importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004; 15(3): 167-74.
2. Innes N, Evans D. Caries prevention for older people in residential care homes. *Evid Bas Den.* 2009; 10(3):83-7.
3. Nordström A, Birkhed D. Preventive effect of high-fluoride dentifrice (5,000 ppm) in caries-active adolescents: a 2-year clinical trial. *Caries Res.* 2010;44(3):323-31.
4. Fernández CE, Tenuta LMA, Cury AADB, Nóbrega DF, Cury JA. Effect of 5,000 ppm Fluoride Dentifrice or 1,100 ppm Fluoride Dentifrice Combined

- with Acidulated Phosphate Fluoride on Caries Lesion Inhibition and Repair. *Caries Res* 2017;51:179–187. doi: 10.1159/000453624. Epub 2017 Feb 22.
5. Costa ACFM, Lima MG, Lima LHMA, Cordeiro VV, Viana KMS, Souza CV, Lira HL. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 4.3 (2009) 29-38.
  6. Di Giácomo V, Comar LP, Salomão PMA, Magalhães AC. Efeito de pasta com nanopartículas de hidroxiapatita e fluoreto sobre a desmineralização da dentina. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2014;68(2):112-6.
  7. Sadat-Shojai M, Atai M, Nodehi A, Khanlar LN. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dent Mater*. 2010;26(5):471-82.
  8. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010;89:1187-97.
  9. Yu et al. A novel application of nanohydroxyapatite/mesoporous silica biocomposite on treating dentin hypersensitivity: *An in vitro study*. *Journal of Dentistry* 50 2016; 21 – 29.
  10. Wang et al. Treatment of Dentin Hypersensitivity Using Nano-Hydroxyapatite Pastes: A Randomized Three-Month Clinical Trial. *Operative Dentistry* 2016; 41-3.
  11. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater* 2009;4:034104.
  12. Leitune VBC, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SMW. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *J Dent*. 2013;41(4):321-7.
  13. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004. Séries Temáticas: Cosméticos\_ Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, v. I. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: outubro de 2018.
  14. Montagner D & Corrêa GM. Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs. *Rev. Bras. Farm.* v.85 (3): p.69-72, 2004.

15. Cordeiro MSF, Costa JKB, Lima CG, Júnior JDCC, Melo AFM. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*ZingiberoficinalleRoscoe*) Rev. Bras. Farm. 94 (2): 148-153, 2013.
16. Camargo SEA et al. Conventional and whitening toothpastes: Cytotoxicity, genotoxicity and effect on the enamel surface. American Journal of Dentistry, Vol. 27, No. 6, 308-311. December, 2014.
17. Hara AT, Queiroz CS, Paes-Leme AF, Serra MC, Cury JA, Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. Caries Res. 2003; 37: 339-44.
18. Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. Braz Oral Res. 2010 Jun;24(2):135-41.
19. Queiroz CS. Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.
20. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. Caries Res. 2008; 42: 380-6.
21. Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. Nat Nanotechnol. 2010;5(8):565-9.
22. Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. Annu Rev Biomed Eng. 2004; 6:41-75.
23. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. Biomaterials. 2006;27(14):2798-805.
24. Vano M, Derchi G, Barone A, Covani U. Effectiveness of nano-hydroxyapatite toothpaste in reducing dentin hypersensitivity: A double-blind randomized controlled trial. Quintessence International General Dentistry 2014; vol 8: 703-711.

25. Gopinath et al. Evaluation of Dentifrice Containing Nano-hydroxyapatite for Dentinal Hypersensitivity: A Randomized Controlled Trial. *Journal of International Oral Health* 2015; 7 (8): 118 -122.
26. Souza BM, Comar LP, Vertuan M, Neto CF, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ. *Caries Res* 2015;49:499–507. DOI: 10.1159/000438466.
27. Farooq I, Moheet IA, AlShwaimi E. In vitro dentin tubule occlusion and remineralization competence of various toothpastes. *Archives of Oral Biology* 60 2015; 1246 – 1253. Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. *J Am Dent Assoc* 1985 Apr; 110(4):519-25.
28. Vandiver J, Dean D, Patel N, Bonfield W, Ortiz C. Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high-resolution force spectroscopy. *Biomaterials*. 2005;26(3):271-83.
29. Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011;22:97-114.
30. Reis PQR, Calazans FS, Poubel LA, Da Silva EM, Alves WV, Barceleiro MO. Avaliação in vitro do efeito de um dentifício à base de nanohidroxiapatita na rugosidade de superfície do esmalte dental bovino. *Rev. Bras. Odontol.*, Rio de Janeiro, v. 74, n. 2, p. 133-7, abril/jun. 2017. DOI: 10.18363/rbo.v74n2.p.133.
31. Ekstrand KR, Poulsen JE, Hede B, Twetman S, Qvist V, Ellwood RP. A randomized clinical trial of the anti-caries efficacy of 5000 compared to 1450 ppm fluoridated toothpaste on root caries lesions in elderly disabled nursing home residents. *Caries Res*. 2013; 47: 391-8.

#### **4. PRESS RELEASE**

##### **Pesquisa odontológica pode trazer opção terapêutica e preventiva mais completa para o mercado**

Pesquisa verificou a eficácia de creme dental com 5000 ppm de flúor combinado com nano-hidroxiapatita no tratamento e prevenção de problemas odontológicos.

O Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí, em parceria com o Laboratório de Bioquímica Oral da Universidade Estadual de Campinas, Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados e Farmácia Escola da UFPI, atingiu resultados satisfatórios avaliando a eficácia do creme dental com 5000 ppm de flúor associado ao biomaterial nano-hidroxiapatita. Foi realizado trabalho para avaliar o efeito deste creme dental na desmineralização da estrutura radicular dos dentes. Segundo a pesquisadora Aila Cipriano, que realizou as análises, os resultados dos trabalhos foram satisfatórios e trouxeram a possibilidade de uma evolução no mercado e no uso de cremes dentais, especialmente para pacientes com maior risco para desenvolvimento de cárie na região radicular do dente.

O processo de perda de minerais dos dentes está associado aos hábitos de higiene e alimentares do indivíduo e é o primeiro passo para o surgimento de cáries e problemas dentais mais sérios. Aila Cipriano é aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí e a pesquisa foi realizada em seu mestrado sob orientação do Prof. Dr. Gláuber Campos Vale. Ela fala que os resultados observados pelo estudo podem auxiliar na clínica odontológica, promovendo uma maior eficácia na prevenção de problemas bucais, além de disponibilizar um produto mais eficiente e que atenda a diversas demandas.

Dentro de suas análises Aila comparou os efeitos e eficácia de cremes dentais com diferentes concentrações de flúor e com a presença ou não do biomaterial. “O indicado é que um creme dental tenha uma concentração de pelo menos 1000 ppm de flúor. Nós pegamos amostras com essa concentração e amostras com a maior concentração, de 5000 ppm de flúor. Em algumas nós adicionamos a nano-hidroxiapatita”, explica Aila.

"Nós percebemos que essa combinação de uma concentração aumentada de flúor junto desse biomaterial mostrou uma maior eficácia para esses tratamentos. Ao longo dos anos nós percebemos um aumento de reclamações sobre outros problemas além das cáries, como a hipersensibilidade dos dentes, e ter em um só produto elementos que combatam esses vários problemas é algo muito positivo para todos. Existem estudos mostrando a eficácia da nano-hidroxiapatita em diversos tratamentos e até na paralisação de lesões iniciais de cáries", fala a pesquisadora.

No entanto, Aila destaca que por se tratar de um material novo, sua aplicação dentro do mercado pode não significar um barateamento dos tratamentos odontológicos. "Nessa fase inicial das pesquisas pode ser difícil que, ao chegar no mercado, esse produto já venha mais barato. Mas o avanço das pesquisas pode sim fazer com que essa aplicação se torne mais em conta para todos que precisarem. Só de ser um produto que além de tratamento proporciona também a prevenção de problemas, ele já significa uma economia de possíveis custos que a pessoa poderia vir a ter caso seu quadro se agravasse. É algo realmente promissor", relata Aila Cipriano.

Após o final das análises, os projetos da pesquisadora são agora de divulgar os resultados. "Não adianta atingirmos resultados promissores e deixarmos nossos resultados presos no nosso laboratório. Queremos levar o que aprendemos para outros pesquisadores e profissionais da área para que possamos contribuir com avanços dentro dos tratamentos odontológicos ofertados para a comunidade". Aila aponta ainda que existe a possibilidade de continuar com a pesquisa desse produto em seu doutorado.



## 5. PRODUÇÃO INTELECTUAL

### Projetos de pesquisa

1. Desenvolvimento de dentifrício experimental com alta concentração de fluoreto e nanopartículas de hidroxiapatita e seu efeito na desmineralização da dentina radicular – estudo *in vitro*, 2018.

### Prêmios e Títulos

1. Aprovada no Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Materiais Dentários da UNICAMP.

### Artigo completo aceito para publicação em periódico

1. Leal AMC, Vale GC, Silva MA, Roulim FUG. Effect of sweeteners on root dentine demineralization using a microcosm biofilm model. International Journal of Odontostomatology, 2019.

### Resumos publicados em Anais

1. Spinola MS, Soares AL, Leal JP, Almeida LF, Marques LA, Siqueira PM, Leal AMC, Giongo M, Ferreira RS, Ricomini Filho AP, Tenuta LMA, Tabchoury COM, Cury JA. Fluoride Reactivity of Silver Diamine Fluoride Solution With Enamel/Dentine. In: 2017 IADR/AADR/CADR General Session (San Francisco, California), 2017, San Francisco. Journal of Dental Research, 2017;96.
2. Leal AMC, Silva MA, Rolim FUG, Vale GC. Potencial Cariogênico de Adoçantes na dentina radicular em modelo de biofilme microcosmo. 34th SBPqO Annual Meeting, 2017, Campinas. Brazilian Oral Research. 2017.
3. Leal AMC, Vale GC, Simões NMR, Mota BIS, Moura MS. Excreção urinária de flúor após ingestão de dentifrício fluoretado com alta concentração. 35th SBPqO Annual Meeting, 2018, Campinas. Brazilian Oral Research. 2018.
4. Aragão MGB, Leal AMC, Filgo APR, Alvarado AB, Cury AAB, Coelho CSS, Tabchoury CPM, Cury JA, Bandeira AVL. Potential of human Milk to provoke enamel demineralization. Abstracts 65th ORCA Congress, 2018. v. 52. p. 515 - 515.

#### Trabalhos apresentados em eventos científicos

1. Leal AMC, Silva MA, Rolim FUG, Vale GC. Potencial Cariogênico de Adoçantes na dentina radicular em modelo de biofilme microcosmo. 2017.
2. Leal AMC, Vale GC, Ferreira RS. Cárie radicular em idosos: revisão sistematizada da literatura. 2018.
3. Leal AMC, Vale GC, Ferreira RS. Modelos *in situ* para estudo de erosão dental: revisão sistematizada da literatura. 2018.
4. Leal AMC, Carvalho NSR, Barros SSLV. Fibroma traumático: relato de caso. 2018.
5. Leal AMC, Vale GC, Simões NMR, Mota BIS, Moura MS. Excreção urinária de flúor após ingestão de dentifrício fluoretado com alta concentração. 2018.

#### Cursos assistidos

1. Modelos *in situ* em Cariologia. (Carga horária: 60h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil, 2017.
2. Como publicar em periódicos científicos de impacto. (Carga horária: 24h). Centro Universitário Uninovafapi, Brasil, 2018.
3. Lesões mais prevalentes da mucosa oral. (Carga horária: 8h). Faculdade Integral Diferencial – FACID Wyden, Brasil, 2018.
4. Urgências em endodontia. (Carga horária: 8h). Faculdade Integral Diferencial – FACID Wyden, Brasil, 2018.

#### Participação em eventos

1. 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica –SBPqO, 2017.
2. I Jornada Acadêmica de Odontologia da Facid– Devry – JAOF, 2018.
3. 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica –SBPqO, 2018.

#### Participação em bancas e comissões julgadoras

1. Avaliadora de painéis na I Jornada de Integração do Centro de Ciências da Saúde. JICCS, 2018.

**ANEXO 01**  
**NORMATIZAÇÃO TÉCNICA DAS DISSERTAÇÕES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UFPI, APROVADO EM REUNIÃO DO COLEGIADO EM 12/04/2016**

As dissertações deverão ser escritas em fonte Arial ou Times New Roman tamanho 12 com espaçamento 1,5 e margens inferior e superior de 3 cm e direita e esquerda de 2,5 cm, alinhamento justificado e paginação no canto inferior esquerdo a partir do tópico dedicatória e conter os seguintes elementos:

**I - Elementos pré-textuais:**

- a) Primeira folha dando visibilidade à Universidade, ao Programa, ao autor e título da dissertação;
- b) Segunda folha dando visibilidade ao nome do autor, ao título do trabalho, ao nível (mestrado acadêmico), a área de concentração, a linha de pesquisa, ao nome do orientador e coorientador, ao local (cidade) e ao ano;
- c) Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas;
- d) Dedicatória (opcional);
- e) Agradecimentos (opcional);
- f) Lista de ilustrações (opcional);
- g) Lista de tabelas (opcional);
- h) Lista de abreviaturas e siglas (opcional);
- i) Lista de símbolos (opcional);
- j) Sumário.

**II – Elementos textuais**

- a) Resumo em português contendo no máximo 300 palavras;
- b) Introdução;
- c) Revisão de literatura ou artigo de revisão;
- d) Artigo(s);
- e) Press release.

**III – Elementos pós-textuais**

- a) Produção Intelectual

b) Anexos

c) Apêndices

OBS: As referências devem ser formatadas de acordo com as normas de Vancouver, sempre ao final das secções que necessitem das mesmas.

## ANEXO 02

### Normas para submissão do artigo no periódico “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.

#### EDITORIAL PROCEDURE

If you have any questions please contact:

Professor Dr. M. Hannig

University Hospital of Saarland

Department of Parodontology and Conservative Dentistry

Building 73

66421 Homburg/Saar

Germany

Email: [eic.hannig@uks.eu](mailto:eic.hannig@uks.eu)

#### 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.

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 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.  
<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* 341:325–329

## 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 TitleWord Abbreviations, see [ISSN.org](http://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. 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.

## 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. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

## Line Art

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

#### Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

#### Combination Art

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

#### Color Art

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

#### Figure Lettering

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

#### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an

appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs. Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

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

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### Permissions

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

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that. All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware). Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements). Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form. Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

### Submission

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

### Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

### Specialized Formats

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

### Collecting Multiple Files

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

### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

### Captions

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

### Processing of supplementary files

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

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that. The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material. Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

### 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 a more accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflict of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number), honoraria for speaking at symposia, financial support for attending symposia, financial support for educational programs, employment or consultation, support from a project sponsor, position on advisory board or board of directors or other type of management, relationships, multiple affiliations, financial relationships, for example equity ownership or investment interest, intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights), holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work. In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research. The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

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

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript. See below examples of disclosures:

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

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z. If no conflict exists, the authors should state: Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

## RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

### 1) Statement of human rights

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

standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. The following statements should be included in the text before the References section:

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

#### **Ethical approval retrospective studies**

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethical approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

#### 2) Statement on the welfare of animals

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

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

If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted." If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements: "This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors." "This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors." "This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

#### INFORMED CONSENT

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

example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning. The following statement should be included:

**Informed consent:** “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.” If identifying information about participants is available in the article, the following statements should be included:

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

## RESEARCH DATA POLICY

The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature’s list of repositories and research data policy.

### List of Repositories

### Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used. Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

### DataCite

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at [researchdata@springernature.com](mailto:researchdata@springernature.com).

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

### Helpdesk

## 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.

OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication. Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list. Benefits: Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

\*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License. Find more about the license agreement