

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Programa de Pós-Graduação em
Odontologia**



Dissertação

**Incorporação do óleo essencial de *Butia capitata* como
antibacteriano em um adesivo experimental.**

Sonia Luque Peralta

Pelotas, 2011

Dados de Catalogação da Publicação

P426i

Peralta, Sonia Luque

Incorporação do óleo essencial de *Butia capitata* como antibacteriano em um adesivo experimental./ Sonia Luque Peralta ; orientador: Rafael Guerra Lund. -Pelotas: UFPel, 2011. 115f; fig.

Dissertação (Mestrado) Dentística. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

1. Adesivos dentinarios. 2. Antimicrobianos.
3. *Butia capitata*. 4. Biocompatibilidade. 5. Microcosmos. I. Lund, Rafaek Guerra (orient.). II.Título.

D2

Bibliotecário: Fabiano Domingues Malheiro CRB -10/1955

SONIA LUQUE PERALTA

Incorporação do óleo essencial de *Butia capitata* como antibacteriano em um adesivo experimental.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Dentística, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Co-orientador: Prof. Dr. Evandro Piva

Pelotas, 2011

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Orientador)

Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares

Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes (Suplente)

DEDICATORIA

Dedico esta dissertação a Deus, pelos dias vividos, cada lição aprendida e cada prece atendida.

A meus pais, Regina e Felipe, cujo constante incentivo e admiráveis experiências de vida perante aos desafios, jamais permitiriam que eu me entregasse ou me deixasse vencer pelas dificuldades. Eles são os maiores responsáveis pela minha formação humana e profissional.

A meus irmãos Hubert e Herbert pelo apoio e carinho incondicionais, pois sempre me ajudaram a substituir os obstáculos de desânimo pela perseverança e motivação. Por serem mais que meus irmãos, mas sim, meus amigos, confidentes e cúmplices, fazendo-me acreditar que os sonhos podem se tornar realidade.

A minhas avós Ana e Gregoria; a meus tios, Lourdes, Nelly, Mercedes, Walter, Rodolfo, Jaime, Raul, Fredy e Richard, por estarem sempre presentes ao longo da minha vida. Obrigada por suas orações. Eu sei que Deus os ouviu e cuidou-me por vocês.

AGRADECIMENTOS

Minha enorme gratidão ao meu orientador Professor Doutor Rafael Guerra Lund, que acolheu com incomparável abertura esta desconhecida e lhe apresentou o maravilhoso mundo da pesquisa. Obrigada por acreditar em mim, pela paciência, disponibilidade e amizade.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Evandro Piva, pela confiança, dedicação e atenção sem tamanho. Obrigada pela confiança inestimável.

Ao Professor Doutor Flávio Fernando Demarco, obrigada pela oportunidade de fazer parte de uma equipe tão qualificada, além do carinho com que me recebeu no Programa de Pós-graduação.

Ao Professor Rafael Ratto de Moraes, pela amizade, a paciência, e os conhecimentos compartilhados ao longo do desenvolvimento de diversos trabalhos, além das sugestões realizadas na qualificação junto com o Professor Maximiliano Sergio Cenci.

Aos professores da Pós-Graduação, agradeço pelos ensinamentos e por compartilharem seus conhecimentos e transmitirem a arte do ensino, seja ao longo das disciplinas, seja nas ricas horas de estágio docente.

Aos meus queridos amigos Marília B, Silvia, Eliana, Gregory, Renzo e Karla C., agradeço-lhes pela paciência, a parceria, a convivência e pelo ombro amigo que encontrei em vocês.

A Raquel F. e Rodrigo por terem me recebido e brindado todo apoio que precisei na minha chegada à Faculdade e ao longo deste tempo.

Aos meus queridos colegas e amigos da pós-graduação, Adauê, Aline, Ayah, Bianca, Carol, Carolina, Eliana, Eliseu, Fabiana, Francine, Françoise, Genara, Glória, Gregory, Hugo, Laura, Lisia, Luciano, Marcos B, Marcos P, Marcus, Marina, Marília B, Marília G, Silvia, Francine, Gloria, Caroline, Marcos,

Marcus, Renata, Carol, Marina, Marília G, Raquel, Renata, Silvia, Simone, Vanessa e Alessandro. Agradeço a contribuição de cada um de vocês para o meu crescimento profissional e conhecimento científico. Obrigada pela troca de experiências.

Aos alunos de iniciação científica, Pedro, Tatiane, André, e Lucas, por compartilharem comigo momentos de aprendizado e superação. Obrigada por todo o apoio recebido, pelas inúmeras horas compartilhadas nos laboratórios, vocês são muito especiais e inesquecíveis!

Ao Professor Jaime Aparecido Cury, pela hospitalidade, pelo aprendizado de novas metodologias e por todo o apoio oferecido no laboratório de Bioquímica da FOP-UNICAMP.

À secretária do PPGO, Josiane Silva, sempre tão solícita e atenciosa, obrigada!

Aos técnicos, Sr. Airton, Marcelo, Gilberto, Taty, Taiane, e Graça, que auxiliaram na organização e resolução de qualquer necessidade adversa com entusiasmo e eficiência, nos diferentes laboratórios. Obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia/UFPel, representado pelo Coordenador Professor Doutor Flávio Demarco, agradeço a oportunidade de desenvolver minhas habilidades acadêmicas em uma escola tão qualificada e autêntica.

A todo o pessoal que faz parte da Faculdade de Odontologia/UFPel representado pela Diretora Professora Márcia Bueno,.

Ao CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf).

RESUMO

PERALTA, Sonia Luque. Incorporação do óleo essencial de *Butia capitata* como antibacteriano em um adesivo experimental. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano e propriedades físico-mecânicas de um adesivo experimental após incorporação de um óleo essencial proveniente da semente de “butiá” (*Butia capitata*). Foi formulado um sistema adesivo autocondicionante experimental de dois passos composto por um *primer* dentinário e um *bond* (resina de cobertura). O *primer* foi preparado a partir de quantidades fixas de 2-Hidroxietil metacrilato (HEMA), monômero ácido fosforado e solvente. A resina de cobertura (*bond*) foi elaborada a partir da mistura homogênea de Bisfenol-A glicidil dimetacrilato (Bis-GMA), Trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA), HEMA, iniciadores da polimerização como canforoquinona (CQ) e Etil 4-dimetil amino benzoato (EDMAB); e óleo de *Butia capitata* (“butiá”) 1%. Foram testados três adesivos como referência comercial: Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB), Adper SE Plus (AP), e dois adesivos experimentais: Adesivo controle sem óleo (AC) e Adesivo experimental contendo óleo de “butia” (EA). Foram avaliados o efeito antimicrobiano dos adesivos pelo ensaio de inibição da formação de biofilme em monocultura de *S. mutans* e pela técnica de microcosmos, assim como o desempenho físico-mecânico destes adesivos através dos ensaios de: resistência de união em dentina (μ TBS), grau de conversão (DC) e sorção (WS) e solubilidade (SL). Também foi avaliada a biocompatibilidade por meio de ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. Os dados foram analisados estatisticamente por análises de variância e testes complementares. Na atividade anti-biofilme com monocultura de *S. mutans*, AP mostrou maior efeito seguido do EA e do CPB. No modelo de microcosmos, maior viabilidade foi encontrado em AC para microrganismos totais e menor viabilidade foi encontrada no C, EA e CPB para acidúricos totais. Já para lactobacilos totais, maior viabilidade foi encontrada no C e AC, e para *S. mutans* encontramos valores similares em todos os grupos. Para GC, WA, SL e μ TBS, o EA foi similar ao AC, porém após 6 meses de envelhecimento os valores de μ TBS diminuíram para o EA. Com relação à citotoxicidade, o *primer* do CPB e o *Bond* do AP foram o mais tóxicos. Para genotoxicidade, todos apresentaram resultados similares. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que: o EA teve efeito antimicrobiano, biocompatibilidade e propriedades físico-mecânicas imediatas similares aos comerciais, mas após 6 meses houve diminuição da resistência de união no entanto foi similar as referencias comerciais.

Palavras-chave: Agentes adesivos dentinários. Adesivos autocondicionantes. Agentes antibacterianos. *Butia capitata*. Óleos essenciais.

ABSTRACT

PERALTA, Sonia Luque. Incorporation of the *Butia capitata*'s essential oil as antibacterial in an experimental adhesive. 2011. 116f. Dissertation (Master Course) – Postgraduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect and physical mechanical properties of a self-etching experimental adhesive after the incorporation of an essential oil obtained from Butiá's seeds (*Butia capitata*). It was formulated a two-step self-etching adhesive system composed of dentin primer and bond (cover resin). The primer was prepared with fixed amounts of 2-Hidroxiethyl methacrylate (HEMA), phosphoric acid ester monomer and solvent. The cover resin (bond) was prepared with a homogeneous mixture of Biphenyl-A glicidil dimethacrylate (Bis-GMA), Triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA), HEMA, photoinitiators as camphoroquinone (CQ) and Ethyl 4-dimethyl amine benzoate (EDMAB); and 1% *Butia Capitata*' seeds oil (butiá). Three adhesives have been tested as commercial references: Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB) and Adper SE Plus (AP), and two experimental adhesives: Control adhesive without oil (CA), and experimental adhesive containing butiá's oil (EA). The antimicrobial effect of adhesives was evaluated by the methods of biofilm growth inhibition in a *Streptococcus mutans* monoculture assay and by the microcosm technique. The physical mechanical performance of these adhesives was evaluated by micro tensile bond strength (μ TBS), degree of conversion (DC), and water sorption (WS) and solubility (SL). It also was evaluated the biocompatibility by the genotoxicity and cytotoxicity assays. The data were statistically analyzed by analysis of variance and complementary tests. In the assay of anti-*S. mutans* biofilm, AP showed the highest effect, followed by EA and CPB. In the microcosm assay, high viability was found in AC for total microorganisms, and minor viability was found in C, EA and CPB for total aciduric. While for total *Lactobacillus* most viability was found in C and AC, and for *S. mutans*, all groups had similar values. For the GC, WA, SL e μ TBS tests EA was similar to CA, but after six months of aging the μ TBS values were reduced for EA. Regarding the cytotoxicity the CPB primer and the AP bond were the most toxic, and regarding genotoxicity all groups have had similar results. According to results obtained, we can conclude that EA have similar immediate antimicrobial effect, physical-mechanical properties and toxicity to commercial adhesives, but after six months the microtensile strength was reduced, but similar to commercial references.

Keywords: Dentin-bonding agents. Self-etching adhesives. Anti-bacterial agents. *Butia capitata*. Essential oils.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CROMATOGRAFIA DO ÓLEO DA SEMENTE DE <i>BUTIA CAPITATA</i>	9
FIGURA 2. ENSAIOS FÍSICO-MECÂNICOS.....	12
FIGURA 3. SISTEMAS ADESIVOS TESTADOS	13
FIGURA 4. APARELHO DE ESPECTROSCOPIA FTIR.	14
FIGURA 5. MÁQUINA DE ENSAIOS MECÂNICOS EMIC DL 500	16
FIGURA 6. POSICIONAMENTO DE CORPO DE PROVA PARA METODOLOGIA DE SORÇÃO E SOLUBILIDADE.	18
FIGURA 7. MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA	20
FIGURA 8. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	21
FIGURA 9. BLOCOS DE DENTINA APÓS ESTERILIZAÇÃO E COLOCAÇÃO NOS SUPORTES.	23
FIGURA 10. DISPOSIÇÃO DOS BLOCOS DE DENTINA NA PLACA DE 24 POÇOS.	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DA SEMENTE DE <i>BUTIA CAPITATA</i>	9
TABELA 2. COMPOSIÇÃO DO PRIMER E DO BOND DOS SISTEMAS ADESIVOS AUTOCONDICIONANTES EXPERIMENTAIS AVALIADOS.	10
TABELA 3. DESCRIÇÃO DE MATERIAIS UTILIZADOS NO ESTUDO	11
TABELA 4. ENSAIOS DE CITOTOXIDADE A SEREM DESENVOLVIDOS.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	<i>Adsorption Buffer</i> (Tampão de adsorção)
AC	Adesivo controle
EA	Adesivo experimental
AP	<i>Adper SE Plus</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Refletância total atenuada)
BHI	Broth Heart Infusion, (infusão de cérebro e coração utilizada para testes microbiológicos)
Bis-GMA	Bisfenol A Glicidil dimetacrilato
Bis-MEP	Bisfenol-Metacrilóiloxietil hidrogênio fosfato
C6	Cadeia carbônica de 6 carbonos
CA	Falha coesiva em adesivo
CAR	Cárie adjacente à restauração
CC	Falha coesiva em compósito
CDC-Bio	Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais
CD	Falha coesiva na dentina
CPB	Clearfil Protect Bond
CQ	Canforquinona
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDMAB	Etil 4-Dimetilamino Benzoato
F	Carga máxima em Newton

FA	Falha adesiva
FO	Faculdade de Odontologia
GPa	GigaPascal
H	Altura
HEMA	2-Hidroxietil Metacrilato
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> , (Organização de Normalização Internacional)
L	Distância
LMW	<i>Low Molecular Weigh</i> (Baixo peso molecular)
M	Falha mista
m ₁	Massa um ou Primeira massa
m ₂	Massa dois ou Segunda massa
m ₃	Massa três ou Terceira massa
MDP	<i>10-Methacryloyloxydecyl Phosphate</i> (10- metacrilóiloxidecil fosfato)
MDPB	12-Methacryloyloxydodecyl pyridinium Bromide (brometo de metacrilóiloxidodecílpiridínio)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mm	Milímetros
MMPs	Metaloproteinases da matriz
% mol	Percentual molar
MPa	MegaPascal
N	Newton
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium</i> <i>bromide</i>

°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PS	Peso Seco
R	Radio
R _p	<i>Rate of polymerization</i>
R _p máx	Maximum Rate of polymerization
RPM	Rotação por minuto
RT-FTIR	<i>Real Time–Fourier Transform Infra Red</i> (Método de espectrofotômetro no Infravermelho Transformada de Fourier)
SD	<i>Standard Deviation</i> (desvio padrão)
SE	Clearfil SE Bond
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>)
SFB/FBS	Soro Fetal Bovino
SiC	Carbeto de Silício
SL	Solubilidade
<i>S.mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TEGDMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
V	Volume
WS ou SA	<i>Water Sorption</i> ou Sorção de água
% wt	<i>Weight percent</i> (percentual em massa)

ZnSe Seleneto de zinco

Mtbs *Microtensile Bond Strength* (Resistência de união à microtração)

Sumário

1. PROJETO DE DISSERTAÇÃO	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.2 JUSTIFICATIVA	5
1.3 OBJETIVOS.....	6
1.3.1 Geral.....	6
1.3.2 Específicos	6
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS	7
1.4.1 Aspectos éticos.....	7
1.4.2 Obtenção e caracterização do extrato do óleo de Butiá.....	7
1.4.2.1 Extração do óleo essencial de Butiá capitata (“butiá”):	7
1.4.2.2 Separação dos compostos por cromatografia gasosa.....	7
1.4.2.3 Perfil químico do óleo extraído da semente de Butia capitata	8
1.4.3 Formulações do sistema adesivo experimental	10
1.4.4 Referências comerciais utilizadas	11
1.4.5 Ensaios físicos-mecânicos	12
1.4.5.1 Cinética de conversão	13
1.4.5.2 Ensaio de microtração (Resistência de união à dentina)	14
1.4.5.3 Sorção e solubilidade em água	17
1.4.5.4 Avaliação da qualidade da camada híbrida.....	18
1.4.6 Ensaios Biológicos	20
1.4.6.1 Método de difusão em Ágar:	21
1.4.6.2 Acúmulo de biofilme de S. mutans em substrato após aplicação de sistemas adesivos ..	22
1.4.6.3 Efeito do adesivo em Microcosmos	25
1.4.6.4 Avaliação do acúmulo de biofilme na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
1.4.6.5 Ensaios de citotoxicidade	27
1.4.7 Análise estatística	29
1.5 ORÇAMENTO.....	30
1.6 CRONOGRAMA	31
1.7 REFERÊNCIAS	32
RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO	35
2. ARTIGO 1.....	36
3. ARTIGO 2.....	62
4. CONCLUSÕES	87
5. REFÊRENCIAS	88
APÊNDICES.....	97
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	97

ANEXOS.....	98
-------------	----

1. PROJETO DE DISSERTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

Os sistemas adesivos contemporâneos, denominados “autocondicionantes”, apresentam a facilidade de utilização, sendo clinicamente mais promissores do que os adesivos convencionais. Este sistema elimina a fase de lavagem e, por isso, não só diminui o tempo de aplicação clínica, mas também reduz significativamente a sensibilidade técnica, ou o risco de ocorrência de erros durante a sua aplicação. Existem basicamente dois tipos de autocondicionantes: suave e forte. Um autocondicionante forte tem $\text{pH} < 1$. O autocondicionante suave tem pH em torno de 2,0 (VAN MEERBEEK et al., 2001).

Estes adesivos têm demonstrado desempenho satisfatório em estudos de curto prazo (DE MUNCK et al., 2003; BRESCHI et al., 2008). No entanto, a degradação combinada do polímero adesivo e o colágeno têm sido considerados fator responsável pelo insucesso da adesão dental e conseqüente perda da restauração. Portanto, estratégias para melhorar a qualidade polimérica do adesivo têm sido propostas. Recentemente uma estratégia utilizada para aumentar a longevidade das restaurações adesivas tem sido a inibição das enzimas metaloproteinases (MMPs) da matriz presente no colágeno (PASHLEY et al., 2004). As MMPs formam uma família de enzimas proteolíticas dependentes de metais que, coletivamente, são capazes de degradar todos os tipos de componentes protéicos da matriz extracelular, como o colágeno.

Adicionalmente a isto, um método de prevenir a desmineralização do esmalte e da dentina é utilizar um material restaurador ou sistema adesivo capaz de inibir o crescimento microbiano e, preferencialmente, que também seja bactericida (IMAZATO, 2003; DAUGELA; OZIUNAS; ZECONIS, 2008). Vários agentes antimicrobianos têm sido incorporados aos materiais odontológicos como estratégia de se obter materiais efetivos contra a alta frequência de lesões cariosas recorrentes depois do tratamento restaurador adesivo. O flúor e a clorexidina são os aditivos preventivos mais comuns na Odontologia. A remineralização através da liberação de flúor dos materiais dentários é significativa, mas o efeito antibacteriano é outra propriedade importante de ser valorizada visto que a inativação das bactérias é uma estratégia direta de erradicação da ocorrência da doença cárie (MARCZUK-

KOLADA et al., 2006). Embora inicialmente altas, as quantidades de flúor e clorexidina liberadas pelos materiais são reduzidas ao longo do tempo (BURKE; RAY; MCCONNELL et al., 2006; WIEGAND; BUCHALLA; ATTIN, 2007). Então novas tentativas de adquirir um material com efeitos antibacterianos são principalmente relevantes para a inibição do acúmulo bacteriano e formação de biofilme na superfície dos materiais e ao redor das restaurações, mais especificamente na interface dente-restauração.

A utilização de materiais restauradores dotados de propriedades antibacterianas tem sido uma estratégia utilizada na tentativa de exercer uma proteção nas margens e paredes cavitárias (IMAZATO, 2003), reduzindo assim o número de falhas por CAR (LI et al., 2009; KIELBASSA et al., 2003). O MDPB (metacriloiloxidodecilmiridínio brometo) é um exemplo de monômeros com ação antibacteriana que vem sendo utilizado na composição de compósitos e sistemas adesivos (IMAZATO et al., 2006).

O Clearfil Protect Bond® (Kuraray, Japão) tem demonstrado maiores dimensões de zonas de inibição antimicrobiana no método de difusão em ágar quando comparado com outros *primers* (IMAZATO et al., 2006; FEUERSTEIN et al., 2007). No entanto, algumas evidências demonstram que os sistemas adesivos contendo flúor e um antibacteriano, não impediram a formação de cárie secundária ao longo da interface dentina / restauração (DE CARVALHO et al., 2009). Por isso, novos agentes antibacterianos devem ser investigados visando contemplar esta falha na atividade antibacteriana do adesivo e uma alternativa está na investigação de produtos naturais com atividade antimicrobiana, visto que o Brasil dispõe de ampla e vasta biodiversidade de espécies vegetais com potencial terapêutico.

As plantas medicinais são utilizadas em países em desenvolvimento como tratamento alternativo para problemas de saúde (DUARTE et al., 2005). Muitos extratos de plantas e óleos essenciais isolados de plantas medicinais têm demonstrado exercer atividade biológica *in vivo* e *in vitro*, pelo qual se justifica a avaliação destas plantas tradicionais centrado na caracterização da atividade antimicrobiana destas plantas (MARTINEZ et al., 1996). Produtos naturais usados como fitoterápicos como o “alho” (*Allium sativum*), a “hortelã” (*Mentha piperita*), a “guaçatonga” (*Casearia sylvestris*), o “confrei” (*Symphytum officinale*), o “craijurú” (*Arrebidaea chica*), o “alecrim” (*Rosmarinus officinalis*) e a

“bardana” (*Arctium minus*), dentre outros, têm demonstrando propriedades medicinais no combate a doenças que acometem o ser humano.

Considerando ainda o decreto federal 5.813 de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, associado à portaria de 3 de maio de 2006 no Ministério da Saúde, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, a relevância em conhecer esse tema toma grande dimensão, já que o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos no Brasil será, num futuro próximo, uma realidade dos serviços públicos de saúde e também uma alternativa terapêutica completamente legalizada.

O termo “butiá” é a designação comum às palmeiras do gênero *Butia*, com nove espécies conhecidas (*Butia archeri*, *B. campicola*, *B. capitata*, *B. eriospatha*, *B. microspadiz*, *B. paraguayensis*, *B. purpurascens*, *B. Stolonifera* e *B. Yatay*), nativas da América do Sul. Possuem em geral estipe médio, com cicatriz de pecíolos antigos, longas folhas penatífidas em obras trançadas, e pequenas drupas comestíveis, com semente oleaginosa.

No Rio Grande do Sul, foi registrada a ocorrência de *B. capitata* Becc., *B. eriospatha* Becc. *B. odorata* Becc., *B. paraguayensis* L. H. Bailey e *B. yatay* Becc (ROSSATO, 2007). Independentemente da espécie, neste Estado, estas palmeiras são conhecidas como “butiá” ou “butiazeiros” e seus frutos são popularmente denominados de “butiá” ou “coquinho”. A utilidade que se dá para este fruto é a produção de sucos e licores, sendo utilizado como uma fonte de renda para a população e esta alternativa tende a ampliar-se com o desenvolvimento de novos produtos a partir dos frutos e do artesanato das folhas da árvore desta espécie vegetal (BUTTOW, 2008). Com relação à composição química, o óleo da polpa do coquinho-azedo do “butiá” (espécies *B. capitata* e *B. eriosphata*) apresenta predomínio dos ésteres metílicos de ácido oléico (38,6-42,8%), palmítico (18,9-23,6%) e linoléico ou ômega-6 (13,4-18,5%), seguidos por menores teores de ácidos: láurico (4,5-7,9%), capríco (3,2-7,3%), mirístico (4,1-6,4%), linolênico ou ômega-3 (2,0-2,4%), caprílico (1,7-1,9%), cáprico (0,5-0,9%), palmitoléico (0,4-0,7%), esteárico (0,9-1,8%), araquídico (0,1-0,2%) e gadoléico (traços-0,1%). Os ésteres do ácido capríco (C6) saturados ou não-saturados estão envolvidos na produção do aroma de frutas tropicais, o que explica o elevado conteúdo deste ácido graxo na polpa

fortemente aromática do “coquinho-azedo” (LOPES, 2008). No entanto na semente, conforme Tabela 1, encontramos ácido láurico (33,3%), oléico (20,3%), capríco (13,1%), caprílico (6,16%), mirístico (6,54%), linoléico (4,02%) e esteárico (3,87%).

O ácido dodecanóico ou ácido láurico, é um ácido graxo saturado, de fórmula molecular: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$. É o principal ácido graxo do óleo de coco e do óleo de palma, e crê-se que possua propriedades antimicrobianas. É também encontrado no leite humano (5.8% da gordura total), no leite de vaca (2.2%) e leite de cabra (4.5%). Trata-se de um sólido, branco, pulverulento, com odor ligeiro a sabão.

O ácido oléico ou Ácido (9Z)-9-octadecenóico, é um ácido graxo de cadeia longa possuindo 18 carbonos na sua estrutura é considerado um ácido graxo insaturado.

ISAACS (1990, 1995 apud SILVEIRA 2005) indicam que ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como o ácido oléico e ácidos graxos saturados de cadeia média, como o ácido láurico, são responsáveis pela atividade antimicrobiana do leite humano e bovino, inativando tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas.

Vários estudos mostraram atividade antibacteriana contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, mas não bactérias Gram-negativas (GEORGEL, 2005; SKRIVANOVÁ. 2005; DRAKE et al., 2008). Segundo WILLE e KYDONIEUS (2003 apud NAKATSUJI 2009), o ácido láurico é o antimicrobiano mais potente dos ácidos graxos saturados. É comumente encontrado em produtos naturais, como coqueiros e leite, e exerce forte atividade antimicrobiana contra muitas bactérias gram-positivas (KABARA, 1972; SKRIVANOVÁ et al., 2005).

1.2 JUSTIFICATIVA

A maior razão de falhas e de substituição das restaurações é o desenvolvimento de lesões de cárie secundária na interface dente-restauração, Visando reduzir este problema na Odontologia tem se utilizado muitos materiais com propriedades antibacterianas a partir da adição de certos compostos químicos. No Brasil, o uso da Fitoterapia tem crescido e esta tendência é considerada similar ao resto do mundo. O presente trabalho pretende

incorporar um óleo essencial com propriedade antibacterianas a partir da semente de *Butia capitata*, em um adesivo autocondicionante de dois passos o qual ainda não foi explorado e que poderia surgir como uma alternativa possível para utilização nos sistemas adesivos. Além disso, sua utilização pode contribuir para evolução e desenvolvimento de novos biomateriais com componentes de recursos renováveis, oriundos de biodiversidade brasileira para aplicação odontológica. A importância do presente estudo está na pouca quantidade de pesquisas sobre uso de óleos essenciais na odontologia, como o óleo de “butiá” e principalmente no aproveitamento de um resíduo que é a semente deste fruto que, na maioria das vezes, é dispensado como resíduo alimentar.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Geral

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito antibacteriano, desempenho físico-mecânico e biocompatibilidade de um sistema adesivo experimental autocondicionante de dois passos após incorporação de um óleo essencial (de *Butia Capitata*).

1.3.2 Específicos

1. Determinar a atividade antimicrobiana deste adesivo experimental por meio de ensaios microbiológicos (método de difusão em ágar, técnicas de inibição de formação de biofilme de *S. mutans* e avaliação visual do acúmulo de biofilme bacteriano com MEV);
2. Avaliar o desempenho físico-mecânico do sistema adesivo experimental através dos ensaios *in vitro* de: cinética de polimerização, resistência de união em dentina por microtração, sorção e solubilidade em água e avaliação da camada híbrida através de MEV;
3. Determinar a biocompatibilidade deste sistema adesivo através de ensaio de citotoxicidade.

As hipóteses a serem testadas são que a adição do óleo essencial de *Butia capitata* (“butiá”) no sistema adesivo dará um efeito antibacteriano e não altera as propriedades físico-mecânicas.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi cadastrado no Conselho Coordenador de Ensino, Pesquisa e Extensão (COCEPE) com número 4.02.00.026, e encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e aprovado sob parecer do N° 180/2010. O projeto caracteriza-se por ser interdisciplinar (Odontologia - Química).

1.4.2 Obtenção e caracterização do extrato do óleo de Butiá

1.4.2.1 Extração do óleo essencial de Butiá capitata (“butiá”):

Sementes extraídas de frutos de *Butia capitata* oriundos de uma palmeira localizada em uma das sedes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), do município de Pelotas/RS, foram utilizadas neste experimento. Os frutos foram colhidos na safra 2009 e imediatamente despulpados, para separação do caroço (endocarpo).

As sementes (“caroços”) do “butiá” foram separadas da polpa, lavadas com água destilada e secas em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 40°C por 7 dias. Posteriormente, a casca da semente (“caroço”) foi quebrada a fim de se obter a amêndoa.

Em um balão de 250 ml, foi adicionado aproximadamente 200 ml de hexano (MERCK) e no mesmo foi adaptado um extrator acompanhado de um cartucho com 25g de amêndoa munida de manta de aquecimento. O sistema ficou em refluxo por 3h e após esse período, o solvente foi removido com auxílio de evaporador rotativo, a amostra foi seca e o óleo obtido foi armazenado sob proteção da luz a uma temperatura de 20°C.

1.4.2.2 Separação dos compostos por cromatografia gasosa

O óleo obtido a partir da amêndoa do “butiá” foi analisado por Cromatografia Gasosa (CG)-FID, equipamento SHIMADZU 2010 equipado com uma coluna capilar DB-5 de 30m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A análise foi efetuada sob uma rampa de aquecimento com temperatura inicial de 100°C, com aumento de 10°C/min até 150°C,

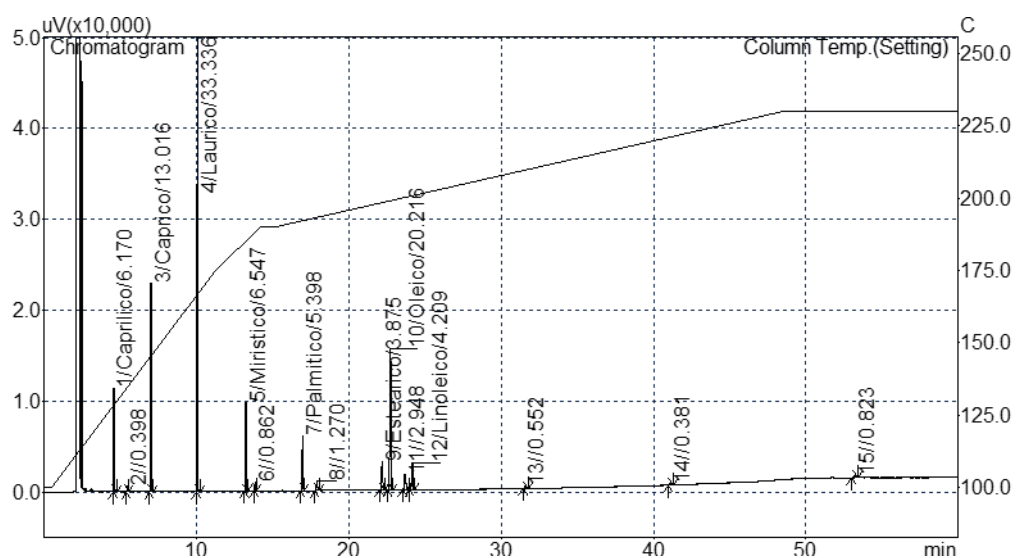
posteriormente houve crescimento de 2°C/min até 175°C; e houve um aumento de temperatura até 280°C, com temperatura do injetor e detector de 280°C.

1.4.2.3 Perfil químico do óleo extraído da semente de *Butia capitata*

Na caracterização realizada à semente do óleo de *Butia capitata*, foi encontrado as seguintes concentrações de cada um dos ésteres dos ácidos graxos que o compõem, apresentando em maior quantidade: ácido láurico (33,3%) seguido do ácido oléico (20,2%), em menores concentrações foi encontrado os ácidos cáprico (13%), caprílico (6,2%), mirístico (6,5%), palmítico (5,4%), linoléico (4,2%), esteárico (3,9%), entre outros não diferenciados, conforme se observa na tabela 1, fig 1.

Tabela 1. Composição da semente de *Butia Capitata*

Pico#	Ret.Tempo	Altura	Nome Composto	Conc. (%)
1	4.549	11390.1	Ac. Caprílico	6.16977
2	5.448	582.2		0.39767
3	7.003	22894.8	Ac. Cáprico	13.01623
4	10.038	55152.1	Ac. Laurico	33.33562
5	13.230	9701.8	Ac. Mirístico	6.54665
6	13.833	966.0		0.86191
7	16.937	6010.6	Ac. Palmítico	5.39771
8	17.889	1050.6		1.27013
9	22.160	3120.6	Ac. Esteárico	3.87545
10	22.730	15515.4	Ac. Oléico	20.21571
11	23.679	1715.4		2.94775
12	24.161	3016.9	Ac. Linoléico	4.20871
13	31.570	274.6		0.55235
14	41.102	172.9		0.38144
15	53.233	278.3		0.82289

**Figura 1.** Cromatografia do óleo da semente de *Butia capitata*

1.4.3 Formulações do sistema adesivo experimental

Os reagentes analíticos (Labsynth® Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) empregados no presente estudo estão disponíveis no Centro de Controle e Desenvolvimento de Biomateriais (CDC-Bio) da Faculdade de Odontologia da UFPel. A proporção em massa dos produtos experimentais será realizada, isotermicamente a 23°C e umidade relativa de 70%, em balança analítica de precisão (AG 200, Gehaka Indústria e Comércio Eletro Eletrônica, São Paulo, SP, Brasil).

Primer

O primer autocondicionante experimental será formulado utilizando os reagentes: 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) (Aldrich, Steinheim, Alemanha); HEMA-P. Como solventes serão utilizados: etanol absoluto (Synth, Diadema, SP/Brasil) e água destilada. Estes reagentes (Tabela 2) serão misturados mecanicamente por 1 minuto e em seguida levados à cuba ultrassônica (Plana CT CBU 100 / 1LDG, Tatuapé, SP, Brasil), por 10 minutos para homogeneização da mistura. O pH do primer será mensurado em um pHmetro digital (An 2000 microprocessado, Analion, Riberão Preto, SP, Brasil).

Tabela 2. Composição do primer e do bond dos sistemas adesivos autocondicionantes experimentais avaliados.

	Composição	% massa
PRIMER	HEMA-P	30
	HEMA	30
	Etanol	20
	Água	20
	Total	100
ADESIVO	Bis-GMA	50
	HEMA	25
	TEGDMA	25
	Óleo da semente de <i>Butia capitata</i> *	1
	Total	100

Abreviaturas: HEMA: 2-hidroxietil metacrilato; MEP: metacriloiloxietil dihidrogenio fosfato; Bis-MEP: bis-metacriloiloxietil hidrogenio fosfato; Bis-GMA: bisfenol A glicidil dimetacrilato; TEGDMA: trietilenoglicol demetacrilato; HEMA: 2-hidroxietil metacrilato

*No grupo AEO será acrescentado 1% de óleo da semente de *Butiá capitata*, em detrimento da solução homogênea dos demais componentes do adesivo.

Adesivo

Os adesivos experimentais serão formulados a partir de uma resina adesiva modelo composta por (concentração em massa): 50% de Bisfenol A glicidil dimetacrilato (Bis-GMA), 25% de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e 25% de Trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) e óleo essencial de *Butia capitata* na concentração de 1% (tabela 2). Os monômeros componentes da resina adesiva modelo serão misturados mecanicamente por 5 minutos e homogeneizados em cuba ultrassônica (Plana CT), por 10 minutos.

1.4.4 Referências comerciais utilizadas

Neste estudo, serão utilizados três produtos de marcas comerciais: Clearfil Protect Bond (PB) que contem MDPB, Clearfil Se Bond (SB) que contem MDP, e Adper SE Plus, os quais servirão de referencia comercial aos adesivos em experimentação. A tabela 3 descreve o nome comercial, o fabricante e a composição química dos produtos.

Tabela 3. Descrição de materiais utilizados no estudo

Sigla	Produto	Composição	Lote
PB	Clearfil Protect Bond; Kuraray Medical, Tóquio, Japão	1) PRIMER (primer auto-condicionante) 6ml -MDP, MDPB, HEMA, dimetacrilato hidrofilico, foto-iniciador, água	00047B
		2) BOND (agente adesivo) 5ml -MDP, HEMA,Bis-GMA, dimetacrilato hidrofóbico, foto-iniciador, água, sílica coloidal, superfície tratada com NaF	00019B
SB	Clearfil Se Bond; Kuraray Medical, Tóquio, Japão	1) PRIMER (primer auto-condicionante) 6ml -MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, foto-iniciador, água.	00727A
		2) BOND (agente adesivo) 5ml -MDP, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilato hidrofóbico, foto-iniciador, sílica coloidal.	00956A
Adper SE Plus	Adper SE Plus; 3M, St Paul, MN, EUA	1) Líquido A (Primer autocondicionante) 5g -Água, HEMA, Surfactante, Colorante rosa.	8BH
		2) Líquido B (Adesivo) 5g -UDMA, TEGDMA, TMPTMA, HEMA fosfato, nanopartícula de zircônia. Canforquinona.	9BI

1.4.5 Ensaios físicos-mecânicos

Os ensaios físicos - mecânicos que serão realizados neste projeto estão demonstrados na Fig. 2, e os grupos a serem analisados: CPB(Clearfil Protect Bond), SE(Clearfil SE Bond), AP(*Adper SE Plus*), CA(Adesivo Experimental Controle), e EA(Adesivo experimental com óleo de “butiá”), na Fig 3. Os adesivos experimentais, bem como os ensaios serão realizados no Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais – FO/UFPel (CDC BIO).

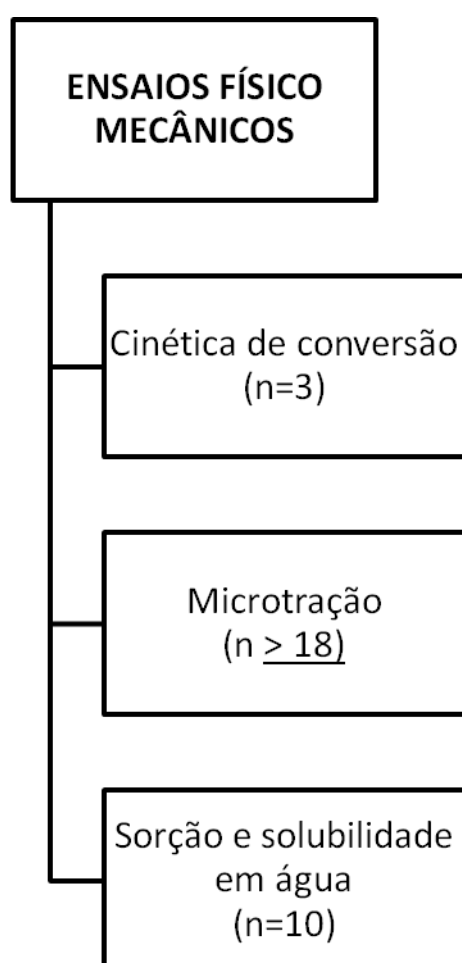


Figura 2. Ensaios físico-mecânicos

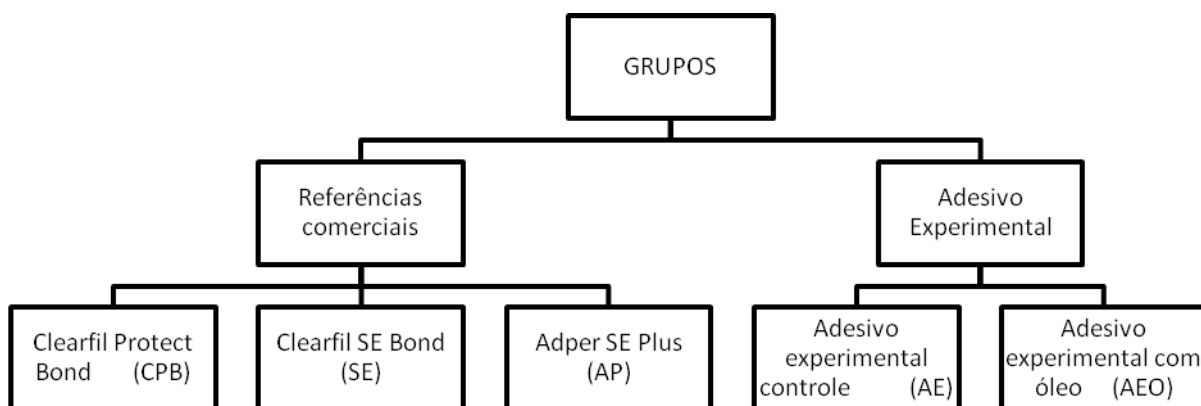


Figura 3. Sistemas adesivos testados

1.4.5.1 Cinética de conversão

A cinética de conversão dos adesivos será avaliada por meio de aparelho espectrofotômetro infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR Shimadzu Prestige21 Spectrometer, Shimadzu, Tóquio Japão) equipado com dispositivo de refletância total atenuada (ATR), composto por um cristal horizontal de seleneto de zinco (ZnSe), com espelhos de angulação de 45° (PIKE Technologies, EUA). Um suporte será acoplado para a fixação da unidade foto-ativadora LED (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália) ao espectrofotômetro (fig 4), permitindo uma distância uniforme de 5mm entre a extremidade da ponteira de fibra ótica e a amostra. A irradiância será mensurada por intermédio de radiômetro portátil (model 100, Kerr, EUA).

Cada amostra será vertida diretamente no cristal de ZnSe em pequenas gotas (~3µL) e fotoativada por 20 segundos. Cada adesivo será analisado três vezes. Para o monitoramento de varredura será utilizado o software IRSolution, em uma faixa espectral entre 1750 e 1550cm⁻¹, com resolução de 8 cm⁻¹ e velocidade de deslocamento de espelho de 2,8mm/s. Com esta configuração, é possível obter um espectro por segundo durante a foto-ativação. A análise será realizada em ambiente com temperatura controlada de 23°C e umidade relativa de <60%.

O grau de conversão, por segundo, será calculado considerando a intensidade da vibração do tipo estiramento da dupla ligação carbono-carbono na frequência de 1635cm⁻¹.

O estiramento simétrico do anel aromático em 1610cm^{-1} das amostras polimerizadas e não polimerizadas será utilizado como padrão interno. Posteriormente, os dados obtidos serão plotados em uma curva ajustada pelo parâmetro regressivo não-linear de Hill 3.

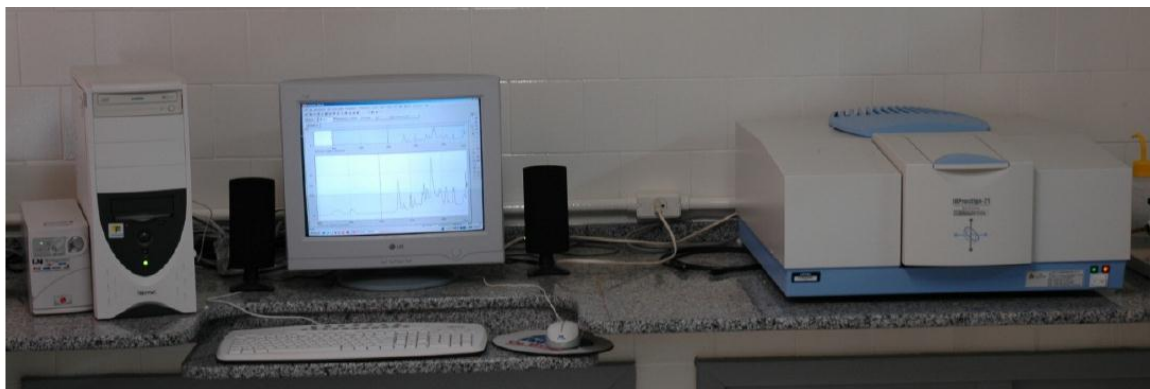


Figura 4. Aparelho de Espectroscopia FTIR.

1.4.5.2 Ensaio de microtração (Resistência de união à dentina)

Quarenta incisivos inferiores bovinos serão obtidos em frigorífico e imediatamente armazenados em solução desinfetante de cloramina-T 0,5% durante sete dias. Depois do período de desinfecção, as raízes serão seccionadas, e serão então colocados em água destilada e acondicionados em freezer, aonde permanecerão congeladas até o momento da utilização.

Será escolhida aleatoriamente a quantidade de dez dentes para cada grupo em teste. Então, a face lingual será planificada e a superfície vestibular será desgastada até exposição da dentina superficial, utilizando disco de esmeril em cortadeira. A padronização da superfície dentinária será conseguida através do polimento das amostras por 60s, usando lixas impermeáveis de carbeto de silício (SiC) com granulação #600 acopladas a uma lixadeira/ politriz universal (Aropol-E, Arotec S.A. Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil), girando com velocidade de 50 RPM, sob irrigação constante.

Todos os procedimentos adesivos serão executados por um único operador previamente treinado.

Após aplicação de jato de ar, deixando a superfície visivelmente seca, o condicionamento de toda superfície de dentina será realizado através da aplicação dos *primers* autocondicionantes de cada sistema tendo como base

as recomendações dos fabricantes. De acordo com os grupos o *primer* será aplicado com auxílio de um *microbrush* descartável sob agitação constante por 10 segundos.

Uma fina camada do componente adesivo será aplicada uniforme e regularmente sobre toda a superfície de dentina e fotoativada por 20s com aparelho LED com intensidade de 1400mW/cm^2 . Nos grupos controle, os sistemas adesivos serão usados conforme recomendações dos respectivos fabricantes.

Por fim, as restaurações serão confeccionadas com compósito restaurador (Charisma® C2, Heraeus Kulzer, Hanau, Hesse, Alemanha), utilizando quatro incrementos de aproximadamente 1,0 mm de espessura. Para isto, será usada a técnica incremental e cada um dos incrementos será fotoativado individualmente por 20s, seguindo recomendações do fabricante.

Os dentes restaurados, devidamente identificados por grupos, serão armazenados em água destilada no interior de estufa microprocessada (Q316M2, Quimis®, Diadema, SP, Brasil) à temperatura de 37°C , onde permanecerão durante 24 horas.

Após o período de 24 horas, as amostras serão seccionadas perpendicularmente à interface adesiva em duas direções, utilizando disco de corte diamantado (Wafering Blade, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) acoplado a cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 1000 Precision Saw, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), com velocidade de corte de 400 RPM.

Serão obtidos, em média, oito palitos por dente, sendo que os espécimes provenientes de uma mesma amostra serão distribuídos de forma aleatória nos subgrupos, contendo entre 16 e 18 unidades cada grupo. Além da avaliação da resistência de união imediata, também serão guardados palitos para utilização em testes de longevidade em estudos futuros após seis meses e um ano de armazenagem em água destilada a 37°C . Os palitos terão área de secção transversal de aproximadamente $0,7\text{mm}^2$ ($\pm 1,0$) cujas dimensões serão aferidas com um paquímetro digital (Digimatic Caliper 500-144B, Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil) com precisão de 0,01mm para cálculo da área de união.

Em seguida, os palitos serão fixados individualmente em um dispositivo metálico especialmente desenvolvido para ensaios de microtração com auxílio

de um adesivo instantâneo à base de cianoacrilato (Super Bonder Gel, Loctite® Corp., Henkel Technologies, Diadema, SP, Brasil). Os corpos-de-prova serão tracionados até a fratura em uma máquina universal de ensaios mecânicos (DL 500, EMIC® Equipamentos e Sistemas de Ensaio, São José dos Pinhais, PR, Brasil) (fig 5), utilizando velocidade de 0,5mm/min e célula de carga de 100N. (FONTES et al., 2009)

O valor de resistência de união à microtração será obtido em (MPa) de cada um dos corpos-de-prova e será oriundo da divisão da carga (Kgf) empregada no momento da fratura pela área de união (cm²) de cada amostra, utilizando o programa Tesc (Versão Standard, EMIC® Equipamentos e Sistemas de Ensaio).



Figura 5. Máquina de ensaios mecânicos EMIC DL 500

Análise do modo de fratura

Os corpos-de-prova que sofrerem falhas prematuras, durante os procedimentos de preparo dos espécimes, terão seus dados registrados separadamente.

As porções fraturadas correspondentes à dentina serão analisadas através de microscopia de luz disponível em microdurômetro digital (Microhardness Tester FM 700, Future-Tech Corp., Kawasaki, Tóquio, Japão), com aumento de 100X e 500X para determinação do modo de fratura. As falhas poderão ser classificadas em coesivas, quando ocorrerem

exclusivamente em dentina (CD) ou em compósito restaurador (CC); adesivas (A), quando ocorrerem na região de interface dentina/ resina; ou mistas (M), quando os dois tipos de fraturas ocorrerem simultaneamente, ou seja, as falhas acontecem na interface adesiva, estendendo-se para um dos substratos vizinhos.

1.4.5.3 Sorção e solubilidade em água

Confecção dos espécimes

Todas as etapas do desenvolvimento desse estudo seguem a especificação ISO 4049 (2000). Após a formulação do adesivo experimental, 10 espécimes serão confeccionados dispensando-se o material em um molde circular metálico com 1mm de espessura e 15mm de diâmetro. Sobre o material será colocada uma tira de poliéster, e em seguida fotopolimerizado cada lado do corpo de prova em 9 posições diferentes durante 20s com uma fonte de luz halógena XL 3000. Em seguida, todos os espécimes terão seus bordos polidos com lixas de granulação #600 e depois #1200.

Teste de Sorção e Solubilidade

Os espécimes serão colocados em um “dessecador” contendo sílica e armazenados em estufa a 37°C. A massa de dois corpos de prova de cada grupo avaliado será mensurada repetidamente até a estabilização dessa massa. Após isso, a massa de todos os demais espécimes também será mensurada. Essa massa será denominada de m_1 , pois representa a massa seca do espécime antes dos fenômenos de sorção e solubilidade ocorrerem.

Após a definição da m_1 , todos os espécimes de um mesmo grupo serão colocados dentro de um recipiente contendo água destilada, na concentração de 10ml para cada corpo de prova presente. Os recipientes serão armazenados dentro de uma estufa a 37°C, e após uma semana a massa de todos os espécimes será mensurada novamente, e desta vez sendo denominada de m_2 , pois representara a massa úmida do espécime após este ter sorvido água do meio em que foi armazenado.

Em seguida, os corpos de prova serão armazenados novamente no “dessecador” com sílica, dentro de uma estufa a 37°C (Fig 6), a fim de uma

terceira massa (m_3) ser adquirida, massa esta que representa a massa final do espécime após o fenômeno de solubilidade lixiviar componentes do mesmo. Após a estabilização desta massa, a m_3 de cada corpo de prova será mensurada.

A Sorção de água (WS) e a Solubilidade (SL) serão calculadas a partir das seguintes fórmulas:

$$WS = (m_2 - m_3) / V, \quad SL = (m_1 - m_3) / V,$$

Onde V representará o Volume dos espécimes, que será obtido da seguinte maneira:

$$V = \pi R^2 h,$$

Onde π representa o valor constante de 3,14; R o raio do espécime; e h a altura do mesmo. O raio é obtido através da média entre dois diâmetros perpendiculares de cada espécime; e a altura será obtida pela média entre cinco alturas diferentes para cada um dos espécimes (MALACARNE et al, 2006).

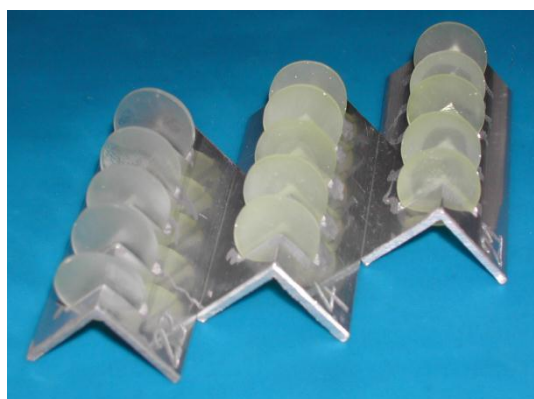


Figura 6. Posicionamento de corpo de prova para metodologia de sorção e solubilidade.

1.4.5.4 Avaliação da qualidade da camada híbrida

Dez dentes serão utilizados nesta parte do estudo. O esmalte coronal de cada dente será removido utilizando lixas grossas sob refrigeração à água para expor superfície dentinária extremamente superficial. Em seguida, será

realizada uma padronização através da utilização de lixas de carbetto de silício de granulação 600 sob refrigeração à água.

Os mesmos sistemas adesivos avaliados durante o desenvolvimento do estudo serão, novamente, utilizados para a qualificação das camadas híbridas formadas. Assim sendo, os sistemas serão aplicados conforme as técnicas descritas. Após a aplicação de cada sistema adesivo e subsequente polimerização, um compósito restaurador de baixa viscosidade (Filtek Flow, Cor A2 – 3M ESPE) será aplicado sobre a camada de adesivo presente em cada disco de dentina. Em seguida, um disco de dentina será sobreposto ao outro, constituindo um “sanduíche de resina”.

Em seguida, esta camada de compósito restaurador com 2 mm de altura será fotoativada utilizando aparelho fotoativador por 160 segundos em 6 diferentes direções constituindo um bloco de dentina/compósito/dentina.

Cada bloco, depois de armazenado em água destilada por 24 horas a 37°C, será cortado no sentido mésio-distal com disco de diamante sob refrigeração à água obtendo dessa maneira, 4 interfaces por dente. Estas interfaces serão incluídas em resina epóxica e após a sua polimerização será realizado o acabamento com lixa de carbetto de silício de granulação 600.

Os semi-blocos serão submetidos ao acabamento com lixa de carbetto de silício de granulação 600 sob refrigeração à água para remover todas as irregularidades. Em seguida, as interfaces serão polidas com lixas de carbetto de silício de granulação 1200, 1500, 2000 e 2500 e com pastas suspensas de diamante com granulação decrescente de 3,0; 0,25 e 0,10 µm (Arotec Ind. e Co, Granja Viana, SP, Brasil). A cada etapa, os espécimes serão limpos em água deionizada sob ultrassom durante 10 minutos.

Após as etapas de acabamento e polimento, as interfaces serão desmineralizadas com solução de ácido fosfórico a 50% por 5-6 segundos. Em seguida, serão lavadas em água deionizada e desproteinizadas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos. As interfaces serão submetidas à limpeza em água sob ultrassom por 10 minutos e, em seguida, elas serão imersas em 20mL de álcool a 100% por 10 minutos. Em seguida, os espécimes serão montados sobre *stubs* e desidratados em sílica gel por 2 horas.

Finalmente, os espécimes serão montados sobre os *stubs* e metalizados com liga de ouro-paládio para observação em microscopia eletrônica de

varredura (SHIMADZU SSX550, Scanning Electron Microscope, Tóquio, Japão) (fig 7), operando no modo alto vácuo e utilizando detector de elétrons secundários.



Figura 7. Microscópio eletrônico de varredura

1.4.6 Ensaios Biológicos

Os ensaios a se desenvolver serão microbiológicos e de citotoxicidade conforme fig 8. Parte dos ensaios microbiológicos será desenvolvida na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, no Laboratório de Bioquímica, com apoio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica-PROCAD (processo nº. 251/2007) da CAPES. E a outra parte será desenvolvida na Faculdade de Odontologia da UFPel.

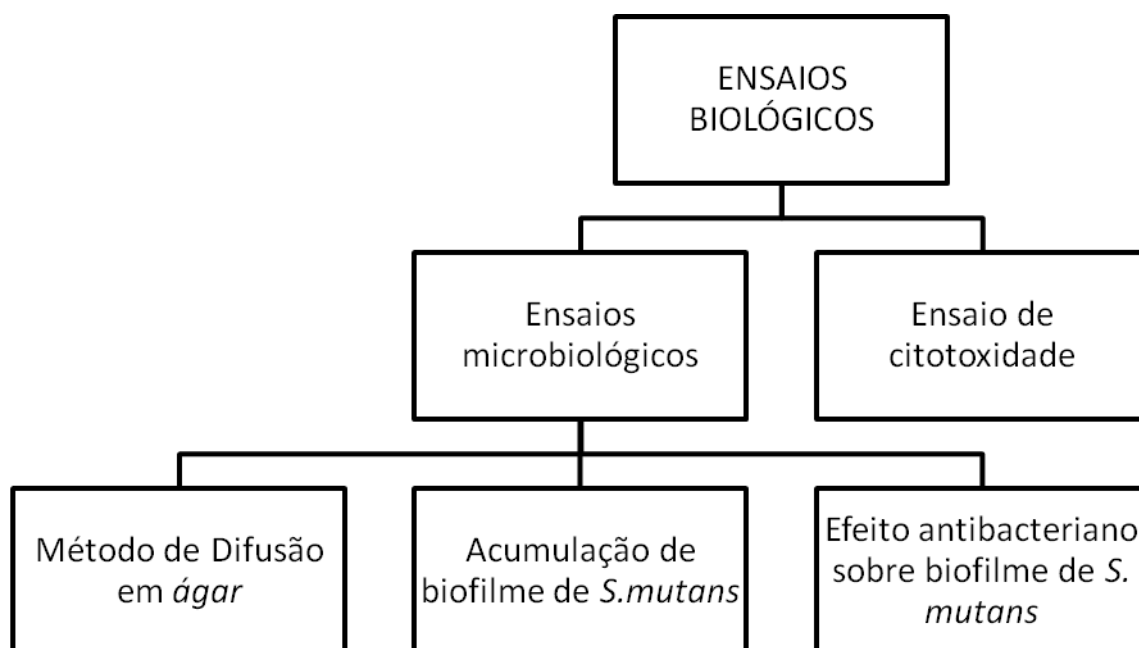


Figura 8. Ensaaios Biológicos

Reativação de cepas de *S. mutans* UA159

Cepas de *Streptococcus. mutans* UA 159 armazenadas a -80 °C serão reativadas, sendo transferidos 100µl para um tubo estéril contendo 9 ml de LMW + 1ml de glicose e incubados por 18 horas em estufa de CO₂. Após este período 10uL da mistura serão transferidos para uma placa de ágar sangue e se realizará um *streak* do caldo no ágar. A placa será incubada por 24h em estufa de CO₂ e a partir do crescimento registrado na placa, serão coletados colônias isoladas, transferidas para um tubo estéril com 9 ml de LMW + 1ml de glicose(starter) e incubadas por 18 horas em estufa de CO₂.

1.4.6.1 Método de difusão em Ágar:

Discos de papel estéreis de 5mm (diâmetro) serão colocados sobre cada placa de ágar inoculado. Em cada disco, será previamente aplicado 10 uL de cada sistema adesivo e estes serão colocados em placas com meio sólido ágar inoculado com 0.1ml de *S. mutans*. Terão como controle positivo, uma solução de digluconato de clorexidina 2% e, como controle negativo, a água destilada.

As amostras serão processadas em quadruplicata e serão testado o sistema adesivo, o *bond* será testado tanto polimerizado quanto não polimerizado. Após estes procedimentos, as placas serão incubadas em ambiente de microaerofilia, em temperatura de 37°C e 10% de CO₂. O mesmo procedimento será efetuado para avaliar a atividade dos adesivos após polimerização, quando depois de ser aplicado o adesivo no disco, este será fotopolimerizado por 10 segundos. O tamanho da zona de inibição formada ao redor dos discos será mensurada após 24 e 48 horas de incubação onde o tamanho da zona de inibição em mm = (diâmetro do halo – diâmetro da amostra) x ½. (IMAZATO, 2006; PARADELLA, 2009).

1.4.6.2 Acúmulo de biofilme de *S. mutans* em substrato após aplicação de sistemas adesivos

Confecção de blocos de dentina para a utilização no estudo *in vitro*:

Incisivos bovinos serão mantidos em formol 2% pH 7 por um período mínimo de 30 dias. Superfície dentaria com fraturas, trincas ou hipoplasias, visíveis com auxílio de lupa, serão excluídas. Os dentes serão fixados em placas de acrílico com auxílio de cera pegajosa e levados à cortadeira de precisão, para realizar a separação entre coroa e raiz. A raiz do dente fixada na placa acrílica será posicionada com o longo eixo do dente perpendicular aos discos de corte. Serão realizados cortes de 7mm na raiz do dente.

Os segmentos obtidos serão novamente posicionados em fila nas placas acrílicas e com o disco de corte serão cortados no meio. Novamente serão posicionados em fila serão realizado um corte no extremo mais externo após 4mm será feito outro corte. De novo serão fixados na placa de acrílico em linha para por cortar os excessos da parte interna da raiz.

Os blocos obtidos serão fixados em suportes acrílicos para serem planificados e desgastar a dentina remanescente em politriz com lixa de granulação 600. Obtendo se blocos de 7x4x1mm após planificação, eles serão colocados em ultra-som com uma solução detergente por 5 minutos, lavados com água destilada e armazenados em ambiente úmido a 4°C.

Aplicação dos sistemas adesivos:

Depois de retirados os blocos de dentina, estes serão secos e serão aplicados os adesivos de acordo com os grupos. Será aplicado ativamente o primer por 10 segundos sob agitação contínua. Depois disso, será aplicado um jato de ar e uma camada de adesivo de cobertura, a qual será fotopolimerizada por 20 segundos. A aplicação dos adesivos será feita em toda a superfície do bloco de dentina. Nos blocos que receberam adesivo comercial, estes serão aplicados de acordo com as instruções do fabricante.

Depois, os blocos serão enviados para esterilização com óxido de etileno. Uma vez esterilizados, os blocos serão suspensos em suportes pré-fabricados e previamente esterilizados. Todo este procedimento será em cabine de biossegurança classe 2 para evitar contaminação.



Figura 9. Blocos de dentina após esterilização e colocação nos suportes.

Teste de acumulação de biofilme:

Antes de suspender os blocos nas placas (fig 10) será preparado o meio de cultura. 100uL de *starter* será transferido para um tubo contendo 40,5ml de meio LMW e 4,5mL de glicose. Esta mistura será homogeneizada e 2mL serão transferidos para cada poço da placa. Imediatamente após este procedimento a placa com os blocos será incubada em estufa de CO₂ por 24 horas para que os

microrganismos não sejam perturbados e permitir a aderência inicial dos microrganismos.

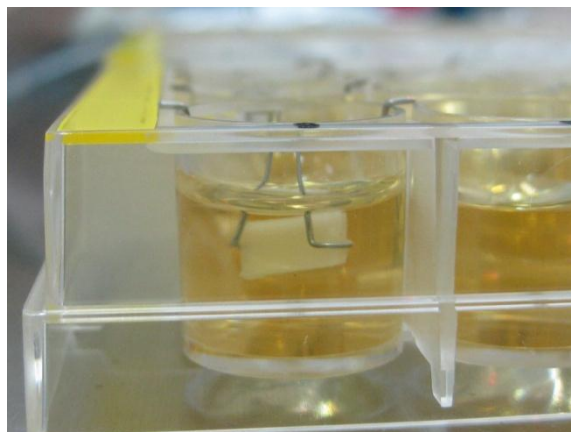


Figura 10. Disposição dos blocos de dentina na placa de 24 poços.

Após 24 horas, os blocos serão lavados com solução salina e será trocado o meio. No LMW, será mensurado o pH e 1ml do meio será armazenado na geladeira para posterior análise de Ca^{+2} . O mesmo procedimento será realizado após 48h.

Coleta de biofilme: após 72 horas, os blocos serão lavados com solução salina, e será coletado cuidadosamente o biofilme formado nos blocos. Para posterior análise de peso seco de cada diluição realizada, serão coletados 100ul e repicados em placas de petri contendo meio Agar BHI para análise de UFC (LI, et al., 2009).

Microbiologia – bloco com biofilme formado em 72 horas, exposto a solução de sacarose 1% in vitro; serão transferidos para um eppendorf com 1 mL de solução NaCl 0,9% (“salina”). Se realizará a sonicação por 30 seg a 7 w para dispensar todo o biofilme na solução salina., serão realizadas diluições seriadas, obtendo assim as diluições de 10x (1), 100x (2), 1000x (3), 10000x (4), 100000x (5) e 1000000x (6). As amostras serão plaqueadas em meio ágar BHI, dividindo-as em 6 partes, onde serão colocadas 3 aliquotas (de 20 μL) de cada diluição. A numeração da placa correspondera à diluição. As placas serão incubadas a 37°C, 10% pCO_2 por 24 h, simulando as condições orais de temperatura e pCO_2 . Após o período de incubação, será realizado a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para estimar as UFC será aplicada a seguinte fórmula:

$$[\text{UFC} \times 1000/20] \times \text{diluição}$$

Peso seco do biofilme; do mesmo eppendorf com biofilme e solução salina sonicado, serão retirados 300 µL para outro eppendorf pré-pesado e codificado. A solução será centrifugada por 5 min, 10000 g a 4°C. O sobrenadante será descartado e o tubo com o precipitado será levado ao dessecador por 24-48 h com P₂O₅. Será pesado novamente o eppendorf, o peso seco do biofilme em 1 mL será:

$$\text{Psecofinal} = (\text{Psecoeppenforf} \times 1000) / 300$$

Dosagem de cálcio do meio LMW. Os microrganismos se desenvolveram sobre um bloco de dente, causando desmineralização do mesmo, liberando Ca para o meio. Este cálcio livre no meio será dosado por espectrofotometria, na presença de arsenaso. Primeiro será feito a curva de calibração com dosagens de cálcio, com as concentrações 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; e 0,5 mM. As amostras de 24 h serão diluídas 4 x, já as amostras de 48, 72 h serão diluídas 10 x. Quanto maior o tempo de exposição do bloco ao meio maior será a desmineralização e, portanto, maior concentração de Ca dissolvida. A concentração das amostras precisa estar dentro da curva para que a leitura seja confiável. A placa com 96 poços é inserida no espectrofotômetro para leitura das amostras. É preciso indicar para o espectrofotômetro qual é a fileira da curva e em quais poços estão as amostras.

1.4.6.3 Efeito do adesivo em Microcosmos

Coleta da saliva

Será realizada a coleta de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, Illinois, EUA) de um voluntário adulto e saudável (M.S.A.), que não este sob terapia antibiótica por 1 ano. O doador suspenderá a higiene oral por 24h previamente às coletas, que serão realizados no período matutino (em jejum). A saliva será depositada em um coletor graduado estéril e transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia (FO-UFPel). Uma alíquota de saliva (0,5mL) será separada para quantificação microbiana (UFC/mL). O restante será homogeneizado em agitador de tubos tipo Vortex e imediatamente utilizado como inóculo. Para

cada experimento, a coleta de saliva será realizada no momento de sua utilização.

Protocolo de obtenção e crescimento dos biofilmes

A saliva será inoculada sobre os discos de esmalte em placas de 24 micro-poços, em um volume de 400µL por poço. Após 1h em repouso a 37°C, a saliva será delicadamente aspirada da base dos poços, e 1,8mL de meio DMM (com ou sem sacarose) serão adicionados em cada micro-poço. O modelo usado será de regime semi-dinâmico, a adição de DMM com sacarose será efetuada em tempos (6h) e concentrações (1%) as placas serão incubadas. Após o período de desafio cariogênico os discos serão enxaguados através de imersão em 2mL de solução salina estéril, inseridos em uma nova placa contendo DMM, e novamente incubados. Os biofilmes serão formados independentemente sobre os discos de esmalte suspensos em dispositivos de fio ortodôntico, em cada micro-poço. As placas serão incubadas em condição atmosférica de anaerobiose (5-10% CO₂ e menos que 1% O₂) em jarras (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP) com geradores de anaerobiose (Anaerobac- Probac) sob temperatura controlada (37°C), e mantida em repouso na incubadora. Os meios, DMM com e sem adição de sacarose, serão renovados diariamente. Após cada renovação, será realizada a leitura de pH (pHmetro – Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP; eletrodo V621 – Analion, Ribeirão Preto, SP) do sobrenadante, individualmente em cada micro-poço (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Após 72h, os discos de esmalte serão removidos dos poços com pinça estéril, e as bactérias não aderidas serão removidas gentilmente por lavagem em 2mL de solução salina estéril (THURNHEER et al., 2003). Os biofilmes serão removidos da superfície de esmalte com ajuda do sonicador.

1.4.6.4 Avaliação do acúmulo de biofilme na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Serão preparados 84 blocos de dentina, nos quais serão aplicados os sistemas adesivos em triplicata, sendo dois dos quais um controle positivo (clorexidina 2%) e um controle negativo no qual será aplicado água destilada.

Depois, os espécimes serão esterilizados com óxido de etileno, após isso será realizado o condicionamento dos blocos com saliva, descrita no ensaio anterior. Após, 4, 8, 12 e 24h os blocos de dentina de cada grupo serão analisados no MEV (LI et al., 2009).

Preparo de amostras biológicas para MEV

Uma vez retirados do meio de cultura, os blocos de dentina serão enxaguados com Tampão fosfato-salino (PBS) duas vezes por um período de 5 minutos cada. Para a fixação das proteínas, será utilizado glutaraldeído 2,5% em PBS (solução 0,1 M em PBS, pH 7,4) durante 10 minutos. Após a fixação serão enxaguados novamente em PBS duas vezes por 5 minutos cada um. Para fixação de lipídeos será utilizado o tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,05M (pH 6,8) por 60 minutos à temperatura ambiente, em uma capela de biosegurança. Depois da fixação, os espécimes serão lavados com PBS, duas vezes por 5 minutos cada um. Para desidratação das amostras, estes serão lavados duas vezes em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80% e 100%) durante 5 minutos. Em seguida as amostras permanecerão durante uma hora em ambiente limpo sobre papel-filtro em temperatura ambiente para secagem. A secagem final será realizada em secador de ponto crítico ou dessecador. Finalmente as amostras serão fixadas em “stubs” para sua posterior metalização (LI et al., 2009).

1.4.6.5 Ensaios de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade será desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de odontologia da UFPel.

Os sistemas adesivos testados serão: Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (SB), Adper SE Plus (AP), adesivo experimental controle (CA) e Adesivo Experimental + óleo (EA), *primer* e Bond (o último será testado polimerizado e não polimerizado). Cada sistema adesivo será diluído em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), em concentrações de 10 mM a 0.001 mM.

Tabela 4. Ensaios de citotoxicidade a serem desenvolvidos

	Ensaio citotoxicidade 1	Ensaio citotoxicidade 2	Ensaio Citotoxicidade 3
CPB	<i>Primer</i>	Adesivo	Eludato
CSEB	<i>Primer</i>	Adesivo	Eludato
AP	<i>Primer</i>	Adesivo	Eludato
AC	<i>Primer*</i>	Adesivo	Eludato
EA		Adesivo	Eludato

*Será usado o mesmo *primer* tanto para o adesivo experimental controle, quanto para o adesivo experimental com óleo.

Cultivo celular

Uma linhagem celular de odontoblastos MDPC 23 será utilizada no estudo. O meio de cultura celular utilizado será DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% L-glutamina, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml). Em cada poço teste de uma placa de 96 poços serão colocados 2×10^4 células em 200 µl de DMEM acrescido de 10% de SFB. A placa será incubada em uma estufa de CO₂ com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37 °C, 95% de ar e 5% de CO₂ por 24 h de forma a permitir a adesão das células no fundo da placa de cultivo.

Teste de Citotoxicidade (Ensaio MTT)

A viabilidade celular será avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica em um cristal de formazan de cor azul-

púrpura que se acumula no citoplasma celular. Uma vez que os produtos foram adicionados nos poços testes, a placa será incubada (37°C, 5% de CO₂) por um período de 24 h permitindo que produtos atuem na monocamada celular.

Após 24 h, o meio com os produtos testes de cada poço será sugado. Serão preparados 2ml de solução de MTT que serão adicionados a cada poço teste (20 µl por poço) e incubados novamente por 24 h de forma a permitir o metabolismo do MTT. Passado o período, o meio será sugado e o formazan ressuspensionado em 200 µl de dimetil sulfoxido (DMSO).

Os resultados serão lidos em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 560 nm, onde serão considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular (KOULAOUZIDOU, 2009; FERNÁNDEZ, 2010).

1.4.7 Análise estatística

O número de repetições em cada avaliação terá como base o cálculo amostral executado previamente a partir de um estudo piloto, adotando-se o poder de teste próximo ou superior a 80%, sendo empregado o programa SigmaStat® (Versão 3.01, Systat Software Inc., Port Richmond, CA, USA). A partir dos resultados, o método estatístico será escolhido com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Para todos os testes será considerado estatisticamente significativo o valor $p < 0,05$.

1.5 ORÇAMENTO

Descrição	Custo unitário Rs	Custo total Rs
Bis-GMA	450,00	450,00
Bis-EMA	600,00	600,00
TEGDMA	210,00	210,00
GDMA	180,00	180,00
UDMA	180,00	180,00
Adesivo Clearfil Protect Bond	180,00	180,00
Adesivo Clearfil SE Bond	180,00	180,00
Adesivo Adper SE Plus	190,00	190,00
Placas de cultura 24 poços	4.5	450,00
Fios ortodônticos	10,00	20,00
Caldo BHI	100.93	100.93
Meio Ágar BHI	155.05	155.05
Triptona	91.95	91.95
Extrato de levedura	74.30	74.30
Phenylmethylsulfonyl Fluoride	373.10	373.10
Fosfato de potássio 500gr	52.40	52.40
Cloreto de potássio 500g	11.10	11.10
Tetróxido de ósmio 1g	1.075,00	1075,00
Cloreto de cálcio dihidratado 500g	28.50	28.5
Placas de cultura de 96 poços	4.5	45,00
Lixas para desgaste	1,00	100,00
Luvas para procedimento	18,00	36,00
Máscaras	10,00	10,00
Resina epóxica	100,00	100,00
Cola cianocrilato	40,00	40,00
Eppendorfs	28,00	84,00
Cera pegajosa em bastão	25,00	125,00
Compósito restaurador	89,00	890,00
Microbrush	14,00	56,00
Despesas com impressão	400,00	400,00
Gastos com apresentação em congressos	2.000,00	2000,00
TOTAL		7561,00

1.6 CRONOGRAMA

Mês/Ano	de Revisão literatura	dos Aquisição materials	Teste piloto	Qualificação	Testes mecânicos	Testes Biológicos	Resultados e análise estatística	Redação	Defesa e submissão para publicação
Apr Ago./2009	X								
Set./2009	X	X							
Out./2009	X	X							
Dez./2009	X	X	X						
Jan./2009	X	X	X	X					
Mar./2010	X	X			X				
Apr./2010	X				X				
Mai./2010	X				X				
Jun./2010	X				X				
Set./2010	X					X			
Out./2010	X					X	X		
Nov./2010	X						X	X	
Dez./2010	X							X	
Jan./2011	X							X	
Feb./2011	X								X

1.7 REFERÊNCIAS

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO DORIGO E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface, **Dental Materials**, v.24, p.90-101, 2008.

BURKE, FM.; RAY, N.J.; MCCONNELL, R.J. Fluoride-containing restorative materials, **International Dental Journal**, v.56, p.33-43, 2006.

BUTTOW, M. Etnobotânica e caracterização molecular de Butia sp. 32 F. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas.

DAUGELA, P.; OZIUNAS, R.; ZEKONIS, G. Antibacterial potential of contemporary dental luting cements, **Stomatologija**, v.10, p.16-21, 2008.

DE CARVALHO, F.G.; PUPPIN-RONTANI RM.; SOARES, LE.; MARTIN, AA.; NOCITI-JUNIOR, FH. Mineral distribution and CSLM analysis of secondary caries inhibition by fluoride/MDPB-containing adhesive system after cariogenic challenges. **Journal of Dentistry**, v.37, p307, 2009.

DE MUNCK, J.; VAN MEERBEEK, B.; YOSHIDA, Y.; INOUE, S.; VARGAS, M.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. **Journal Dental Research**, v.82, n.2, p.136-40, 2003.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEM, M.; VAN MEERBEEK, B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results, **Journal Dental Research**, v.84, n.2, p.118-32, 2005.

DRAKE, D.R.; BROGDEN, K.A.; DAWSON, D.V.; WERTZ, P.W. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface, **Journal Lipid Research**, v.1, p.4-11, 2008.

DUARTE, M.C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants, **Journal of Ethnopharmacology**, v.97,p.305-311, 2005.

FERNÁNDEZ, M.R.; CARVALHO, R.V.; OGLIARI,F.A.; BEIRA, F.A.; A. ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth, **International Endodontic Journal**, v.43, p.102-108, 2010.

FEUERSTEIN, O.; MATALOM, S.; SLUTZKY, H.; WEISS, E. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **Journal of the American Dental Association**, v.138, n.3, p.349-54, 2007.

FONTES, S.T.; OGLIARI, F.A.; LIMA, G.S.; BUENO, M.; SCHNEIDER, L.F.; PIVA, E. Tetrahydrofuran as alternative solvent in dental adhesive systems. **Dental Materials**, v.25, p 1503-8.,2009.

GEORGEL, P.; CROZAT, K.; LAUTH, X.; MAKRANTONAJI, E.; SELTMANN, H.; SOVATH, S.; HOEBE, K.; DU, X.; RUTSCHMANN, S.; JIANG, Z, BIGBY, T.; NIZET, V.; ZOUBOULIS, C.C.; BEUTLER B. A toll-like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with gram-positive bacteria, **Infection and Immunity**, v.8, p.4512-21, 2005.

IMAZATO S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems, **Dental Materials**, v.6, p.449.459, 2003.

IMAZATO, S.; KURAMOTO, A.; TAKAHASHI, Y.; EBISU, S.; PETERS, C. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. **Dental Materials**, v.22, p.527.532, 2006.

ISO 4049, Dentistry-Polymer-based filling, restorative and luting materials, 2000.

KABARA, J.J.; SWIECZKOWSKI, D.M.; CONLEY, A.; TRUANT, J,P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents, **Antimicrob Agents Chemother**, v.1, p.23-8, 1972.

KIELBASSA, A.M.; SCHULTE-MONTING, J.; GARCIA-GODOY, F.; MEYER-LUECKEL H. Initial in situ secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials, **Operative Dentistry**, v.28, p.765-72, 2003.

KOULAOUZIDOU, EA.; HELVATJOGLU-ANTONIADE, M.; PALAGHIAS, G.; KARANIKA-KOUMA, A.; ANTONIADES, D. Cytotoxicity of dental adhesives in vitro, **European Journal of Dentistry**, v.1, p.3-9, 2009.

LI, F.; CHAI, ZG.; SUN, MN.; WANG, F.; MA, S.; ZHANG, L.; FANG, M.; CHEN, JH. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. **Journal of Dental Research**, v.4, p.372, 2009.

LOPES, R. Caracterização do óleo da polpa de Butiá capitata. II Simpósio Brasileiro de recursos genéticos. Novembro de 2008; Brasília - DF: p. 2005.

MALACARNE, J.; CARVALHO, R.M.; de GOES, M.F.; SVIZERO, N.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; YIU, C.K.; CARRILHO, M. **Dental Materials**, v.2, p. 973-980, 2006.

MARCZUK-KOLADA, G.; JAKONIUK, P.; MYSTKOWSKA, J.; LUCZAJ-CEPOWICZ, E.; WASZKIEL, D.; DABROWSKI, J.R.; Fluoride release and antibacterial activity of selected dental materials. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej** (Online), v.60, p.416, 2006.

MARTINEZ, M.J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZALEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p.171-174, 1996.

MORAES, R.R.; CORRER-SOBRINHO L.; SINHORETI, MA.; PUPPIN-RONTANI, RM.; OGLIARI, F.A.; PIVA, E. Light-activation of resin cement through ceramic: relationship between irradiance intensity and bond strength to dentin. **Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials**, v.1, p.160-5, 2008.

NAKATSUJI, T.; KAO, M.C.; FANG, J.Y.; ZOUBOULIS, C.C.; ZHANG, L.; GALLO, R.L.; HUANG, C.M. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris, **The Journal of Investigation Dermatology**, v.10, p.2480-8, 2009.

PARADELLA, T.C.; KOGA –ITO, C.Y.; JORGE, A.O, In vitro antibacterial activity of adhesive systems on *Streptococcus mutans*, **Journal of Adhesive Dentistry**, v.11, p.95-99, 2009.

PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R.M. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging, **Journal of Dental Research**, v.21, p.83, 2004.

ROSSATO, M. Recursos genéticos de palmeiras nativas do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul. 2007. 136 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SILVEIRA, C.S.; PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, p.143-148, 2005.

SKRIVANOVÁ, E.; MAROUNEK, M.; DLOUHÁ, G.; KANKA, J. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C-C fatty acids, **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p.77-81, 2005.

TYAS, MJ. Placement and replacement of restorations by selected practitioners. **Australian Dental Journal**, v.2, p. 81-89, 2005.

VAN MEERBEEK, B.; VARGAS, S.; INOUE, S.; YOSHIDA, Y.; PEUMANS, M. Adhesives and cements to promote preservation dentistry, **Operative Dentistry**, v.26, p.119-144, 2001.

WIEGAND, A.; BUCHALLA, W.; ATTIN, T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dental Materials**, v.23, p.343-62, 2007.

Relatório do Trabalho de Campo

O projeto inicialmente submetido à qualificação junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia consistiu no trabalho intitulado: “Desenvolvimento de um sistema adesivo experimental com propriedades antibacterianas a partir de um óleo essencial da amêndoa de *Butia capitata*”: após sugestões da banca de qualificação do projeto o nome foi modificado, e acrescentamos duas novas metodologias de ensaios biológicos: genotoxicidade e formação de biofilme em modelo de microcosmos.

2. ARTIGO 1

Title: Effect anti-biofilm of *Streptococcus mutans* and biocompatibility of an experimental self-etch adhesive with a vegetable oil

Short title: Essential oil as antibacterial in adhesive.

Sonia L. Peralta^a, Pedro H. A. Carvalho^b, Renzo A. Ccahuana-Vásquez,^c
Claudio M. P. Pereira^d, Jaime A. Cury,^e Evandro Piva^a, Rafael G. Lund^{a,*}

a Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

b Laboratory of Oral Microbiology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

c Department of Comprehensive Dentistry, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Tx, USA

d Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry and Geosciences, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

e Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba SP, Brazil

* Corresponding author. Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brazil. CEP: 96015-560. Tel/Fax: +55-53-3222-6690.

E-mail adress: rafael.lund@gmail.com (Rafael G. Lund)

Abstract

Objective: To assess the effect anti-biofilm *Streptococcus mutans*, cytotoxicity and genotoxicity of an experimental self-etch adhesive system containing *Butia capitata*'s seed essential oil. **Materials and Methods:** Clearfil Protect Bond/(CPB), Clearfil SE Bond/(CSEB), Adper SE Plus/(AP), an experimental adhesive containing *Butia capitata*'s oil/(EA) and an experimental adhesive without the oil as control/(CA). Were tested against *S. mutans* UA159 biofilms were grown on bovine enamel discs at 37°C. They were exposed constantly to 1% sucrose and after 72 h the biofilms were collected for analyses of dry weight, bacterial viability and pH. For the cytotoxicity testing, 3T3/NIH mouse fibroblasts cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS were exposed to the primers and uncured bond adhesives at concentrations ranging from 0.7 to 5 µL/mL and 1.3 to 10 µL/mL, respectively, for 24h. The cell survival was measured photometrically by the MTT assay. Genotoxicity was indicated by micronuclei formation and modification of the normal cell was analyzed by light microscopy (400x). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, followed by a multiple-comparison Student Newman-Keuls test, and Student's *t* test ($p < 0.05$). **Results:** The EA showed higher antibacterial performance than CA. For the cytotoxicity of Primer, CA was less toxic following of the other, and for bond the more toxic was AP. Regarding to genotoxicity all groups had a similar effect in primer and bond ($P < 0.05$). **Conclusion:** The EA showed good performance against *S. mutans* biofilm and its bond was the less cytotoxic. However, the EA showed genotoxicity similar to those of the other adhesives tested.

Keywords: Dental adhesives; *Butia capitata*; Essential oil; *Streptococcus mutans*; Biofilms; Cytotoxicity; Genotoxicity.

1. Introduction

The self-etch adhesive systems have as the main advantages, the simplification of the technique and reduction the postoperative sensitive.¹ However secondary caries still remains as the main reason for restoration failure in clinical trials,² hence, antimicrobial agents have been incorporated into dental adhesives as glutaraldehyde^{3,4} and 12-metacriloloxo dodecyl piridine (MDPB)⁵ and methacrylate dimethyl ammonium chloride (DMAE-CB).⁶

Essential oils from aromatic and medicinal plants are potentially useful as antimicrobial agents.^{7,8,9} The use of essential oils as antimicrobial agents presents two main characteristics: i) natural origin meaning more safety for users and environment; ii) low risk of developing microbial resistance because essential oils are mixtures of several compounds that, apparently, presents different antimicrobial activity hindering the adaptation of the microorganism.¹⁰

Among several essential oils that may be useful as antimicrobial agents, the *Butia capitata*-seed's essential oil may have a considerable potential in industrial applications because it is rich in medium-chain fatty acids (capric, lauric and myristic acids) and also long-chain fatty acids (arachidonic, palmitoleic, γ -linoleic, oleic and linoleic acids) with significant antimicrobial activity against oral bacteria¹¹ and antioxidant activity.¹²

Additional studies are needed to demonstrate that these fatty acids could be adjunctive biomolecules with potential to be incorporated into different delivery devices to treat oral infections and their associated diseases, e.g. dental caries and periodontal disease. Many methods have been described,

e.g. chewing gum, toothpaste, mouthrinse, and/or tray delivery (similar to fluoride) that would focus on the local oral delivery of these compounds.¹¹ In this study, an essential oil that is a mix of antibacterial fatty acids was incorporated to an experimental adhesive system. Some studies have concluded that whole EOs have a greater antibacterial activity than using the major components isolated,^{13,14,15} which suggests that the minor components are critical to the activity and may have a synergistic effect or potentiating influence.

‘Butiá’ or ‘coquinho-azedo’ is the name of the aromatic fruit of the *Butia capitata* palm (family Arecaceae), native from Brazil and Uruguay. This fruit is consumed *in natura* and it is widely cultivated for use in beverages, juices and ice-creams. Furthermore, the collection of the fruit plays important role in several low-income communities in Brazil. The seed is discarded in ‘butiá’^{16,17} and in this study the essential oil was recovered from the seed. The agricultural wastes are important feedstock because represent renewable sources and low cost materials.^{18,19} The ‘butiá’-seed is rich in fat (almost 57.8% of total lipid in its composition), including high content of lauric acid (42.1%), followed by oleic acid (16.9%). The saturated fatty acids predominates (78.9%), mainly the medium chain length fatty acids (n6-n12 fatty acids, 58.3%).²⁰

The content and composition of fruit seed oils is affected by the geography and local climate. However, the basic lipid profile of ‘butia’-seed oil from different regions has already been reported^{12,20} and, corroborates with the lipid composition in the ‘butia’ seed oil used in this study (Table 1).

Besides the evaluation of the antimicrobial activity of the adhesive systems, it is also important to investigate their toxicity as a prerequisite for the assessment of the biocompatibility of newly developed biomaterials

Hence, the aim of this study was to assess the anti-*Streptococcus mutans* biofilm effect and the biocompatibility, by cytotoxicity and genotoxicity test, of an experimental self-etch adhesive system containing *Butia capitata*'s seed essential oil.

2. Materials and methods

Three commercial adhesive systems, Clearfil Protect Bond (CPB) (Kuraray America), Clearfil SE Bond (CSEB) (Kuraray America) and Adper SE Plus (AP) (3M ESPE), and two experimental adhesives, one containing the *Butia capitata*'s seed oil (EA) and the other without the oil incorporation as control (CA) were used in this study. The composition and batch numbers of the materials used are listed in Table 2.

2.1. Development of an experimental self-etching adhesive

2.1.1. Primer Formulation

The primer was formulated by mixing methacrylate and acidic monomers, using water and ethanol as solvents as previously described by Lima.²¹ The pH was set to 1.5 and measured using a digital pHmeter (Analion PM, Ribeirão Preto, SP, Brazil).

2.1.2. Resin adhesive formulation

The control adhesive resin was formulated by the intensive mixing of 50 wt % Bis-GMA, 25 wt % TEGDMA, 25 wt % HEMA and initiator systems (CQ and EDAB). The experimental adhesive resin was composed of 1 mol % of *Butia Capitata*'s seeds oil.

2.1.3. *Butia capitata* seeds' essential oil and Chemicals

Butia Capitata fruits were freshly collected in May 2009 and the nuts were immediately isolated from the fruit. The nuts were dried at 40°C

temperature for 7 days. After that, the nuts were ground and the seeds (25 g) were separated and placed in a Soxhlet thimble, and continuously extracted with 180 ml of hexane in a Soxhlet apparatus at 40°C for 8 h. The resulting essential oil was washed with dichloromethane, the washes were mixed, and the remaining solvent was removed by a rotary evaporator under vacuum. At these conditions, the oil yield was found to be about 30%. The procedure was made according Brazilian Pharmacopoeia.²²

The composition of the essential oil was analyzed in gas chromatography by a Shimadzu 2010 Gas Chromatograph equipped with a Rtx-Wax polyethylene glycol capillary column (0.32 mm × 30 m).

The essential oil components were identified by comparing with FAME Chemical Standards - Sigma-Aldrich. To this analysis the Butiá fatty acids were submitted to esterification reaction with BF₃-Methanol.

Boron trifluoride (BF₃) in methanol

An aliquot of oil extract was mixed with BF₃ –methanol and heated to a maximum of 100 °C for 20 min. After cooling to ambient temperature, water and a non-polar solvent were added, vortexed, and the two phases separated by centrifugation. The upper organic phase containing the methyl esters was carefully removed to a new vial where it is removed under a stream of nitrogen gas (N₂). The remaining residue containing fatty acid methyl esters was dissolved in n-hexane prior to GC analysis.

2.2. The anti-*S. mutans* biofilm effect

S. mutans UA159 biofilms were formed in saliva-coated bovine enamel discs suspended vertically in ultrafiltered (10 kDa molecular weight cut-off membrane;

Amicon) tryptone-yeast extract broth (UTYEB) at 37°C, 10% CO₂ for 3 days and continuously exposed to 1% sucrose.²³

2.2.1. Enamel discs preparation and adhesive application

Sixty enamel discs (6 mm diameter and 2 mm thickness) were obtained from fresh bovine central incisors. A cylindrical diamond-coated drill (trephine) was used perpendicular to the buccal surface of the teeth. Dentine and enamel surfaces were polished with 400 and 800-grit silicon carbide paper, respectively. Both surfaces were planned- parallel and the dentin was completely removed. All procedures were carried out under constant water cooling. Each disc was individually placed in 1 ml of a solution containing 0.06 mM P_i and 0.08 mM Ca⁺⁺ and autoclaved.²³ After the sterilization, the discs were randomly assigned to different groups and the adhesive systems employed. The commercial adhesives were used as recommended by the manufacturers. For the experimental adhesives, the primer was applied in intermittent form for 20 s, after the solvent was volatilized the bond was applied and polymerized for 10 s. Adequate and consistent light intensity was assured by monitoring the curing light unit output using the unit's integrated light meter. In a group of enamel disc no adhesive was applied (control group = C). All specimens were tested immediately after their bonding procedures and vertically suspended on metal devices inside culture plate.

2.2.2. Biofilm growth

Streptococcus mutans UA159 colonies were transferred to UTYEB containing 1% glucose and incubated at 37°C in 10% CO₂ to reactivate the microorganisms. After 18 h of incubation, 100 µL of these reactivated bacteria were transferred to 50 mL of UTYEB containing 1% sucrose, homogenized and

2 ml of this inoculum was transferred to each well of 24-well culture plate. The discs, were individually positioned in the culture plate containing the inoculum and incubated at 37°C, under 5-10% CO₂ to allow bacterial adhesion on the acquired pellicle²⁴. Daily the biofilms on enamel disc were transferred to fresh UTYEBS containing 1% sucrose and the pH of the culture media was determined. The biofilms were grown for 72 h. After each culture media change, the biofilms on enamel slabs were washed 3 times in 0.9% NaCl. .

2.2.3. Biofilm collection

After 72 h of biofilm growth, the enamel slabs containing the biofilms were washed 3 times in 0.9% NaCl and individually transferred to microcentrifuge tubes containing 1 ml of 0.9% NaCl. The tubes were sonicated at 30 W for 30 s (Sonicator DE S500, R2D091109 Brazil) to detach the biofilms formed on the disc. Aliquots of the suspension were used to determine biofilm bacterial viability. For the bacterial viability an aliquot of 100 µl of the suspension was serially diluted in 0.9% NaCl in series up to 10⁻⁷ and 2 drops of 20 µl of each dilution were inoculated on BHI agar (BD, Sparks, USA) to determine the number of viable microorganisms.²⁵ The plates were incubated for 72 h at 37°C under 5-10% CO₂ concentration (Anaerobac - Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP, Brazil) in anaerobic jars (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda). CFU were counted and the results were expressed as CFU/mg of biofilm dry weight.²⁶

2.3. Biocompatibility

2.3.1. Primer and bond agents dilution

To test the pure form of each product, primer and bond agents were diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). After, that serial

dilutions were prepared ranging from 1.3 to 10 μ L for the bond and 5; 2,5; 1,3 and from 0.7 to 5 μ L for the primer.

2.3.2. Cell culture

The cell culture medium was DMEM was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Mouse fibroblasts of the 3T3/NIH immortalized cell line were maintained in DMEM and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ until confluence.

2.3.3. Cytotoxicity assay (MTT assay)

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. Mouse fibroblasts 3T3/NIH (1×10^4 /well) were maintained in DMEM in 96-well plates for 24h. Cytotoxicity produced by different system adhesive dilution was assessed in a 24h cell exposure time.

After removing the test product, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Then 200 μ L of DMEM with 20 μ L of MTT solution (5 mg of MTT/mL PBS) were added 1×10^4 in each well. After 5h of incubation at 37°C in darkness, the blue formazan precipitation was extracted from the mitochondria using 200 μ L/well dimethyl sulfoxide (DMSO) on a shaker for 5 minutes at 150 rpm. The absorption at 540 nm was determined spectrophotometrically. All experiments were performed three times. The same protocol was repeated for all adhesive systems.

2.3.4. Genotoxicity assay (Micronuclei test)

3T3/NIH fibroblasts (1×10^4) were cultivated in circular glass slides of 13mm diameter in 24-well plates in 400 μ L cell culture medium for 24h at 37°C

and 5% CO₂. Uncured dentin primers and bonding agents were dissolved in DMEM, and the concentration tested was 0.13µL/mL. This concentration was chosen because it provides an intermediate cytotoxicity effect. to obtain an exponential growth before their exposition to the dental adhesive.

Then, the cells were fixed in glass slides in 3:1 methanol/acetic acid for 30 min. The glass slides were dried and lysed in 1N HCl for 40 min. DNA-containing structures were stained with Schiff's reagent for 2 hours and 30 min at room temperature in darkness. Afterwards, the glass slides were rinsed in distilled water and dried again. Then, the glass slides were immersed in Fast Green for 10s and washed three times in ethanol. The light microscopic assessment of coded slides was done in 400x magnification. A total of 1000 cells per preparation were analyzed. Micronuclei were identified as DNA-containing structures in the cytoplasm, separated from the main nucleus, and with an area smaller than 1/3 of the main nucleus, according to the criteria described by Countryman and Heddle.²⁷

2.4. Statistical analysis

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for all the response variables tested and those that did not satisfy these conditions were transformed.²⁸ When significant correlation was found, the data were submitted to ANOVA, ANOVA on ranks followed by complementary tests and t-test was used to compare two groups.

RESULTS

The viable bacteria count per sample of biofilm dry weight were transformed by power 0.3 and presented differences among the groups ($p < 0.001$) as showed in Fig. 1. The experimental adhesive containing butia's oil

showed higher antimicrobial performance than the experimental control adhesive. The adhesive Adper Plus presented greater antibacterial effect when compared to the other groups, the experimental adhesive had intermediate activity.

Table 3 showed a significant effect of the type of adhesive ($p<0.001$), time of exposure of the medium ($p<0,001$) and the interaction of both ($p<0.001$) on the acidogenicity of *S. mutans* biofilms.

The pH of the culture media was statistically different among the groups, only at 24h but not after 48 and 72h. The pH values for the experimental adhesive, control adhesive and control after 24, 48 e 72 h did not differ statistically. On the other hand, the pH of the commercial adhesives in the first 24h was statistically different from 48 and 72 h.

The cell survival after exposure to the medium containing the adhesives systems are shown in Fig 2. For the Primers CA and C results were similar and the less toxic. The commercial adhesives showed to be toxic but CPB was the most toxic. For the Bonds, all groups presented toxicity, and the AP was more toxic than the other groups ($p<0.001$). When comparing CA and EA, they were statistically different ($p<0.049$), the EA showed the low toxicity. Regarding the different concentrations of Primers and Bond tested, the majority of the adhesive groups showed more toxicity at higher concentrations. However, the toxicity was similar in the Primer and Bond of AP at the different concentrations tested.

DISCUSSION

Several studies have shown that the antibacterial activity depends on the dental adhesive system formulation.^{5,6} However not only antimicrobial products

may exert this effect, but also the low pH and the presence of cytotoxic monomers^{29,30}. Manufacturers are often reluctant to reveal the complete information of their products³¹ that makes difficult to comparative with commercial products of the adhesive systems. This study analysed commercial brands of adhesive systems and a new experimental adhesive system containing an essential oil extracted from *Butia capitata*-seed.

There are many studies that evaluate the antibacterial activity of adhesives systems by methods of agar diffusion test or direct contact test^{32,33}. However, few studies evaluated the antimicrobial effect of these materials in *in vitro* models of biofilms.^{34,35} This study is the first one to evaluate the anti-*S. mutans* biofilm effect of adhesive systems on an *in vitro* static model. A standardized strain of *S. mutans* was used because this species is considered the most cariogenic microorganism in dental biofilm.³⁶

Bacterial viability of the groups EA and CA were compared and the results indicated that EA had higher antibacterial effect. This effect was attributed to the essential oil extracted from *Butia capitata* seeds which is rich in antimicrobial fatty acids, including lauric acid and oleic acid.^{11,20} Among the antimicrobial fatty acids, the lauric acid has demonstrated more antimicrobial potential.³⁷ Furthermore, the antimicrobial effect of the essential oil also could be explained because this extract cannot be polymerized into the adhesive matrix and the antibacterial effect still remained after polymerization because the molecules are leaching. Usually, the absorbed water induces the leaching process, which, in turn, produces the release of free, residual unpolymerized monomers, low polymerized.

Comparing all the groups, it is possible to observe that AP had the best performance against *S. mutans*. This result is interesting because Adper SE Plus has not been reported to have antibacterial compounds in its composition, mostly TEGMA and UDMA monomers, these monomers have toxic effect at low concentrations,^{38,39,40} and this could explain the low bacterial viability or activity with this material. Regarding the effect of CPB, some studies show that the CPB had higher antibacterial activity by the incorporation of the monomer MDPB.^{5,41} Our analysis did not have the same results of previous studies and maybe the reason might be the type of methodology used and the fact that bacteria were evaluated in planktonic form. The CPB had numerically better antimicrobial effect but it was not statistically difference from the other groups, even compared to the control that was just nail polish. This could be because biofilms are microbial communities protected by an extracellular polymer matrix of origin salivary and bacterial,^{42,43} hindering the action of antibacterial compounds when compared to planktonic models. The control group was not different because the untreated enamel surface was polished and the groups that received treatment had the polymer network irregularity, facilitating the adherence and formation of biofilm.

In relation to pH of the culture medium it was observed that in the first 24 h the pH varied in the different groups. In the CPB adhesive, the pH was closer to neutral, which is different than showed by Feuerstein.³³ It may be due to the methodology employed by the author that employes an aging process in PBS. For the 48 and 72 hours the pH decreased due to the action of *S. mutans* that are acidogenic and aciduric bacteria.³⁶ The results does not support the hypothesis that antibacterial properties of self-etch adhesives is due to low pH

of materials.^{29,30} Our results suggest that the low pH of adhesives systems should be considered as limited.^{33,40}

Cytotoxicity and genotoxicity assays have been considered a good tool for initial assessment of the effects toxic of dental materials.⁴⁴ These tests allow a careful control of the physiological and physic-chemical environment; reduce animal experimentation; are more economic; controllable and reproducible.^{44,45} In the present study, adhesive system were tested using 3T3 mouse fibroblasts, which is a well characterized and reproducible cell line.⁴⁵ Moreover, the fibroblasts are present in the periodontal apparatus and often the restorations margins are closed to the periodontium.

The cytotoxicity made by the MTT method was developed originally by Mosmann (1983) and is simple, accurate and gives reproducible results. The key component is 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide or MTT. This product has yellowish colour in solution. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, leading to the formation of purple crystals formazan, which are insoluble in aqueous solutions. The crystals are dissolved in acidified isopropanol, and the resulting purple solution is measured spectrophotometrically.⁴⁶ An increase or decrease in cell number results in a concomitant change in the amount of formazan formed, indicating the degree of cytotoxicity caused by the oxidative stress induced by the test material. MTT assay offered the opportunity to evaluate the extensive cytotoxic effects evident for the dental adhesives DBAs (CPB, CSEB, AP, EA, CA and C groups). All the compared primers, were cytotoxic because in the composition have different monomers.^{38,39,40} The AP

has low toxicity because is composed by water, colorant, surfactant and the monomer HEMA, that is moderately cytotoxic.

For the bond all had toxic effect, however the AP was more toxic possibly because contains UDMA. Previous in vitro studies have indicated that monomers such as Bis-Gma and UDMA are strongly cytotoxic to fibroblasts, whereas HEMA and TEGMA are moderately cytotoxic.^{38,39,40} when comparing the CA with EA the latter have higher cellular viability, the only difference is the presence of fatty acid in EA.

Moreover, when tissues are exposed to free radicals released by monomers adhesives, the molecular mechanisms leading to mutations induced by resin monomers are unclear at present. Nonetheless, there are at least two possibilities for the generation of DNA lesions. First, the spectrum of mutations induced by TEGDMA are similar to those caused in the genome of mammalian cells after exposure to x-rays and various chemical agents, including anticancer drugs. Second, TEGDMA and related monomers could induce mutations by a secondary mechanism via the generation of reactive oxygen species (ROS), as do agents such as ionizing radiation.⁴⁷ In this context, the micronuclei are DNA masses with the appearance of small nuclei found in the cytoplasm of cells that are capable of dividing themselves, representing a variety of segregational DNA defects.⁴⁸ Thus, the induction of micronuclei (MN) is considered an effective biomarker to provide information on the cytogenetic damage in the tissues and process associated with the induction of DNA damage.^{49,50} In this study, different results have clearly demonstrated that dental adhesives contribute to DNA damage, showing an increase in the MN frequency after cell exposure to the tested adhesives systems.

The data presented in this paper and the results of other authors' studies indicate that the genotoxicity of dentin bonding agents might be a result of the genotoxicity of various components that are released from polymerized adhesives. Thus, the intensity of the genotoxic effect of an adhesive strongly depends on its composition. As some genotoxic components of dentin bonding agents cannot be replaced by less dangerous ones, additional effort should be carried out to develop adhesives with higher monomer-polymer conversion, which would reduce the release of hazardous substances.

CONCLUSION

Despite the limitations of the present in vitro study, it can be concluded that the Butiá essential oil has similar performance compared to the commercial adhesive that has antibacterial monomers. The cytotoxicity and genotoxicity is similar to other products commonly used for this purpose.

REFERENCES

1. Tay FR, Carvalho R, Sano H, Pashley DH. Effect of smear layers on the bonding of self-etching primer to dentin. *J Adhes Dent* 2000;2(2):99-116.
2. Kidd EA. Diagnosis of secondary caries. *J Dent Educ* 2001;65(10):997-1000.
3. Schmidlin PR, Zehnder M, Gohring TN, Waltimo TM. Glutaraldehyde in bonding systems disinfects dentin in -vitro. *J Adhes Dent* 2004;6(1):61–4.
4. Felton D, Bergenholz G, Cox CF. Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. *J Dent Res* 1989;68(3):491–5.
5. Imazato S, Imai T, Russell RRB, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion promoting monomer. *J Biomed Mater Res* 1998;39(4):511–5.

6. Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F, Wang YJ. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009;90B(2):813-7.
7. Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric Food Chem.* 1995;43(11):2839–2845.
8. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94(3):223–253.
9. Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 2005;22(4):273–292.
10. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 2003;22(1): 39-44.
11. Huang CB, George B, Ebersole JL. Antimicrobial activity n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology* 2010;55(8): 555-560.
12. Sun C, Cao YZ, Huang AH. Acyl Coenzyme A preference of the glycerol phosphate pathway in the microsomes from the maturing seeds of palm, maize, and rapeseed. *Plant Physiol* 1988;88(1): 56-60.
13. Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology.* 2002; 73(1):83–92.
14. Mourey A, Canillac N (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control.* 2002; 13(4-5): 289 – 292.

15. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol* 2008; 124(1): 91-97.
16. Magalhães HM, Catão HCRM, Sales NLP, Lima NF, Lopes PSN. Health quality of *Butia capitata* seeds in the north of Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*. 2008; 38(8):2371-2374
17. Schwartz E, Fachinello JC, Barbieri RL, Silva JB (2010) [Performance of *Butia capitata* population in Santa Vitoria do Palmar]. *Rev Bras Frutic* 2010;32(3): 736-745.
18. Szentmihályi K, Vinkler P, Lakatos B, Illés V, Then M. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. *Biores Technol* 2002; 82(2):195-201.
19. Bakowska-Barczak AM, Schieber A, Kolodziejczyk P. Characterization of Canadian Black Currant (*Ribeus nigrum* L.) seed oils and residues. *J Agric Food Chem* 2009; 57(24):11528-11536.
20. Faria, J.P., Arellano D.B., Grimaldi, R., Da Silva L.C.R., Vieira, R.F., Da Silva, D.B., Agostini-Costa, T.S. [Chemical characterization of nut of *Butia capitata* var *capitata*]. *Rev Bras Frutic* 2008; 30(2): 549-552
21. Lima G da S, Ogliari FA, da Silva EO, Ely C, Demarco FF, Carreno NL, et al. Influence of water concentration in an experimental self-etching primer on the bond strength to dentin. *J Adhes Dent* 2008;10(3):167-72.
22. Farmacopéia Brasileira, 4.ed. Parte II. São Paulo: Atheneu, 2000.
23. Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res* 2010;24(2):135-41.

24. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother* 2003;52(5):782-9.
25. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods* 2001;44(2):121-9.
26. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S et al. Effect of sucrose and starch on dental biofilm formation and on dentin demineralization. *Caries Res.* 2008;42(5):380-6.
27. Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research* 1976;41(2-3):321-332.
28. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters*. New York: Wiley; 1978. 656 p.
29. Emilson CG, Bergenholz G. Antibacterial activity of dentinal bonding agents. *Quintessence Int* 1993;24(7):511–5.
30. Meiers JC, Miller GA. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers and polyacid-modified composite resins. *Oper Dent* 1996;21(6):257–64.
31. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y and Poitevin A et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007;28(26):3757–3785.
32. Paradella TC, Koga Ito CY, Jorge AO. In vitro antibacterial activity of adhesive systems on *Streptococcus mutans*, *J Adhes Dent* 2009;11(2):95-99.

33. Feuerstein O, Matalom S, Slutzky H, Weiss E. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J Am Dent Assoc* 2007;138(3):349-54.
34. Imazato S, Kuramoto A., Takahashi Y, Ebisu S, Peters C. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dental Materials* 2006;22(6):527-532.
35. Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L et al. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. *J Dent Res* 2009;88(4);372-6.
36. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in a human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50(4):353-80.
37. Nakatsuji T, Kao MC, Fang JY, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, et al. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *The Journal of Investigation Dermatology* 2009;129(10):2480-8.
38. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998;41(3):474–480.
39. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995;74(9):1602–1606.
40. Koulaouzidou EA, Helvatjoglu-Antoniades M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Antoniades D.J; Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. *Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2008;84(1):271-6.
41. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater* 2003;19(6):449-57.

42. Bowden GH, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997;11(1):81-99.
43. Marsh PD The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res* 1995;9(3):244-254;discussion 255-269.
44. Freshney I. Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biol Toxicol* 2001;17;213-230.
45. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *Journal of Dentistry* 1994;22(2):S6-11.
46. Trubiani O, Caputi S, Di Iorio D, D'Amario M, Giancola R, Di Nardo Di Maio F et al. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal* 2010;43(8):646-53.
47. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz, G, Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J. Dent Res* 2006;85(10):870-7
48. de Almeida TM, Leitao RC, Andrade JD, Becak W, Carrilho FJ, Sonohara S Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2004;150(1):16-21.
49. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research* 1999;428(1-2):271-283.
50. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetic Molecular Research* 2002;1(3):246-260.

Tables and Figures

Table 1. Fatty acid Composition of Essential oil from *Butia Capitata* seeds by gas chromatography

Compounds	%
Caprylic acid	6.17
Capric acid	13.02
Lauric acid	33.34
Myristic acid	6.55
Palmitic acid	5.40
Stearic acid	3.88
Oleic acid	20.22
Linoleic acid	4.21
Other	7.23

Table 2. References commercials, compounds and components

Dentin adhesive	Batch number	Manufacturer	Compound	Components
Clearfil Protect Bond	0072A	Kuraray medical, Okayama, Japan	Primer	10-methacryloyloxydecyl hydrogenphosphate (MDP), 12-methacryloyloxydecyl pyridinium bromide (MDPB), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), hydrophilic dimethacrylate, water
	00121A		Bond	10-methacryloyloxydecyl hydrogenphosphate (MDP), bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, N,N-diethanol-p-toluidine, silanated colloidal silica, surface treated sodium fluoride
Clearfil SE Bond	00969A	Kuraray medical, Okayama, Japan	Primer	10-methacryloyloxydecyl hydrogenphosphate (MDP), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), hydrophilic dimethacrylate, di-camphorquinone, N,N-diethanol-p-toluidine, water
	01441A		Bond	10-methacryloyloxydecyl hydrogenphosphate (MDP), bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, N,N-diethanol-p-toluidine, silanated colloidal silica
Adper SE Plus	8BH		Primer	Water, HEMA, surfactant, pink colorant.
	9BL		Bond	UDMA, TEGDMA, hydrophobic trimethacrylate (TMPTMA), HEMA phosphates, methacrylated phosphates (MHP), treated surface with zircon, camphorquinone.
Experimental Adhesive oil free (CA)		CDC-Bio* Brazil	Primer	2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), 2-methacryloyloxyethyl dihydrogen phosphate MEP, water, ethanol.
			Bond	bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), camphorquinone (CQ), Ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB)
Experimental adhesive with oil (EA)		CDC-Bio* Brazil	Bond	bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), camphorquinone (CQ), Ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB), essential oil.

*CDC-Bio; Center for the development and control of biomaterials

Table 3. pH mean values and standard deviation read through the supernatant storage medium the adhesive systems

	CPB	CSEB	AP	EA	CA	C
24h	6.3±0.7 ^{a,A}	5.7±0.6 ^{a,B}	6.1±0.7 ^{a,A}	5.3±0.0 ^{a,C}	5.3±0.0 ^{a,C}	5.4±0.3 ^{a,BC}
48h	5.2±0.4 ^{b,A}	5.3±0.1 ^{b,A}	5.3±0.1 ^{b,A}	5.3±0.1 ^{a,A}	5.2±0.0 ^{a,A}	5.2±0.0 ^{a,A}
72h	5.3±0.0 ^{b,A}	5.3±0.0 ^{b,A}	5.4±0.0 ^{b,A}	5.4±0.0 ^{a,A}	5.4±0.0 ^{a,A}	5.4±0.0 ^{a,A}

Different letters indicates significant differences between means (p <0.05). Uppercase letters different statistic among groups (row). Lowercase letters different statistic for different period of time (column).

Table 4. Frequency of micronucleated (MN) cells per 1000 cells after 24 h exposition to adhesive system.

Group	Micronuclei (Primer)	Micronuclei (bond)
CPB	19±2,8 ^{a*}	11,0±1,4 ^a
CSEB	11,5±0,7 ^a	13,5±2,1 ^a
AP	8,0±2,8 ^a	8,5±0,7 ^{a*}
AE	15,5±0,7 ^a	8,5±2,1 ^a
CA	15,5±0,7 ^a	9,0±1,4 ^a
C	7,0±1,4 ^a	7,0±1,4 ^a

Different letters indicates significant differences between means (P<0,05)

*Were MN in 900 cells

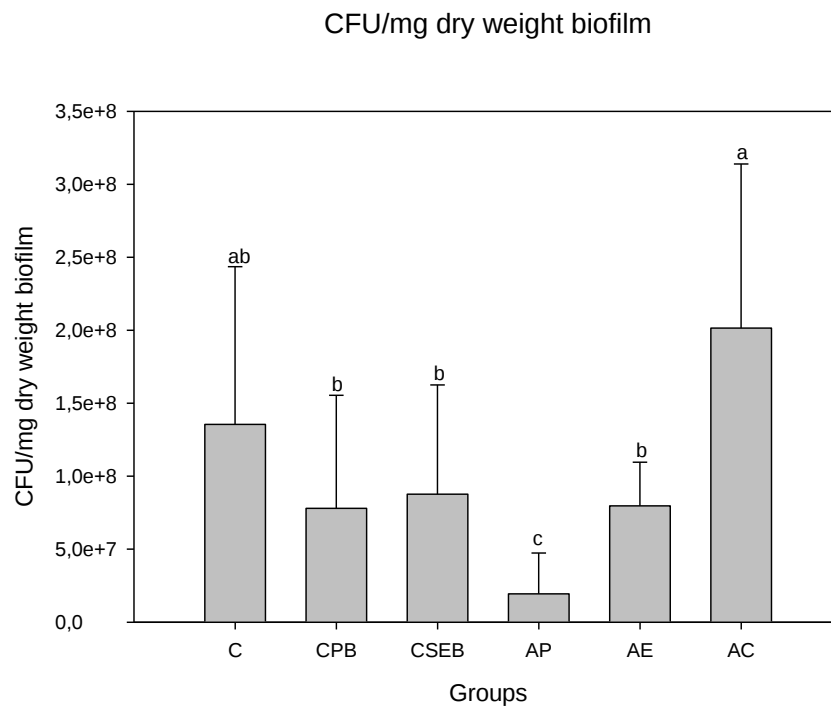


Fig 1. Bacterial viability (colonies forming units/ biofilm dry weight) on the surfaces coated with the adhesives systems. Data were transformed by power 0.3; different letters indicate differences among the groups

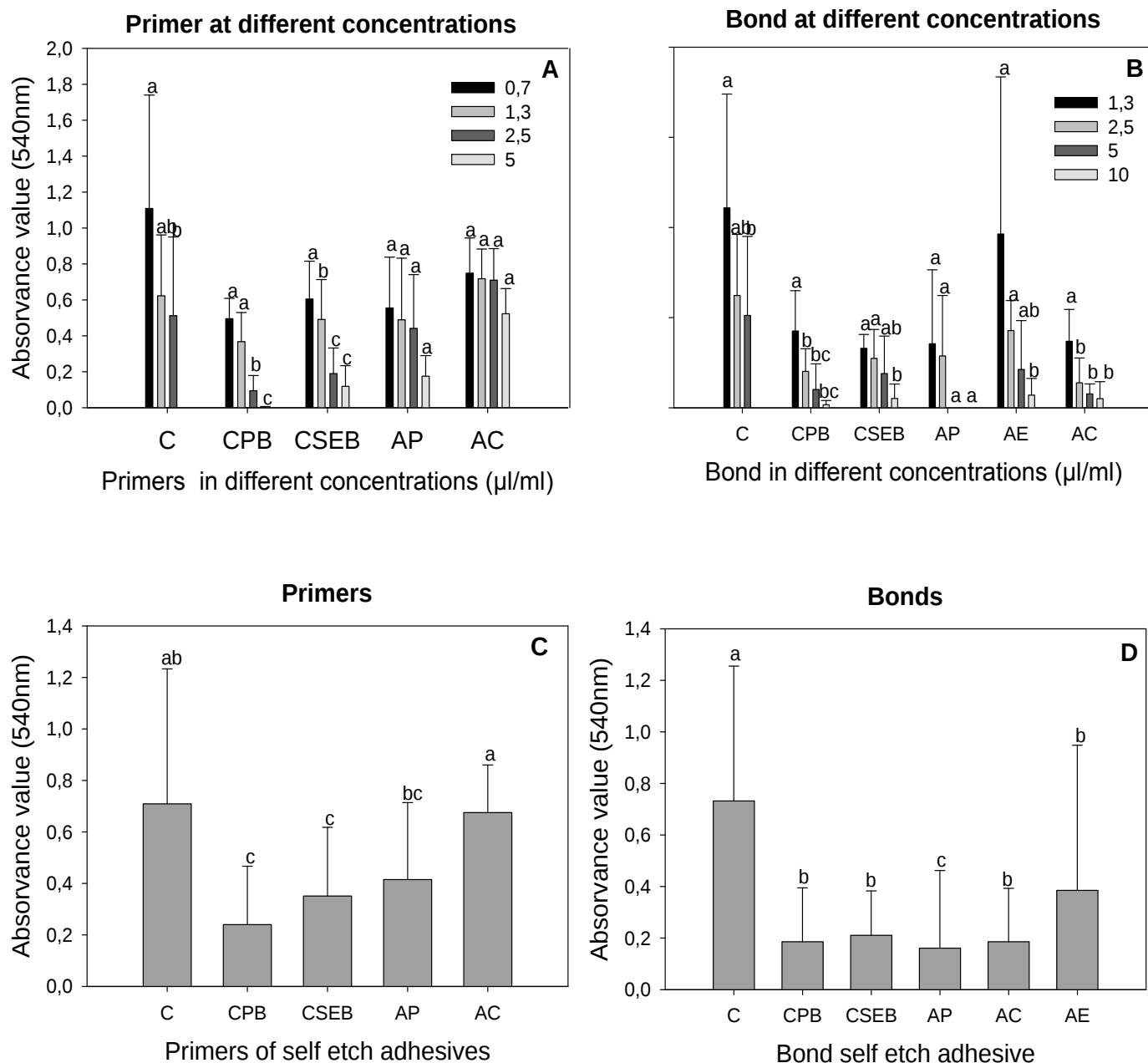


Fig 2. Cytotoxic effect of the self-etch adhesives after 24h of cell exposure. Absorbance values (mean $\pm$ SD) of the four dilutions (0,7-5 μ l/ml for the Primers and 1,3-10 μ l/ml for the Bonds). Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$).

3. ARTIGO 2

Title: Use *Butia capitata* oil as antibacterial in an experimental self-etch adhesive

Short title: Adhesive with *Butia capitata* essential oil

Sonia L. Peralta^a, Pedro H. Carvalho^b, Françoise Van de Sande^a Claudio M. P. Pereira^c, Evandro Piva^a, Rafael G. Lund^{a, b, *}

^a *Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil*

^b *Laboratory of Microbiology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil*

^c *Department of Organic Chemistry, Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, RS, Brazil*

* Corresponding author at: Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brazil. CEP: 96015-560. Tel/Fax: +55-53-3222-6690.

E-mail: rafael.lund@gmail.com (Rafael Guerra Lund)

Abstract

Objectives. To assess the antibacterial effect of an experimental adhesive system containing a vegetable essential oil in a microcosm biofilm model and its physic mechanical properties (water sorption-WS and solubility-SL, microtensile bond strength to dentin bovine- μ TBS and degree of conversion-DC).

Methods. A self-etch experimental adhesive containing *Butia capitata*'s essential oil/EA, was compared to an oil-free experimental adhesive/CA, one group without adhesive as control/C and as commercial references: Clearfil Protect Bond/CPB Clearfil SE Bond/CSEB and Adper SE Plus/AP. Biofilms were grown in defined medium enriched with mucin for three days. The antibacterial effect was estimated by microbiological culture on selective/non-selective media and the results expressed as CFU/mg of biofilm dry weight. For the μ TBS, fifty bovine incisors were randomly separated into five groups. The specimens were restored, water stored for 24h and mechanically debonded. The DC was obtained through FTIR after (20s) light curing. For the WS/SL the resin specimens had their mass weighed after immersion in water at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 7 days. Data were submitted to ANOVA and complementary test ($p<0.05$).

Results. EA showed similar effect to CPB against total microorganisms, aciduric bacteria, latobacilli and mutans streptococci. EA showed similar physical-mechanical than CA.

Significance. The self-etch adhesive containing essential oil of *Butia capitata* showed antimicrobial effect in a microcosm biofilm model and the physical-mechanical properties tested immediately were not affected, except for the μ TBS EA values that decreased after 6 month.

Keywords: Adhesive, antibacterial, biofilm, essential oil

1. Introduction

Self-etching adhesives became a considerable alternative to total etching adhesive system due to the simplification of use and reduction of technical sensibility and post-operative sensitivity. [1] Bonding strategy is based on acidic ionization in water [1] that promotes solubilisation previously to hybridization of collagen fibrils. Differently of total etching, self-etching incorporates the smear layer, and consequently some residual microorganism in hybrid layer. [2]. Different studies have generally associated this effect to the low pH value of self-etching primer [3, 4] which can be compared to the antibacterial effect of phosphoric acid used in total etch systems [5]. Some antibacterial components already added to adhesive systems were glutaraldehyde; [6, 7], 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) [8] and, recently methacrylate dimethyl ammonium chloride (DMAE-CB) [9].

The essential oils from aromatic and medicinal plants are potentially useful as antimicrobial agents and their use as medicines has been widely recognized. [10, 11, 12] *Butia capitata* is a tree which belongs to the Arecaceae family and produces an aromatic fruit consumed *in natura* and as beverages, juices and ice-creams in Brazil. [13] Butia's the essential oil could be considered a potential antimicrobial agent, because present in it's composition different fatty acids.[14] The fatty acids of long and medium-chain have significant antimicrobial activity against oral bacteria. [15]

The microcosms technique is employed as an ecosystems trying to mimic naturally formed biofilms. [16, 17, 18] For studies concerning supragingival plaque, a microcosm implies in the use of dental plaque or human saliva as source of inoculum for an *in vitro* device. [19]

The evaluation of microtensile bond strength, degree of conversion, and water sorption and solubility are some of the main physical-mechanical properties evaluated in new biomaterials.

Hence, the aim of this study was to investigate the antimicrobial effect against dental biofilm microcosms and to evaluate some physical- mechanical properties of an experimental self-etch adhesive system containing an essential oil of *Butia capitata*'s seed. The hypotheses tested were that this experimental adhesive would have a similar antimicrobial effect to the commercial adhesive systems with antimicrobial monomer in their composition without affecting the physical-mechanical properties of the material.

2. Materials and Methods

The dental adhesives tested in this study are listed in Table 1. The formulation of the experimental adhesive systems comprised a mixture of reagents. These reagents were used as received, without further purification.

2.1 Self-etching Adhesive Development

2.1.1 Primer Formulation

The primer was formulated by mixing methacrylate and acidic monomers, using water and ethanol as solvents as previously described by Lima et al, 2008. [1] The pH was set to 1.5, and read using a digital pHmeter (Analion PM, Ribeirão Preto, SP, Brazil), stabilized in the solution for 1 min before reading.

2.1.2 Adhesive resin Formulation

Control adhesive resin was formulated by the intensive mixing of 50 wt % Bis-GMA, 25 wt % TEGDMA, 25 wt % HEMA and initiator systems (CQ and

EDAB). The experimental adhesive resin was composed of 1 mol % of the essential oil from *Butia capitata*-seeds.

2.1.3. Extraction of the essential oil from *Butia capitata* seeds

Butia capitata fruits were freshly collected in May 2009 and the nuts were immediately isolated from the fruit. The nuts were dried at 40°C temperature for 7 days. After that, the nuts were ground and the seeds (25 g) were separated and placed in a Soxhlet thimble, and continuously extracted with 180 ml of hexane in a Soxhlet apparatus at 40°C for 8 h. The resulting essential oil was washed with dichloromethane, after were mixed and the remaining solvent was removed by a rotary evaporator under vacuum. At these conditions, the oil yield was found to be about 30%.The essential oil obtained was stored at 20 °C in a dark-colored container to prevent the light-sensitive decomposition.

2.2 Microcosms biofilm

The model consisted in microcosm biofilms developed in microplates where plaque-enriched human saliva was spread in enamel discs. [19, 20] Enamel discs were used as substrate (n=10) and defined medium enriched with mucin (DMM) [21], was supplemented with 1% sucrose in a semi-continuous cultivation system for 3 days.

2.2.1 Enamel Discs

Enamel discs (6.0 mm in diameter and 2.0 mm in thickness) were confectioned from bovine central incisors. A cylindrical diamond-coated trephine drill was used perpendicular to the buccal surface of the teeth. Dentine and enamel surfaces were ground with 400 and 800-grit SiC papers, respectively, until both surfaces become planned and parallel. All procedures were carried out under constant water cooling. The discs were fixed with a holder

(confectioned with orthodontic wire) and kept in a horizontal position during the experimental procedures.

2.2.2 Saliva collection

Fresh stimulated saliva was collected from a healthy volunteer following ethical approval (Brazil, University Federal of Pelotas 180/2010), who had not been under antibiotic therapy for at least one year. Fifteen mL of saliva was collected in the morning (during fasting) and the volunteer abstained from oral hygiene for 24 hours prior to collection.

2.2.3 Biofilm Microcosm Growth

Enamel discs were covered with each system adhesive primer and bond light activated for 20 s, and transferred into sterile wells (24-well tissue culture plate; TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, SU). 400 μ L of fresh homogenised saliva was dispensed onto each enamel disc. After one hour at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, the saliva was aspirated and 1.8 mL of DMM with 1% sucrose was added for 6h. After that, the specimens were washed for 10s in sterile saline and transferred to a new plate with DMM for 18h. This process was repeated for 3 days. Plates were incubated at 37°C in an environment of 5-10% CO_2 , (Anaerobac - Probac do Brasil products Bacteriological Ltda., Santa Cecília, SP, Brazil), in anaerobic jars (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda).

2.2.4 Biofilm supernatant pH readings

After growth media replacements, each well from the discarded plate had its pH recorded (Quimis 50w – Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil; V621 electrode – Analion, Ribeirão Preto, SP, Brazil).

2.2.5 Biofilm microbial composition

After the assigned experimental time of biofilm growth, the enamel disks containing the biofilms were washed 3 times in 0.9% NaCl and individually transferred to microcentrifuge tubes containing 1 ml of 0.9% NaCl. The biofilm was dispersed by vortex agitation for 30 s and then sonicated at 30 W for 30 s (Sonicator DE S500, R2D091109 Brazil) to detach the biofilms formed on the disk. The disks were carefully removed from the suspension. Aliquots of the suspension were used to determine biofilm bacterial viability.

For the bacterial viability, aliquots of 100 µl of the suspension were diluted in 0.9% NaCl in series up to 10^{-7} and 2 drops of 20 µl of each dilution were inoculated on Brain Heart Infusion and Blood Agar adjusted to pH 7.2 (for total microorganisms counts); Brain Heart Infusion adjusted to pH 4.8 (for total aciduric counts); Mitis Salivarius agar supplemented with 0.2 units of bacitracin/mL (for mutans streptococci) and Rogosa agar (for total lactobacilli) to determine the number of viable microorganisms.[22] The plates were incubated for 72 h at 37°C, 5-10% CO₂ (Anaerobac - Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP, Brazil), in anaerobic jars (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda). The numbers of colony-forming units (CFU) were counted and the results were expressed as CFU/mg of biofilm dry weight. [23] Counts on selective plates were based on colony morphology and verified by Gram-stain and cell appearance using light microscopy.

2.3 Microtensile Bond Strength (µTBS) Test

Fifty freshly extracted bovine incisors were obtained. The teeth were randomly assigned into five groups according to the adhesive system tested. At least ten teeth were used per group. The buccal enamel was removed to expose the middle dentin. The exposed dentin surface was wet polished with

600-grit SiC paper to create a standardized smear layer. After washing surface was gently dried with absorbent paper and the prepared surfaces were etched with primer under agitation for 20s. Then a single coat of each adhesive resin was applied and light-activated for 20 s. A restoration was built up incrementally using a restorative composite (Charisma, Heraeus-Kulzer, Hanau, Germany). After storage in distilled water at 37 °C for 24 h, the specimens were sectioned perpendicularly to the bonding interfaces using a cooled diamond saw at low speed (Isomet 1000, Buehler; Lake Bluff, IL, USA). Beams with a cross-sectional surface area of approximately 0.7 mm² were obtained and at least three beams per tooth were allocated to μ TBS testing (n = 20 per group). The beams were precisely measured with a digital caliper (Mitutoyo, Tokyo, Japan) and fixed to the tensile testing device. The microtensile test was performed in a mechanical testing machine (DL500; EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brazil) at a crosshead speed of 0.5 mm/min until failure. Bond strengths were calculated in MPa. After debonding, the fractured specimens were evaluated under a light microscope at 100X and 500X magnifications. Failure modes were classified as adhesive, cohesive within substrate (dentin), cohesive within adhesive resin or mixed failure.

2.4 Degree of conversion by FTIR analysis

A small drop from different bonds was placed between two polyethylene sheets and the set adapted into an appropriate sample holder. The vinyl bonds conversion was analyzed in a Fourier Transform (Prestige 21, Shimadzu Corp, Japan). Spectra from materials were collected after 20 seconds of light-activation. The light curing source XL-3000 (3M ESPE, St Paul, MN, USA) was set to light intensity of 550 mW/cm² and measured with a radiometer (Model

100, Demetron, Danbury, CT, USA). Spectra of each unpolymerized resins were also captured. The spectrum was obtained from the frequency range of 1900-1400 cm^{-1} with 24 scans at 4 cm^{-1} resolution in transmission mode. The rate of unreacted carbon-carbon double bonds (% C=C) was determined from the ratio of absorbance intensities of aliphatic C=C (peak height at 1637 cm^{-1}) against internal standard before and after curing of the specimen. The baseline method used was the same described in a previous study. [24] The aromatic carbon-carbon bond (peak height at 1608 cm^{-1}) absorbance was used as an internal standard. Degree of conversion was determined by subtracting the % C=C from 100%. The analyses were carried out in triplicate,.

2.5 Water sorption and solubility

Water sorption and solubility were determined according to the ISO 4049:2000 specification, with adaptations regarding the sample's dimension.(Malacarne) Ten disc-shaped specimens, were fabricated in an plastic mold between two glass slides covered with polyethylene film. Specimens were 6.0 mm in diameter and 1.0 mm in thickness. They were irradiated with a halogen light-activation unit. Immediately after polymerization, the specimens were placed in a desiccator containing freshly dried silica gel and calcium chloride. After 24 h they were removed, stored in a desiccator at 23°C for 1 hour and weighed with a precision balance of 0.01 mg (Gehaka, Brazil).This cycle was repeated until a constant mass (m_1) was obtained. Thickness and diameter of the specimens were randomly measured at five points using a digital caliper, rounded to the nearest 0.01 mm, and these measurements were used to calculate the volume (V) of each specimen (in mm^3). The discs were immersed in distilled water at 37°C for 7 days, then

removed, blotted dry and weighed (m_2). After, the specimens were again dried inside a desiccator and weighed daily for record third constant mass (m_3) (as previously described). For each disc, the data of water sorption (WS) and solubility (SL) were calculated using the following formulae:

$$WS = (m_2 - m_3) / V \quad SL = (m_1 - m_3) / V$$

2.6 Statistical analysis

The equality of variances and normal distribution of errors were checked for all response variables tested and those that not satisfy these conditions were submitted to transformations as an attempt to fulfill parametric assumptions. To viable bacteria counts One-Way ANOVA and complementary test (Fisher SLD) with transformed data in $\log_{10}$ were used. Two-Way ANOVA (time and adhesive) was used for the acidogenicity, and were used for the ANOVA and complementary test mechanical properties were used. Sigma Stat for Windows Software®, Version 3.5 was set to a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$).

3. Results

Fig. 1 shows the numbers of viable bacteria counted in this study. The EA was different than CA but similar to the other groups for the viable count of total microorganisms ($p=0.045$). The lower values of aciduric bacteria were found in the biofilms of EA and CPB, demonstrating similar behavior regarding their antimicrobial capability ($p = 0.016$). For the analysis of total lactobacilli load in the biofilms it was found that the EA showed similar antibacterial effect to CSB, CPB and CA ($p = 0.030$). For the viable counts of mutans streptococci it was observed that all groups showed similar levels of mutans streptococci in their biofilms ($p = 0.238$).

The mean values and the standard deviations of the pH readings for the different dental adhesives are expressed in Table 2. A significant effect for the factors: adhesive, medium time and the interaction of them ($p < 0.001$) was observed. Six hours after sucrose exposure, the pH of CPB was higher in comparison with the other groups. After 24h, there were no differences among the groups.

The values of microtensile bond strength are expressed in Table 3. The factors: adhesive ($p < 0.001$), storage time ($p < 0.001$) and the interaction between them ($p < 0.001$) were statistically significant. The μ TBS values after 24h was higher for the EA and the CPB. However, after 6 months, there was a decrease in the μ TBS value of the EA, and the higher value was obtained for the CA.

The DC values (Means+SD), expressed in percentage, are presented in the Table 4. They demonstrate that AP had the highest degree of conversion percentage from monomers to polymers, followed by the EA, CA and CPB that showed similar results.

The results of water sorption and solubility are also summarized in Table 4. CSEB showed the lowest water sorption and AP the highest ($p < 0.001$). Otherwise, the lowest solubility values were observed for EA and CA. ($p = 0.001$).

4. Discussion

The hypothesis was accepted, thus it was assumed no differences in the antimicrobial effect between the experimental adhesive with *Butia capitata*-seeds essential oil and the other commercial adhesive systems, especially the CPB, which contains an antimicrobial monomer in its composition. Furthermore,

the experimental adhesive has similar physical-mechanical properties than other adhesives which have an antibacterial monomer in their composition.

There are few studies that evaluated the antibacterial activity of adhesive systems in biofilms or multiple species models. [25, 26] In the present study, the antibacterial activity of this experimental adhesive was compared to other commercial adhesives. Several studies investigated the antibacterial activity of some adhesive systems. [27, 28, 29]. However, this is the first *in vitro* microcosm dental biofilm model, with a semi-continuous sucrose exposure, to evaluate the anti-biofilm effect of self-etch adhesive systems. The microcosms methodology is more complex and more precise than those *in vitro* biofilm assays with single species, because the proportions of species detected in the microcosm community were similar to those observed in supra-gingival plaque.[30]

The highest values of total viable microorganisms were shown for CA, and the other groups showed similar antimicrobial activity. In the C group the low amount of total viable bacteria grown in the biofilm could be explained because the untreated enamel discs had polished surfaces that difficult the adherence of microorganisms. The groups that received adhesive application showed irregularity, due the polymer network that may facilitate the bacteria adherence and biofilm formation. The antibacterial effect of the EA in comparison with its control (CA) could be explained because the essential oil from the seeds of *Butia capitata* has different antimicrobial fatty acids in its composition, such as lauric acid, oleic acid and linoleic acid and palmitoleic acid, [13, 31, 32] Lauric acid is one of the most active saturated fatty acid present in the *B. capitata* essential oil and the palmitoleic acid is the main

unsaturated fatty acid.[33] The antimicrobial effect of the EA, which contains this essential oil, could be explained because this extract when mixed with the other monomers for the formulation of EA cannot be polymerized into the adhesive matrix. Hence, the antibacterial effect can persist after the polymerization because the fatty acids molecules are leached. Usually, the absorbed water induces the leaching process, which, in turn, produces the release of residual un-polymerized monomers and low polymerized polymer molecules. In this study, the EA showed significant water sorption similar to the CPB, an adhesive that has 12-MDPB.

Interestingly several studies showed the higher antibacterial activity attributed to the 12-MDPB monomer. [8, 34, 35] In the present study have different results compared to the literature, maybe because the type of methodology used in this *in vitro* study is different than other studies testing adhesive systems in planktonic models or single species biofilm single species. The formation of oral biofilms on hard surfaces is a complex process, involving salivary pellicle formation and adsorption to the surface, passive transport of bacteria to the pellicle surface, co-adhesion, and multiplication. Bacterial cells in biofilms are known to be less susceptible to antimicrobials than planktonic microorganisms. [36]

Curiously, viable counts of mutans streptococci grown in the biofilms of the different groups were similar, in contrast with the other numbers of viable bacteria determined in this study. In the analyses of total lactobacilli load in the biofilms, it was found that EA showed similar antibacterial effect to CSB, CPB and CA ($p = 0.030$).The similarity in the results could be because the CPB has the antibacterial monomer MDPB [8], the CSEB has 10-MDP that could exert an

effect antibacterial [28] and the EA tested in this study has an essential oil rich in fatty acids. [31, 32] Unpublished data showed that AP had cellular effect cytotoxic in fibroblast, which could explain its antimicrobial effect in this study. [37]

In the majority of viable bacteria counted in the biofilms, including the aciduric bacteria, the EA demonstrated similar behaviour to CPB, which is interesting because we are testing an experimental adhesive which contains natural oil with similar antibacterial properties than a standard antimicrobial self-etch adhesive.

In relation to the acidogenicity of the biofilms grown in the culture media, it was observed that after six hours the pH reduced in the different groups, but CPB showed the highest values. This could be due to the presence fluoride in the formulation of CPB [38, 39], that influenced the pH values, [40], but curiously at 24h the CPB presented the lower pH value. After 24h, the pH were similar in the different groups and the results found is not consistent with the hypothesis of some authors which suggests that the antibacterial properties of self-etch adhesive is due to them the low pH of materials [2, 4]. Our results showed that the low pH of adhesives systems might be considered as limited. [27, 41]

Most dental adhesive systems currently available on the market show favorable immediate bonding, but the stability of the bonded interfaces still causes major concerns. [42] Our results showed that at 24h the performance of the EA is similar to CA, but after 6 month the bond strength values suffered a significant reduction over time ($p < 0.05$) maybe because of the lixiviation process. However, the μ TBS values of the CPB after 24h and 6 months were

statistically similar ($p>0,05$). This could be because the incorporation of fluoride to the adhesive resins increases the durability of the dentin bond. Several studies proved that the bond strength of systems containing fluoride did not decrease after long term water storage, whereas the bond strength of comparable resins without fluoride decreased during the same time of immersion. [43]

In the test of degree conversion, the incorporation of an essential oil into an experimental adhesive not influenced in the results, maybe because he minimal amount added, and the characteristic of fatty acids which have long hydrophobic chains and hydrophilic carboxyl groups. For the CPB, our results confirm the Imazato's findings [34] that showed incorporation of the antibacterial monomer (MDPB) has no effect in the bond strength of the adhesive to dentin and the degree of conversion of this material.

For the test of water sorption the EA and CPB had similar performance. Yet for the solubility, the experimental adhesives (EA and CA) had the lower values. Based on the results, the incorporation of the essential oil did not interfere in the deterioration of this material. This could explained because the most fatty acids had long hydrophobic chains that not absorb water.

5. Conclusion

The experimental self-etch adhesive with an essential oil of *Butia capitata* showed an antimicrobial effect in microcosm biofilm similar to an antimicrobial adhesive, and its physical-mechanical properties tested immediately were not affected, excepted for the μ TBS test whose EA values decreased after 6 month regarding its control, but showed similar satisfactory behavior than the other adhesives.

References

- [1] Lima Gda S, Ogliari FA, da Silva EO, Ely C, Demarco FF, Carreno NL, Petzhold CL, Piva E. Influence of water concentration in an experimental self-etching primer on the bond strength to dentin. *J Adhes Dent* 2008;10:167-72.
- [2] Cehreli ZC, Stephan A, Sener B. Antimicrobial properties of self-etching primer-bonding systems. *Oper Dent* 2003;28:143-8.
- [3] Emilson CG, Bergenholz G. Antibacterial activity of dentinal bonding agents. *Quintessence Int* 1993;24:511–5.
- [4] Meiers JC, Miller GA. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers and polyacid-modified composite resins. *Oper Dent* 1996;21:257–64.
- [5] Settembrini L, Boylan R, Strassler H, Scherer W. A comparison of antimicrobial activity of etchants used for total etch technique. *Oper Dent* 1997;22:84–8.
- [6] Schmidlin PR, Zehnder M, Gohring TN, Waltimo TM. Glutaraldehyde in bonding systems disinfects dentin in -vitro. *J Adhes Dent* 2004;6:61–4.
- [7] Felton D, Bergenholz G, Cox CF. Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. *J Dent Res* 1989;68:491–5.
- [8] Imazato S, Imai T, Russell RRB, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion promoting monomer. *J Biomed Mater Res* 1998;39:511–5.
- [9] Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F, Wang YJ. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009;90B:813-7.

- [10] Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric Food Chem.* 1995;43:2839–2845.
- [11] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94:223–253.
- [12] Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 2005;22:273–292.
- [13] Magalhães HM, Catão HCRM, Sales NLP, Lima NF, Lopes PSN. Health quality of *Butia capitata* seeds in the north of Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural.* 2008; 38(8):2371-2374
- [14] Faria JP, Arellano DB, Grimaldi R, Da Silva LCR, Vieira RF, Da Silva DB et al. Caracterização Química da amêndoa de coquinho-azedo. *Rev Bras Frutic* 2008;30:549-552.
- [15] Sun C, Cao YZ, Huang AH. Acyl Coenzyme A preference of the glycerol phosphate pathway in the microsomes from the maturing seeds of palm, maize, and rapeseed. *Plant Physiol* 1988;88(1): 56-60.
- [16] McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol.* 2009;69:99-132.
- [17] Roeselers G, Zippel B, Staal M, van Loosdrecht M, Muyzer G. On the reproducibility of microcosm experiments - different community composition in parallel phototrophic biofilm microcosms, *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;58:169-78.

- [18] Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. *Caries Res.* 2009;43(2):97-102.
- [19] Wimpenny JW. The validity of models, *Adv Dent Res.* 1997;1:150-9.
- [20] Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:73-79
- [21] Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* 2001;46:477-86
- [22] Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods* 2001;44:121-9.
- [23] Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S et al. Effect of sucrose and starch on dental biofilm formation and on dentin demineralization. *Caries Res.* 2008;42:380-6.
- [24] Ogliari FA, de Sordi ML, Ceschi MA, Petzhold CL, Demarco FF, Piva E. 2,3-Epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. *J Dent.* 2005;34:472-7.
- [25] Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater.* 2006;22:527-532.
- [26] Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L et al. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. *J Dent Res* 2009;88:372-6.
- [27] Feuerstein O, Matalom S, Slutzky H, Weiss E. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J Am Dent Assoc* 2007;138:349-54.

- [28] Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro antibacterial activity of adhesive systems on *Streptococcus mutans*. J Adhes Dent 2009;11:95-9.
- [29] Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. Oper Dent. 2010;35:448-53.
- [30] Newman M, Nisengard R. (1988). Oral microbiology and immunology, p.326, Saunders Co. Philadelphia.
- [31] Nakatsuji T, Kao MC, Fang JY, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, Huang CM. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. J Invest Dermatol 2009;129:2480-8.
- [32] Huang CB, George B, Ebersole JL. Antimicrobial activity n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. Arch Oral Biol 2010;55: 555-560.
- [33] Wille JJ, Kydonieus A. Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2003;16:176-87.
- [34] Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RRB, McCabe JF. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. J Dent Res. 1997;76:768-772.
- [35] Imazato S, Imai S, Russell RR, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and adhesion-promoting monomer. J Biomed Mater Res. 1999;20:899-903.

- [36] Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1461–1468.
- [37] Peralta SL, Carvalho PHA, Vásquez RAC, Pereira CMP, Cury JA, Piva E, Lund RG. The anti-Streptococcus mutans biofilm effect and biocompatibility of an experimental self-etching adhesive with a vegetable oil. *Archives of Oral Biology*. *Artigo a ser submetido à publicação.*
- [38] Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater*. 2005;21:895-910.
- [39] Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y and Poitevin A et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007;28:3757–3785.
- [40] Lammers PC, Borggreven JM, Driessens FC. Influence of fluoride and pH on in vitro remineralization of bovine enamel. *Caries Res*. 1992;26:8-13.
- [41] Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater* 2003;19:449-57.
- [42] Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface, *Dent Mater*. 2008;24:90–101.
- [43] Nakajima M, Okuda M, Ogata M, Pereira PNR, Pereira PNR, Tagami J, et al. The durability of a fluoride-releasing resin adhesive system to dentin. *Oper Dent* 2003;28:186–92.

Figures and tables

Table 1. References commercials, compounds and components

Dentin adhesive	Batch number	Manufacturer	Compound	Components
Clearfil Protect Bond	00072A	Kuraray medical, Okayama, Japan	Primer	10-methacryloyloxydecyl hydrogenphosphate (MDP), 12-methacryloyloxydecyl pyridinium bromide (MDPB), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), hydrophilicdimethacrylate, water
	00121A		Bond	10-methacryloyloxydecyl hydrogenphosphate (MDP), bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), hydrophobicdimethacrylate, di-camphorquinone,N,N-diethanol-p-toluidine, silanated colloidsilica, surface treated sodium fluoride
Clearfil SE Bond	00969A	Kuraray medical, Okayama, Japan	Primer	10-methacryloyloxydecylhydrogenphosphate (MDP), 2-hydroxyethyl methacrylate(HEMA), hydrophilic dimethacrylate,di-camphorquinone,N,N-diethanol-p-toluidine, water
	01441A		Bond	10-methacryloyloxydecyl hydrogenphosphate (MDP), bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), hydrophobicdimethacrylate, di-camphorquinone,N,N-diethanol-p-toluidine, silanated colloidsilica
Adper SE Plus	8BH		Primer	Water, HEMA, surfactant, pink colorant.
	9BL		Bond	UDMA, TEGDMA, hydrophobic trimethacrylate (TMPTMA), HEMA phosphates, methacrylated phosphates (MHP), treated surface with zircon, camphorquinone.
Experimental Adhesive oil free (CA)		CDC-Bio* Brazil	Primer	2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), 2-methacryloyloxyethyl dihydrogen phosphate MEP, water, ethanol.
			Bond	bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), camphorquinone (CQ),Ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB)
Experimental adhesive with oil (EA)		CDC-Bio* Brazil	Bond	bis-phenol A diglycidylmethacrylate (Bis GMA), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), camphorquinone (CQ), Ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB), essential oil.

*CDC-Bio; Center for the development and control of biomaterials

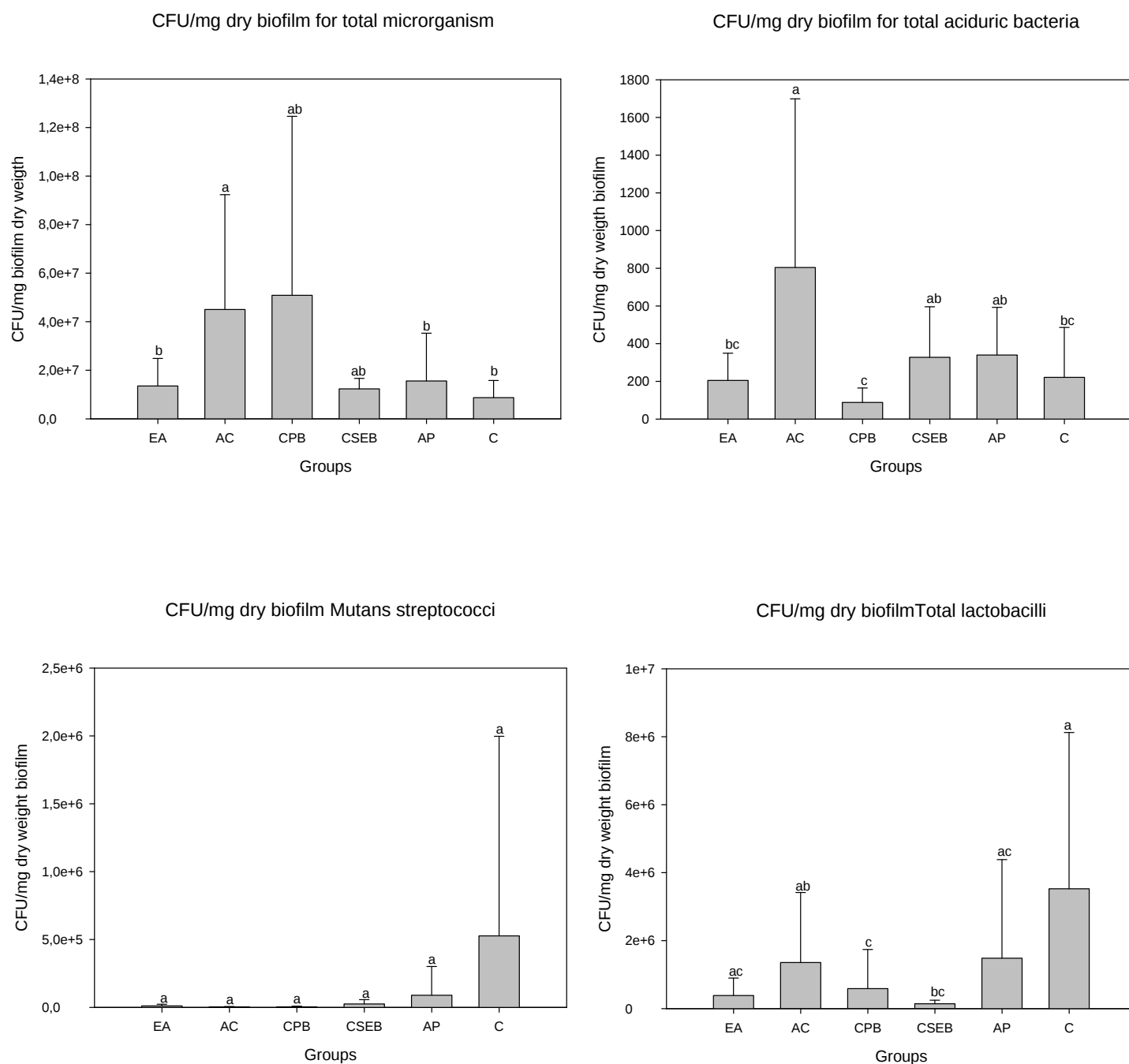


Fig. 1 – Means of viable bacteria (CFU/mg dry weight) in the biofilms grown for 72h (n=10). Data were transformed by $\log_{10}$, different letters indicate statistically significant.

Table 2. The pH mean values and standard deviations read through the supernatant storage medium of each adhesive system)

	6h	24h	30h	48h	54h	72h
EA	4.5±0.4 ^{Cc}	7.6±0.3 ^{ABa}	4.2±0.1 ^{Ad}	7.2±0.1 ^{Ab}	4.2±0.0 ^{Ad}	7.2±0.2 ^{Ab}
CA	4.3±0.1 ^{Cc}	7.7±0.2 ^{Aa}	4.2±0.1 ^{Ac}	7.3±0.1 ^{Ab}	4.2±0.0 ^{Ac}	7.3±0.2 ^{Ab}
CPB	6.1±0.8 ^{Ab}	7.3±0.2 ^{Ba}	4.4±0.9 ^{Ac}	7.2±0.1 ^{Aa}	4.3±0.8 ^{Ac}	7.2±0.3 ^{Aa}
CSEB	4.5±0.3 ^{Cb}	7.5±0.3 ^{ABa}	4.1±0.1 ^{Ac}	7.2±0.0 ^{Aa}	4.2±0.0 ^{Ac}	7.2±0.3 ^{Aa}
AP	5.0±0.4 ^{Bc}	7.8±0.2 ^{Aa}	4.1±0.1 ^{Ad}	7.3±0.0 ^{Ab}	4.1±0.0 ^{Ad}	7.3±0.2 ^{Ab}
C	4.4±0.2 ^{Cc}	7.6±0.4 ^{ABa}	4.3±0.1 ^{Ac}	7.2±0.1 ^{Ab}	4.3±0.0 ^{Ac}	7.1±0.3 ^{Ab}

Different superscript capital letters indicate statistically significant differences in rows. Different lowercase letters indicate statistically significant differences in columns (p <0.05).

Table 3. Microtensile Bond Strength (MPa), means and standard deviation by 24 hours and 6 month and number of premature failure [*].

	24 h	6 month
EA	41.5±12 ^{Aa}	29.8±12 ^{Bb}
CA	40.5±12 ^{Aa}	40.3±15 ^{Aa}
CPB	31.2±6 ^{Ba}	34.4±9 ^{ABa}
CSEB	29.9±10 ^{Ba}	27.7±13 ^{Ba}
AP	24.7±11 ^{Ba}	9.9±5 ^{Cb} [10%]*

Different superscript capital letters indicate statistically significant differences in columns. Different lowercase letters indicate statistically significant differences in rows (p <0.05).

* The number of premature failures was showed in AP.

Table 4. Degree conversion (%), water sorption and solubility means and standard deviation ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) for each self-etch adhesive

	Degree conversion (n=3)	Water sorption (n=10)	Solubility (n=10)
EA	65.7 $\pm$ 4.0	78.0 $\pm$ 3.4 ^b	-5.12 $\pm$ 1.4 ^c
CA	62.2 $\pm$ 2.8	76.0 $\pm$ 4.7 ^b	-6.02 $\pm$ 2.6 ^c
CPB	68.2 $\pm$ 4.7	77.6 $\pm$ 5.2 ^b	-2.85 $\pm$ 3.6 ^b
CSEB	62.7 $\pm$ 9.4	66.6 $\pm$ 5.8 ^c	-2.49 $\pm$ 2.1 ^b
AP	79.6 $\pm$ 14.2	136.7 $\pm$ 6.8 ^a	15.8 $\pm$ 8.0 ^a

Analyses per column. Values are means and standard deviation. Different superscript letters indicate statistically significant differences ($p < 0,05$)

4. CONCLUSÕES

O desempenho do sistema adesivo experimental contendo óleo essencial extraído das sementes de *Butia Capitata* apresentou efeito antimicrobiano, biocompatibilidade e propriedades físico-mecânicas imediatas semelhantes às aquelas obtidas pelas marcas comerciais utilizadas como referências para comparação. Entretanto, após 6 meses observa-se uma diminuição dos valores de resistência de união à dentina bovina do adesivo experimental contendo o óleo quando comparado com o adesivo controle. No entanto, este apresentou um comportamento similar aos demais adesivos testados.

Portanto, a incorporação de óleos essenciais pode ser uma alternativa ecológica e sustentável para utilização em materiais empregados em Odontologia.

5. REFÊRENCIAS

AIRES, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; TENUTA, L.M.A.; KLEIN, M.I.; KOO, H.; DUARTE, S et al. Effect of sucrose and starch on dental biofilm formation and on dentin demineralization. **Caries Res.** v.5, p.380-6, 2008.

BAKOWSKA-BARCZAK, A.M.; SCHIEBER, A.; KOLODZIEJCZYK, P. Characterization of Canadian Black Currant (*Ribes nigrum* L.) seed oils and residues. **J Agric Food Chem**, v.24, p.11528-11536, 2009.

BOX, GEP.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. New York: Wiley; 656 p.1978.

BOWDEN, G.H.; LI, Y.H. Nutritional influences on biofilm development. **Adv Dent Res.** v.1, p.81-99,1997.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO DORIGO E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface, **Dental Materials**, v.24, p.90-101. 2008.

BRUNTHALER, A.; KONIG, F.; LUCAS, T.; SPERR, W.; SCHEDLE, A. Longevity of direct resin composite restorations in posterior teeth, **Clin Oral Investig**, v.2,p.63-70, 2003.

BURKE, FM.; RAY, N.J.; MCCONNELL, R.J. Fluoride-containing restorative materials, **International Dental Journal**, v.56, p.33-43, 2006.

BURT, S, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int J Food Microbiol**, v.3, p.223–253, 2004.

BUTTOW, M. Etnobotânica e caracterização molecular de *Butia* sp. 32 F. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A.; CURY, J.A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Braz Oral Res.** v.2, p.135-41, 2010.

CEHRELI, ZC.; STEPHAN, A.; SENER, B. Antimicrobial properties of self-etching primer-bonding systems. *Oper Dent*, v.2, p.143-8, 2003.

COUNTRYMAN, P.I.; HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research.** v.3, p.321-332, 1976.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G, The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.1, p.39-44, 2003.

DAUGELA, P.; OZIUNAS, R.; ZEKONIS, G. Antibacterial potential of contemporary dental luting cements, **Stomatologija**, v.10, p.16-21, 2008.

DE ALMEIDA, T.M.; LEITAO, R.C.; ANDRADE, J.D.; BECAK, W.; CARRILHO, F.J.; SONOHARA, S Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics** v.1, p.16-21, 2004.

DE CARVALHO, F.G.; PUPPIN-RONTANI RM.; SOARES, LE.; MARTIN, AA.; NOCITI-JUNIOR, FH. Mineral distribution and CSLM analysis of secondary caries inhibition by fluoride/MDPB-containing adhesive system after cariogenic challenges. **Journal of Dentistry**, v.37, p307, 2009.

DE MUNCK, J.; VAN MEERBEEK, B.; YOSHIDA, Y.; INOUE, S.; VARGAS, M.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. **Journal Dental Research**, v.82, n.2, p.136-40, 2003.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEM, M.; VAN MEERBEEK, B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results, **Journal Dental Research**, v.84, n.2, p.118-32, 2005.

DRAKE, D.R.; BROGDEN, K.A.; DAWSON, D.V.; WERTZ, P.W. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface, **Journal Lipid Research**, v.1, p.4-11, 2008.

DUARTE, M.C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants, **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

EMILSON, CG.; BERGENHOLZ, G. Antibacterial activity of dentinal bonding agents. **Quintessence Int**, v.7, p.511–5, 1993.

FARIA, J.P.; ARELLANO, D.B.; GRIMALDI, R.; DA SILVA, L.C.R.; VIEIRA, R.F.; DA SILVA, D.B.; AGOSTINI-COSTA, T.S. [Chemical characterization of nut of *Butia capitata* var *capitata*]. **Rev Bras Frutic**. v.2, p.549-552, 2008.

FELTON, D.; BERGENHOLZ, G.; COX, C.F. Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. **J Dent Res**, v.3, p.491–5, 1989.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**. v.1-2, p.271-283, 1999

FERNÁNDEZ, M.R.; CARVALHO, R.V.; OGLIARI, F.A.; BEIRA, F.A.; A. ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth, **International Endodontic Journal**, v.43, p.102-108, 2010.

FEUERSTEIN, O.; MATALOM, S.; SLUTZKY, H.; WEISS, E. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **Journal of the American Dental Association**, v.138, n.3, p.349-54, 2007.

FONTES, S.T.; OGLIARI, F.A.; LIMA, G.S.; BUENO, M.; SCHNEIDER, L.F.; PIVA, E. Tetrahydrofuran as alternative solvent in dental adhesive systems. **Dental Materials**, v.25, p 1503-8.,2009.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biol Toxicol**, p.213-230, 2001.

GEORGEL, P.; CROZAT, K.; LAUTH, X.; MAKRANTONAJI, E.; SELTMANN, H.; SOVATH, S.; HOEBE, K.; DU, X.; RUTSCHMANN, S.; JIANG, Z, BIGBY, T.; NIZET, V.; ZOUBOULIS, C.C.; BEUTLER B. A toll-like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with gram-positive bacteria, **Infection and Immunity**, v.8, p.4512-21, 2005.

GEURTSSEN, W.; LEHMANN, F.; SPAHL, W.; LEYHAUSEN, G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. **J Biomed Mater Res**. v.3,p.474–480, 1998.

GILL, A.O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R.A, Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, v.1, p.83–92, 2002.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int JFood Microbiol*, v.1, p.91-97, 2008.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **J Microbiol Methods**, v.2, p.121-9, 2001

HOLLEY, R.A.; PATEL, D, Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiol**, v.4, p.273–292, 2005.

HUANG, C.B.; GEORGE, B.; EBERSOLE, J.L, Antimicrobial activity n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, v.8, p.555-560, 2010.

IMAZATO, S.; IMAI, T.; RUSSELL, R.R.B.; TORII, M.; EBISU, S, Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion promoting monomer. *J Biomed Mater Res*, v.4, p.511–5, 1998.

IMAZATO S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems, **Dental Materials**, v.6, p.449.459, 2003.

IMAZATO, S.; KURAMOTO, A.; TAKAHASHI, Y.; EBISU, S.; PETERS, C. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. **Dental Materials**, v.22, p.527.532, 2006.

ISO 4049, Dentistry-Polymer-based filling, restorative and luting materials, 2000.

KABARA, J.J.; SWIECZKOWSKI, D.M.; CONLEY, A.; TRUANT, J,P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents, **Antimicrob Agents Chemother**, v.1, p.23-8, 1972.

KIDD, EA. Diagnosis of secondary caries. **J Dent Educ**, v.10, p.997-1000, 2001.

KIELBASSA, A.M.; SCHULTE-MONTING, J.; GARCIA-GODOY, F.; MEYER-LUECKEL H. Initial in situ secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials, **Operative Dentistry**, v.28, p.765-72, 2003.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C, Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric Food Chem*, v.11, p.2839–2845, 1995.

KOO, H.; HAYACIBARA, M.F.; SCHOBEL, B.D.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **J Antimicrob Chemother.** v.5, p.782-9, 2003.

KOULAOUZIDOU, EA.; HELVATJOGLU-ANTONIADE, M.; PALAGHIAS, G.; KARANIKA-KOUMA, A.; ANTONIADES, D. Cytotoxicity of dental adhesives in vitro, **European Journal of Dentistry**, v.1, p.3-9, 2009.

LI, F.; CHAI, ZG.; SUN, MN.; WANG, F.; MA, S.; ZHANG, L.; FANG, M.; CHEN, JH. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. **Jounal of Dental Research**, v.4, p.372, 2009.

LOPES, R. Caracterização do óleo da polpa de *Butiá capitata*. II Simpósio Brasileiro de recursos genéticos. Novembro de 2008; Brasília - DF: p. 2005.

MAGALHÃES, H.M.; CATÃO, H.C.R.M.; SALES, N.L.P.; LIMA, N.F.; LOPES, P.S.N. Health quality of *Butia capitata* seeds in the north of Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.8, p.2371-2374, 2008.

MALACARNE, J.; CARVALHO, R.M.; de GOES, M.F.; SVIZERO, N.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; YIU, C.K.; CARRILHO, M. **Dental Materials**, v.2, p. 973-980, 2006.

MARCZUK-KOLADA, G.; JAKONIUK, P.; MYSTKOWSKA, J.; LUCZAJ-CEPOWICZ, E.; WASZKIEL, D.; DABROWSKI, J.R.; Fluoride release and antibacterial activity of selected dental materials. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej** (Online), v.60, p.416, 2006.

Marsh, P.D. The role of microbiology in models of dental caries. **Adv Dent Res** v.3, p.255-269, 1995.

MARTINEZ, M.J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZALEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p.171-174, 1996.

MEIERS, J.C.; MILLER, G.A.; Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers and polyacid-modified composite resins. **Oper Dent**, v.6, p.257–64, 1996.

MORAES, R.R.; CORRER-SOBRINHO L.; SINHORETI, MA.; PUPPIN-RONTANI, RM.; OGLIARI, F.A.; PIVA, E. Light-activation of resin cement through ceramic: relationship between irradiance intensity and bond strength to dentin. **Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials**, v.1, p.160-5, 2008.

MOUREY, A.; CANILLAC, N, Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v.5, p.289 – 292, 2002.

NAKATSUJI, T.; KAO, M.C.; FANG, J.Y.; ZOUBOULIS, C.C.; ZHANG, L.; GALLO, R.L.; HUANG, C.M. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris, **The Journal of Investigation Dermatology**, v.10, p.2480-8, 2009.

PARADELLA, T.C.; KOGA –ITO, C.Y.; JORGE, A.O, In vitro antibacterial activity of adhesive systems on *Streptococcus mutans*, **Journal of Adhesive Dentistry**, v.11, p.95-99, 2009.

PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R.M. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging, **Journal of Dental Research**, v.21, p.83, 2004.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genetic Molecular Research**, v.3,p.246-260, 2002.

RATANASATHIEN, S.; WATAHA, J.C.; HANKS, C.T, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **J Dent Res**. v.9, p.1602–1606, 1995.

ROSSATO, M. Recursos genéticos de palmeiras nativas do gênero Butia do Rio Grande do Sul. 2007. 136 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SCHMIDLIN, P.R.; ZEHNDER, M.; GOHRING, T.N.; WALTIMO, T.M. Glutaraldehyde in bonding systems disinfects dentin in -vitro. **J Adhes Dent**, v.1, p.61–4, 2004.

SETTEMBRINI, L.; BOYLAN, R.; STRASSLER, H.; SCHERER, W. A comparison of antimicrobial activity of etchants used for total etch technique. *Oper Dent*, v.2, p.84–8, 1997.

SCHWARTZ, E.; FACHINELLO, J.C.; BARBIERI, R.L.; SILVA, J.B. [Performance of Butia capitata population in Santa Vitoria do Palmar]. **Rev Bras Frutic**, v.3, p.736-745, 2010.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, v.2, p.S6-11, 1994.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **J. Dent Res** v.10, p.870-7, 2006.

SILVEIRA, C.S.; PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S. Atividade antimicrobiana dos frutos de Syagrus oleracea e Mauritia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, p.143-148, 2005.

SKRIVANOVÁ, E.; MAROUNEK, M.; DLOUHÁ, G.; KANKA, J. Susceptibility of Clostridium perfringens to C-C fatty acids, **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p.77-81, 2005.

SUN, C.; CAO, Y.Z.; HUANG, A.H, Acyl Coenzyme A preference of the glycerol phosphate pathway in the microsomes from the maturing seeds of palm, maize, and rapeseed. **Plant Physiol**, v.1, p.56-60, 1988.

SZENTMIHÁLYI, K.; VINKLER, P.; LAKATOS, B.; ILLÉS, V, Then M. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. **Biores Technol**, v.2, p.195-201, 2002.

TAY, FR.; Carvalho, R.; SANO, H.; PASHLEY, DH. Effect of smear layers on the bonding of self-etching primer to dentin. **J Adhes Dent**, v.2,p.99-116, 2000.

TRUBIANI, O.; CAPUTI, S.; DI LORIO, D.; D'AMARIO, M.; GIANCOLA, R.; DI NARDO DI MAIO, F et al. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. **International Endodontic Journal** v.8, p.646-53, 2010

VAN MEERBEEK, B.; VARGAS, S.; INOUE, S.; YOSHIDA, Y.; PEUMANS, M. Adhesives and cements to promote preservation dentistry, **Operative Dentistry**, v.26, p.119-144, 2001.

VAN LANDUYT, K.L.; SNAUWAERT, J.; DE MUNCK, J.; PEUMANS, M.; YOSHIDA, Y.; POITEVIN A et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Biomaterials** v.26, p.3757–3785, 2007.

WIEGAND, A.; BUCHALLA, W.; ATTIN, T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dental Materials**, v.23, p.343-62, 2007.

XIAO, Y.H.; MA, S.; CHEN, J.H.; CHAI, Z.G.; LI, F.; WANG, Y.J.; Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater**, v.2, p.813-7, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____ RG nº _____, concordo em participar da pesquisa “DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA ADESIVO EXPERIMENTAL CONTENDO ÓLEO DO *Butia capitata* COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO”. Sei que a minha identidade não será revelada, que as informações sobre os exames somente serão vistas pelos pesquisadores e que será mantida a minha privacidade quando da publicação dos dados em revistas de odontologia. As coletas de saliva serão realizados na clínica odontológica da pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFPel, por examinadores, acompanhados por um pesquisador responsável. Os procedimentos realizados durante a pesquisa não oferecem riscos à minha saúde. Os pesquisadores garantem respostas a todas perguntas e esclarecimentos sobre dúvidas. Há a possibilidade de retirada do consentimento e desistência da participação em qualquer momento, mas enquanto estiver participando da pesquisa tenho o compromisso de fornecer informação atualizada e o dever de comparecer às consultas. É assegurada a gratuidade de todas as etapas da presente pesquisa.

Este documento será revisado para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição de atenção à saúde.

Data __/__/____.

Nome e assinatura

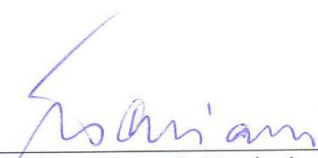
ANEXOS

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

PELOTAS, 06 de dezembro de 2010.

PARECER N° 180/2010

O projeto de pesquisa intitulado **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA ADESIVO EXPERIMENTAL CONTENDO ÓLEO DE BUTIA CAPITATA COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO** está constituído de forma adequada, cumprindo, na suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.



Prof.º. Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPel

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa