

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Tese

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-MECÂNICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE
MATERIAIS ODONTOLÓGICOS CONTENDO EXTRATO PIROLENHOSO
OBTIDO DE *EUCALYPTUS GRANDIS***

JULIANA LEITZKE SANTOS DE SOUZA

Pelotas, 2019

JULIANA LEITZKE SANTOS DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-MECÂNICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE
MATERIAIS ODONTOLÓGICOS CONTENDO EXTRATO PIROLENHOSO OBTIDO
DE *EUCALYPTUS GRANDIS***

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Co-orientadora: Ângela Diniz Campos

Pelotas, 2019

Dados de catalogação na fonte:
(Gabriela Machado Lopes – CRB-10/1842)

S111c Souza, Juliana Leitzke Santos

Caracterização físico-mecânica e potencial biológico de materiais odontológicos contendo extrato pirolenhoso obtido de *Eucalyptus grandis* / Juliana Leitzke Santos Souza ; Rafael Guerra Lund, orientador ; Ângela Diniz Campos, coorientadora. — Pelotas, 2019.

146 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Extrato pirolenhoso. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Verniz odontológico. 4. Sistema adesivo. 5. Citotoxicidade. I. Lund, Rafael Guerra, orient. II. Campos, Ângela Diniz, coorient. III. Título.

CDD 574.192

Juliana Leitzke Santos de Souza

**Caracterização físico-mecânica e potencial biológico de materiais
odontológicos contendo extrato pirolenhoso obtido de *Eucalyptus grandis***

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20 de dezembro de 2018 às 9hs.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Orientador)

Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.

.....
Prof. Dr. Evandro Piva

Doutor em Materiais Dentários pela Universidade Estadual de Campinas.

.....
Prof. Dr. Wellington Luiz de Oliveira da Rosa

Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho aos meus filhos.

Agradecimentos

Ao Leonardo, grande incentivador para que eu não desistisse dos meus sonhos.

Aos meus queridos filhos Júlia e Théo, pelo carinho e incentivo que me fazem continuar sempre.

À minha mãe Lia, pela minha existência e ajuda.

À minha família, pelo apoio e suporte em todos os momentos.

Aos meus queridos orientadores Rafael Guerra Lund e Ângela Diniz campos, por todas oportunidades, desafios, ensinamentos e principalmente pela amizade construída nesta trajetória da pós-graduação.

E a Deus, por ter me concedido o privilégio de realizar este grande desafio.

Obrigada.

*“Não existem métodos fáceis para resolver problemas difíceis”.
(René Descartes)*

NOTAS PRELIMINARES

A presente tese 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 do Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/ManualnormaUFPel2006.pdf>

RESUMO

SOUZA, Juliana Leitzke Santos. **Caracterização físico-mecânica e potencial biológico de materiais odontológicos contendo extrato pirolenhoso obtido de *Eucalyptus grandis*.** 2019. 146f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O presente estudo consiste no desenvolvimento de novos materiais odontológicos (verniz e sistema adesivo) contendo extrato pirolenhoso de *Eucalyptus grandis* destilado, e isento de HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em dosagens consideradas tóxicas. Inicialmente, foi realizada uma revisão sistemática da literatura científica quanto ao potencial antimicrobiano do extrato pirolenhoso, bem como uma prospecção tecnológica através de busca em bases de patentes. Esta tese consistiu na realização de ensaios pré-clínicos de dois materiais odontológicos experimentais e foi dividida em duas etapas. O objetivo da primeira etapa foi investigar o potencial antimicrobiano e citotóxico de seis amostras de um filme de quitosana contendo extrato pirolenhoso, visando sua aplicação para uso odontológico, como um filme antimicrobiano. A segunda etapa envolveu a formulação de um sistema adesivo contendo o extrato pirolenhoso nas concentrações de 1, 5 e 10%. Foram realizados os testes antimicrobianos de contato direto, teste de citotoxicidade e teste físico-mecânico destas formulações. Na revisão científica e tecnológica, os estudos mais predominantes foram *in vitro*, e comprovada a ação antimicrobiana para micro-organismos patogênicos orais. Os materiais experimentais testados apresentaram atividade antimicrobiana (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*) em baixas concentrações (filme de quitosana – 7,500µg a 1,500µg e sistema adesivo 1%, 5% e 10%), a incorporação do extrato pirolenhoso no sistema adesivo não influenciou negativamente as propriedades mecânicas do material e não demonstrou ser citotóxico frente a células comerciais de fibroblastos de camundongos da linhagem NIH/3T3. Apesar de serem necessários estudos clínicos para confirmar a efetividade desses materiais na prevenção e controle de patologias orais, a revisão sistemática e o estudo laboratorial demonstraram que há evidência de atividade antibacteriana desses materiais *in vitro*.

Palavras-chave: materiais odontológicos, verniz odontológico, sistema adesivo, produto natural, extrato pirolenhoso, propriedades físicas e mecânicas, atividade antimicrobiana, citotoxicidade.

ABSTRACT

SOUZA, Juliana Leitzke Santos. **Caracterização físico-mecânica e potencial biológico de materiais odontológicos contendo extrato pirolenhoso obtido de *Eucalyptus grandis***. 2019. 146f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The present study consists of the development of new dental materials (varnish and adhesive system) containing *Eucalyptus grandis* pyroligneous extract of highly purified. Initially, a systematic review of the scientific literature on the antimicrobial potential of pyroligneous extract was carried out, as well as a technological prospection through patent search. This project consisted of pre-clinical trials of two experimental dental materials and was divided into two stages. The objective of the first step was to investigate the antimicrobial and cytotoxic potential of six samples of a chitosan film containing *E. grandis* pyroligneous extract, aiming its application for dental use. The second step involved the formulation of an adhesive system containing the *E. grandis* pyroligneous extract at concentrations of 1, 5 and 10%. The direct contact antimicrobial tests, cytotoxicity test and physical-mechanical test of these formulations were performed. In the bibliographic and technological monitoring, the most predominant studies were *in vitro*, and demonstrate the antimicrobial action for oral pathogenic microorganisms. The experimental materials tested showed antimicrobial activity (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*) at low concentrations (chitosan film – 7.500µg at 1.500µg and 1%, 5% and 10% adhesive system), incorporation of the *E. grandis* pyroligneous extract into the system adhesive did not negatively influence the mechanical properties of the material and was not shown to be cytotoxic against commercial fibroblast cells from NIH / 3T3 lineage mice. Although clinical studies are required to confirm the effectiveness of these materials in the prevention and control of oral pathologies, the systematic review and the laboratory study have demonstrated that there is evidence of antibacterial activity of these materials *in vitro*.

Key words: dental materials, dental varnish, adhesive system, natural product, pyroligneous extract, physical and mechanical properties, antimicrobial activity, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Figura 1. Representação esquemática da produção de extrato pirolenhoso a partir de matérias-primas de biomassa à base de lignocelulose.....	20

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Principais constituintes identificados no extrato pirolenhoso de <i>Eucalyptus grandis</i>	22
---	-----------

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivos Gerais.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
2.3. Justificativa.....	17
3. Revisão de Literatura.....	19
3.1. Extrato pirolenhoso.....	19
3.2. Filme de quitosana contendo extrato pirolenhoso.....	22
3.3. Cavidade oral: principais desafios.....	25
3.3.1. Cárie.....	26
3.4. Vernizes Odontológicos.....	27
3.4.1. Vernizes fluoretado.....	27
3.4.2. Quitosana.....	28
3.5. Sistemas adesivos.....	28

4. Patente depositada no INPI.....	28
5. Artigos científicos.....	53
5.1. Artigo 1: Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – A systematic review and a technology prospecting.....	54
5.2. Artigo 2: Antimicrobial and cytotoxic potential in vitro of films of <i>Eucalyptus grandis</i> pyroligneous extract and chitosan for oral applications.....	84
5.3. Artigo 3: Biological potential and mechanical characterization of a detin-bonding system containing <i>Eucalyptus grandis</i> pyroligneous extract.....	107
6. Considerações finais.....	129
7. Referências Bibliográficas.....	130
ANEXO I.....	139
ANEXO II.....	140
ANEXO III.....	141

1. Introdução

Dentro do conceito de sustentabilidade, a química ambiental tem avançado no sentido de introduzir processos e produtos para a substituição de tecnologias poluidoras. A utilização de matérias primas de origem vegetal e/ou subprodutos resultantes do processamento dessas matérias primas e a sua incorporação em processos/produtos ecologicamente corretos tem se mostrado uma tendência mundial principalmente em países que apresentam grande disponibilidade de biomassa (WU et al., 2015)(COCCO et al., 2015).

Em todo o mundo, a produção de carvão a partir da queima da madeira é vista como uma atividade insalubre e altamente poluente principalmente pelo lançamento de substâncias tóxicas no meio ambiente. Neste contexto, a redução deste lançamento bem como a utilização dos subprodutos do processo é visto como uma solução ambientalmente correta e economicamente viável para o setor (CAMPOS, 2018). Durante o processo de carbonização da madeira o carvão é apenas uma fração dos produtos que podem ser obtidos. Caso sejam utilizados sistemas apropriados para a coleta, aproveitam-se os condensados pirolenhosos e dos gases não condensáveis. A prática mais completa e eficiente é o aproveitamento do carvão vegetal, dos condensados e também dos gases incondensáveis da madeira, pelo processo de 'destilação seca'. A fase líquida mais conhecida e que poderá ser utilizada é o líquido pirolenhoso, denominado de extrato pirolenhoso (CAMPOS, 2018).

O extrato pirolenhoso em geral, é constituído em sua maior parte por água, compostos fenólicos, aldeídos e ácidos orgânicos. Este extrato encontra aplicação em diversas áreas. Possui ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, e propriedades antielmínticas e pode ser utilizada para melhorar a produtividade agrícola (IBRAHIM et al., 2014a). O extrato pirolenhoso também é muito apreciado por suas propriedades organolépticas e antimicrobianas em alimentos, dando sabor defumado a alimentos, conferindo ação antimicrobiana contra patógenos de interesse da indústria alimentícia e tem demonstrado ser uma opção segura como aditivos em alimentos (MATHEW; ZAKARIA, 2015).

A cavidade oral apresenta desafios adicionais quanto ao seu tratamento, como por exemplo: a ação diluidora da saliva e as concentrações subterapêuticas consequentes dessa ação; a difícil administração local de antibacterianos é um desafio clínico enfrentado pelos profissionais (OLIVEIRA et al., 2007).

Muitos compostos são testados e vários produtos são desenvolvidos para o controle da cárie e eliminação do biofilme microbiano. O primeiro foi o flúor com ação remineralizante, seguido pela clorexidina com atividade antimicrobiana, entre outros. No entanto, muitas dessas substâncias causam efeitos indesejáveis injustificados, tais como vômitos, diarreia e coloração dos dentes (RAHMANI-BADI; SEPEHR; BABAIE-NAIEJ, 2015). Enxaguatórios e cremes dentais são métodos aceitos para administrar antimicrobianos na cavidade oral. No entanto, eles são completamente dependentes da disciplina e adesão do paciente ao tratamento oral e muitos desses antimicrobianos são prescritos por curtos períodos para evitar qualquer risco de perturbar a microflora oral, uma estratégia é incorporar antimicrobianos em materiais dentários. A possibilidade de que material restaurador dental possa liberar compostos antimicrobianos é considerada uma estratégia interessante para inviabilizar o desenvolvimento de biofilmes dentais cariogênicos e o risco de cárie dentária secundária. Há uma chance de que, sob menos estresse de biofilme, materiais dentários possam aumentar a longevidade (FERNANDES et al., 2015).

Uma das diversas abordagens utilizadas na promoção da saúde bucal é o revestimento da superfície do dente ou da mucosa oral com uma formulação líquida de secagem rápida, capaz de formar uma espécie de filme. Os vernizes são formulações farmacêuticas que aderem à superfície do dente formando um filme polimérico, liberando lentamente uma substância antimicrobiana no meio bucal (MORAIS et al., 2007).

Outra abordagem explorada neste trabalho foram os sistemas adesivos, a microflora da cavidade oral é extremamente diversificada. As bactérias residuais na cavidade oral podem permanecer na interface de restauração dentária e aumentar o risco de desenvolver cárie recorrente (PENMETSA et al., 2014). Os efeitos antibacterianos de adesivos não polimerizados ou imediatamente polimerizados são benéficos na erradicação de bactérias residuais na cavidade oral. A atividade antibacteriana duradoura de adesivos polimerizados pode ser efetiva na inativação de bactérias que invadem a interface dente/adesivo por microinfiltração (FEUERSTEIN et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi verificar a atividade antimicrobiana do filme de quitosana contendo extrato pirolenhoso de *Eucalliptus grandis* através do potencial antifúngico, antibacteriano e citotóxico de seis amostras deste filme formulado pela EMBRAPA descrita na Patente WO2014100873 A1 (CAMPOS, 2012), formulados

com minerais e com o extrato pirolenhoso, visando à possibilidade da utilização dos mesmos como filmes antimicrobianos de uso odontológico. Bem como, a formulação de um sistema adesivo contendo o extrato que foi submetido ao teste de contato direto e citotoxicidade para verificar a atividade antimicrobiana e ensaios físicos-mecânicos adequados para avaliar as propriedades deste material.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão sistemática e tecnológica das atividades antimicrobianas do extrato pirolenhoso, testar os filmes de quitosana contendo extrato pirolenhoso de *Eucalyptus grandis*, formulados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, formular sistemas adesivos odontológicos contendo extrato pirolenhoso e avaliar o seu desempenho físico-mecânico, antimicrobiano e citotóxico.

2.2 Objetivos específicos

1) Realizar uma revisão sistemática da literatura sobre o que existe de evidência científica da atividade antimicrobiana do extrato pirolenhoso;

2) Avaliar a atividade antimicrobiana através do teste de contato direto, avaliar a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana através do ensaio de biofilme microcosmos *in vitro* das seis amostras dos filmes de quitosana contendo extrato pirolenhoso de *E. grandis* e verificar a capacidade destes formulados em inibição de lesão do esmalte do dente através do teste de dureza;

3) Formular um sistema adesivo contendo o extrato pirolenhoso de *E. grandis*; Testar a atividade antimicrobiana através do teste de contato direto, avaliar a citotoxicidade *in vitro* e as propriedades físico-mecânicas do sistema adesivo contendo o extrato: grau de conversão, ensaio de microtração (resistência de união a dentina).

2.3. Justificativa

A nossa proposta foi testar um filme de quitosana contendo extrato pirolenhoso de *E. grandis* com potencial antibacteriano para atuar no controle incipiente da formação de lesões cariosas em pacientes com alta atividade de cárie, além da formulação de sistemas adesivos com potencial antibacteriano como método auxiliar para a prevenção de lesões de cárie recorrente são de grande importância clínica. Por último, destaca-se a vantagem de que este material poderá ser formulado com diferentes viscosidades para aplicação nos vernizes e sistemas adesivos e menor para aplicação nos preparos cavitários, através do ajuste reológico.

Este projeto foi de encontro do documento lançado pela FAPERGS, intitulado: “Prioridades para o fomento à pesquisa no RS para o decênio 2017-2026, contemplando dois setores desta lista considerados prioritários para o investimento à pesquisa em nosso Estado”. Um deles e o principal seria o setor de “Fármacos e Complexo Industrial da Saúde”, visto que propomos o desenvolvimento de protótipos de vernizes odontológicos e sistemas adesivos contendo extrato pirolenhoso. E o outro setor contemplado indiretamente é o do Agronegócio (agricultura, pecuária e zootecnia de precisão), visto que os extratos vegetais utilizados para o desenvolvimento de produtos odontológicos de origem nacional foi desenvolvido e patenteado pela EMBRAPA, que é a nossa instituição parceira e que colaborou neste projeto (FAPERGS, 2017).

Potencial de Inovação: Conforme já exposto acima, materiais com versatilidade de aplicação (podendo ser aplicado tanto em superfícies dentinárias coronárias como radiculares, quanto em preparos cavitários, com potencial antimicrobiano e utilizando alta tecnologia à base de resina e extratos naturais com potencial terapêutico, são escassos no mercado odontológico voltado para a dentística restauradora, tanto estrangeiro quanto nacional. Além disso, o mercado nacional de materiais odontológicos ainda é predominantemente dominado por produtos importados. Fabricantes como Dentsply (EUA), 3M ESPE (EUA), Ivoclar-Vivadent (Liechtenstein), Kerr (EUA), Bisco (EUA), Heraeus-Kulzer (Alemanha), Kuraray (Japão), Voco (Alemanha) e SDI (Austrália) são exemplos de empresas que exportam materiais odontológicos e vendem amplamente no Brasil. Desta forma, a indústria nacional poderá ter o domínio de uma plataforma tecnológica inovadora, com várias possibilidades de aplicação, sem depender de tecnologia externa. O processo de formulação dos novos sistemas adesivos apresenta uma previsão de impacto financeiro similar ao processo de industrialização dos sistemas adesivos convencionais. A proposta desse novo sistema adesivo é compatível com as necessidades básicas da população, visto que temos uma grande incidência de casos de infecções cáries, com diferentes graus de severidade e resistência antimicrobiana, que muitas vezes compromete o sucesso do tratamento. Partindo deste princípio, a proposta deste projeto foi buscar uma nova alternativa tecnológica para a resolução dos casos de lesões incipientes ou recorrentes de cárie e restaurações que requerem um material com potencial antimicrobiano e à base de extrato natural bioativo.

3. Revisão de Literatura

3.1. Extrato pirolenhoso

Os extratos naturais são uma ótima opção para o desenvolvimento de fármacos com ação antimicrobiana. Devido suas propriedades antimicrobianas na natureza diversas plantas e extratos são usados na odontologia e receitados aos pacientes com afecções orais para o tratamento destas infecções (OLIVEIRA et al., 2007).

O extrato pirolenhoso é um produto de base orgânica resultante da condensação da fumaça gerada na pirólise da madeira e, em especial, durante a produção de carvão vegetal (GRECCO et al., 2018; IBRAHIM et al., 2014a).

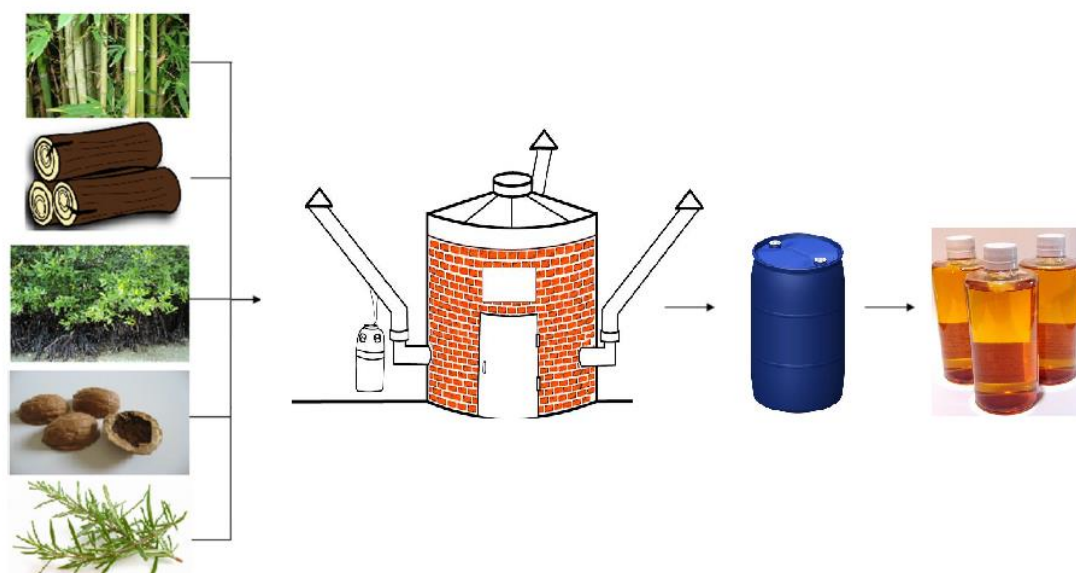


Figura 1. Representação esquemática da produção de extrato pirolenhoso a partir de matérias-primas de biomassa à base de lignocelulose, adaptado de (MATHEW; ZAKARIA, 2015).

Para produzir o extrato pirolenhoso, é necessário condensar os vapores contidos na fumaça, obtendo-se assim um licor composto basicamente por água, aldeídos, fenóis, cetonas éteres, alcóóis e esterres, que devem ser armazenados por um período de quatro a seis meses para estabilização das reações. O extrato pirolenhoso é também conhecido por ácido pirolenhoso, vinagre de madeira, licor pirolenhoso, fumaça líquida e bio-óleo. A carbonização da madeira é a principal fonte. Nos meios científicos, é conhecido por ácido pirolenhoso. O termo mais popular é extrato pirolenhoso (CAMPOS, 2018).

O extrato pirolenhoso produzido pela pirólise da biomassa é um líquido marrom amarelado ou marrom escuro com pH ácido e geralmente compreende uma mistura complexa de guaiacóis, catecóis, siringes, fenóis, vanilinas, furanos, piranos, carboxaldeídos, hidroxicetonas, açúcares, alquil aril éteres, derivados nitrogenados, álcoois, ácido acético e outros ácidos carboxílicos. Os componentes fenólicos, nomeadamente guaiacol, guaiacóis de alquilo, syringol, syringols de alquilo, contribuem para o odor de fumo do ácido pirolenhoso (MATHEW; ZAKARIA, 2015).

O extrato é composto por cerca de 200 substâncias químicas que interagem entre si, e é difícil responsabilizar um componente isolado por esse ou aquele efeito. Atualmente, os principais países produtores de extrato pirolenhoso são o Japão, China, Indonésia, Malásia, Brasil e Chile, incluindo outros no Sudeste Asiático e na América do Sul. A fabricação e utilização do extrato pirolenhoso é muito antiga. Na China existem relatos de sua utilização há milênios atrás e na Índia foi muito utilizado para curar doenças (CAMPOS, 2007).

A madeira a ser utilizada é muito importante, pois influencia diretamente na qualidade e composição do extrato pirolenhoso. Evitar o uso de madeiras tratadas com pesticidas. Evitar a utilização de madeira proveniente de mata nativa, pois a presença de espécies venenosas pode inviabilizar completamente o extrato pirolenhoso, tornando-o venenoso. Uma boa madeira é aquela em que se sabe exatamente a espécie em que se está queimando, evitar misturas para garantir a qualidade do líquido pirolenhoso. No Brasil, a maioria da madeira para este fim é proveniente de eucalipto, pinus, bambu e acácia negra no Rio Grande do Sul (CAMPOS, 2007).

O extrato pirolenhoso encontra aplicação em diversas áreas. Possui ação antimicrobiana, anti-oxidante, anti-inflamatória, e propriedades antielmínticas e pode ser utilizada para melhorar a produtividade nas culturas agrícolas e vegetais devido ao seu potencial como estimulante do crescimento e atividade pesticida. O extrato também é muito apreciado por suas propriedades organolépticas dando sabor defumado a alimentos e considerado seguro para ser usado como aditivos alimentares (MATHEW; ZAKARIA, 2015).

O extrato pirolenhoso utilizado nesse estudo foi obtido em forno experimental para a queima de lenha, construído na Estação Experimental da Cascata Embrapa Clima Temperado (EEC), no ano de 2003, com as parcerias do Dr Shiro Miyasaka e Prof. Newton S. Miyasaka. O forno foi adequado para o controle de temperatura dos

gases e vapores de fumaça a 5 cm abaixo da saída da primeira chaminé. Para as medidas de temperatura utilizou-se um termômetro de metal de haste longa. A lenha utilizada nesse estudo foi a seca, proveniente de eucalipto e de acácia-negra. O objetivo foi avaliar o extrato pirolenhoso quanto aos principais parâmetros de controle de qualidade em temperaturas que variaram de 80 a 150°C. Para manter a temperatura na faixa desejada, adotou-se o procedimento de abertura e fechamento dos respiradouros do forno. O controle da entrada de ar foi através dos respiradouros. Esse procedimento iniciava-se quando a temperatura atingia 150°C, neste momento fechava-se as aberturas para baixar a temperatura para aproximadamente 80°C, e em seguida abria-se gradativamente os respiradouros até atingir a temperatura de 150°C, e assim sucessivamente até o finalização da queima, não ultrapassando a temperatura mínima de 80°C e a máxima de 150°C. Foram realizadas as queimas de 8 fornadas em diferentes períodos do ano. Todo o extrato pirolenhoso obtido foi armazenado em recipientes de plástico e deixado em repouso na sombra por um período de seis meses. Após esse período de armazenamento, foram retiradas amostras para as análises. As amostras foram avaliadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado quanto ao PH, transparência do líquido, coloração, odor característico de defumados e densidade. Quanto à presença de HPAs, as amostras foram enviadas para análises na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. Para estas análises utilizou-se como referência os métodos descritos pela EPA (U.S Enviromental Protection Agency) números 8270D e 3540C para 4 e 8 HPAs, 3630 e 8100 para análise de 17 HPAs. Os 4 HPAs avaliados foram benzo[a] pireno, criseno, benz[a]anthraceno e benzo[b] fluoranteno), e os 8 HPAs benzo [a] antraceno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo [ghi] perileno, criseno, dibenzo [a,h] antraceno e indeno[1,2,3-cd] pireno. Os índices de HPAs ficaram abaixo dos limites de detecção tanto para o extrato pirolenhoso proveniente de eucalipto quanto de acácia-negra. O limite de detecção é a mais baixa concentração do componente químico (HPA) que pode ser detectado de forma confiável e distinta de zero. Esses valores para a soma de 4 HPAs ficaram na faixa de 0,110 a 0,205 mg/L e para a soma de 8 HPAs foi de 0,210 a 0,330 mg/L. Baseado nesse estudo, o extrato pirolenhoso coletado na faixa de temperatura de 80 a 150 °C para a utilização na agricultura, apresenta concentrações de HPAs dentro dos limites de segurança estabelecida. O PH variou de 2,2 a 3,7. Ocorreu pequeno aumento do PH após o período de armazenamento de seis meses

em algumas amostras. Esse período é muito importante para estabilização de reações que estão ocorrendo no extrato pirolenhoso, e para que ocorra a decantação de alguma partícula sólida presente no líquido. A coloração variou em tons de avermelhada. A transparência foi acentuada após seis meses de armazenamento. O extrato pirolenhoso coletado na temperatura de 80 a 150 °C e armazenado pelo período de seis meses apresentou odor característico de defumados e densidade média, em 25°C, de 1,002 a 1,006 (CAMPOS, 2018).

No estudo de Grecco (2018), foi realizada a análise de espectroscopia de massa do extrato pirolenhoso de *E. grandis*, e revelou a presença de diferentes espécies químicas, incluindo aromáticas, fenólicas, carbonílicas, bem como compostos orgânicos contendo heteroátomos, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Principais constituintes identificados no extrato pirolenhoso de *Eucalyptus grandis* (GRECCO et al., 2018).

	Composto identificado
1	Tetrahydropyran
2	3-Methyl-2-cyclopenten-1-one
3	Phenol
4	2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one
5	Phenol,2-methyl (ortho-cresol)
6	Phenol,3-methyl (meta-cresol)
7	Phenol,2-methoxy
8	Phenol,2,3-dimethyl (2,3-xilenol)
9	Para-cresol,2-methoxy
10	Phenol,4-ethyl-2-methoxy
11	Phenol-2,6-dimethoxy

3.2. Filme de quitosana contendo extrato pirolenhoso

O filme fitoprotetor desenvolvido pela EMBRAPA é a invenção objeto de BR102012033149-7 se enquadra no contexto da química verde e se refere genericamente a uma formulação fertilizante e fitoprotetor e, em uma modalidade particular, a uma formulação formadora de filmes e indutora da resistência de plantas. A respectiva formulação, quando aplicada em plantas e/ou frutos resulta na formação de filme na superfície do material, o qual possui a característica de

fotoproteção contra as radiações UV-B e UV-C, resistência mantida na água mesmo após alta higroscopicidade, maior estabilidade sob temperaturas ambientais elevadas, formação de porosidade desejada e homogeneidade de superfície (CAMPOS, 2012).

A invenção consiste no processo de obtenção de composição fertilizante e fitoprotetora que compreende a obtenção de extrato pirolenhoso destilado (ácido pirolenhoso, preferencialmente obtido por destilação a vácuo) misturado à quitosana (preferencialmente, com grau de desacetilação mínimo de 97%) e a solução mineral (de um ou mais dentre silício, boro, molibdênio, manganês, zinco, cálcio e cobre), de modo a produzir a composição fertilizante (CAMPOS, 2012).

A presente invenção se refere a um processo de obtenção de uma formulação bem como a uma formulação com característica fitoprotetora e fertilizante e que representa uma alternativa viável de composição para aplicação em plantas e frutos mantendo, tal formulação, suas características através da formação de um filme estável, com maior durabilidade, resistência térmica e manutenção das características quando da absorção de água sendo ideal para aplicação em campo. A referida invenção utiliza um subproduto do processo de obtenção de carvão a partir da queima da madeira para, após tratamento específico, utilizá-lo em combinação com quitosana e minerais específicos obtendo-se uma formulação que, após aplicação em plantas, possui características desejáveis e até então não atingidas plenamente por produtos similares tais como indução da resistência sistêmica, ação fungitóxica e nematicida comprovada, formação de filme na superfície da planta após a pulverização, fotoproteção contra as radiações UVB e UVC, resistência do filme mantida na água mesmo após alta absorção, maior estabilidade do filme sob temperatura ambiental elevada, formação de porosidade desejada e homogeneidade de superfície fitoprotetora. Após a aplicação em plantas e frutos, o filme formado bloqueia eficientemente a radiação na região do UVB e UVC (CAMPOS, 2012).

A elevada absorvidade molar decresce com o aumento do comprimento de onda. A formulação é termicamente estável até 60 °C e o filme resultante perde uma pequena quantidade de água sob aquecimento, mas é termicamente estável em uma ampla faixa de temperatura, sofrendo decomposição somente a 300 °C. O filme apresenta estrutura semicristalina que lhe confere flexibilidade e porosidade, características desejáveis nos processos de penetração de água e trocas gasosas (CAMPOS, 2012).

O filme mantém sua integridade sob imersão em água por até 7 dias e apresenta excelente higroscopicidade, podendo absorver água até 300% de sua massa com pouca perda das características iniciais, o que permite seu uso como coberturas para plantas em condições ambientais (CAMPOS, 2012).

Na presente invenção, o extrato pirolenhoso destilado (EPD) é obtido a partir do extrato pirolenhoso bruto (EPB). Entende-se como extrato pirolenhoso bruto, a fase líquida obtida quando da condensação da fumaça durante a queima da madeira para a produção de carvão. O EPB também é denominado como líquido pirolenhoso ou ácido pirolenhoso ou vinagre de madeira ou licor pirolenhoso ou fumaça líquida ou bioóleo. No caso do EPB da presente invenção, este deve ser produzido utilizando parâmetros de controle que permitam a obtenção de um produto com a menor quantidade de alcatrão possível. A presença de alcatrão no EPB o torna tóxico e inviável para a utilização na agricultura. No caso da presente invenção, o EPB é obtido de acordo as orientações de obtenção descritas em Campos, A. D. (Técnicas de produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Embrapa Clima Temperado, Circular Técnica nº65, 2007. ISSN 19815999). Como parte do seu processo de obtenção/separação, o EPB é mantido em repouso por 3 a 6 meses e separado por decantação dos demais componentes resultantes da condensação da fumaça. Alternativamente, após sua separação dos demais componentes resultantes da condensação da fumaça, o EPB obtido pode, ainda, ser submetido a um processo de filtração com o intuito de eliminar impurezas restantes. Na presente invenção, o EPD é obtido a partir da destilação à vácuo do EPB. Mais especificamente, o EPD é obtido a partir da destilação à vácuo à temperatura mínima e máxima de 60°C e 75°C respectivamente.

A etapa B do processo de obtenção de formulação fertilizante fitoprotetora da presente invenção compreende a obtenção de composição precursora contendo EPD e quitosana. Para a obtenção da respectiva composição precursora, quitosana é misturada com o EPD. Preferencialmente, para sua utilização na presente invenção, a quitosana deve possuir um grau de desacetilação mínimo de 97%. Ainda preferencialmente, a concentração de quitosana em EPD na composição obtida na etapa B da invenção deve variar de 0,05 g/L a 30 g/L.

A obtenção de solução mineral fertilizante descrita na etapa C do processo de obtenção de formulação fertilizante e fitoprotetora da presente invenção é realizada através da adição de minerais à água. Diversos minerais com capacidade fertilizante

podem ser utilizados na obtenção da solução mineral (etapa C) da presente invenção. Preferencialmente, os minerais são selecionados dentre silício e/ou boro e/ou molíbdênio e/ou manganês e/ou zinco e/ou cálcio e/ou cobre. Ainda preferencialmente, as concentrações dos respectivos minerais utilizados são: silício: 0,07 g/L a 0,50 g/L; boro: 0,04 g/L a 0,08 g/L; molíbdênio: 0,02 g/L a 0,09 g/L; manganês: 0,04 g/L a 0,13 g/L; zinco: 0,02 g/L a 0,10 g/L; cálcio: 0,03 g/L a 0,30 g/L; cobre: 0,065 g/L a 0,2 g/L.

A etapa D do processo de obtenção da formulação fertilizante e fitoprotetora da presente invenção compreende a mistura da composição obtida na etapa B com a solução obtida na etapa C do processo. Preferencialmente, a relação de mistura entre as soluções B.C varia de 0,05:99,95 a 30:70. A mistura das soluções B e C nas proporções descritas anteriormente resulta, então, na formulação fertilizante e fitoprotetora da invenção (CAMPOS, 2012).

3.3. Cavidade oral: principais desafios

Dentre as principais afecções que afetam a cavidade oral estão a cárie, a gengivite, a periodontite e as estomatites aftosas. A cárie dentária é uma infecção microbiana dos tecidos calcificados dos dentes, um processo dinâmico caracterizado por perda mineral, que ocorre sempre que o equilíbrio entre a superfície dentária e o fluido da placa resultante da metabolização de carboidratos fermentáveis pelos micro-organismos é alterado (OLIVEIRA et al., 2007).

Na estomatite aftosa ou candidíase há o desenvolvimento de ulcerações recidivantes dolorosas, solitárias ou múltiplas na mucosa bucal (DE AZEVEDO IZIDORO et al., 2012). *Candida albicans* é um exemplo bem conhecido de um agente microbiano, frequentemente encontrado como um comensal de mucosas saudáveis, que pode se comportar como um patógeno oportunista local e distalmente. De fato, a candidíase é a infecção fúngica oportunista mais frequente que afeta a mucosa oral. As lesões locais, mais comumente causadas por *C. albicans*, ocorrem especialmente em pessoas com higiene bucal deficiente, hipossalivação (secundária a drogas, doença ou radioterapia), deficiências nutricionais, prótese dentária, alteração de tecidos, imunodeficiência e uso de esteróides quimioterápicos ou sistêmicos (PAULONE et al., 2017).

A cavidade oral apresenta desafios quanto ao seu tratamento, como por exemplo: a ação diluidora da saliva e as concentrações subterapêuticas

consequentes dessa ação; a difícil administração local de antifúngicos e/ou antibacterianos é também um desafio clínico já enfrentado pelos profissionais (OLIVEIRA et al., 2007).

Muitos produtos estão sendo desenvolvidos para o controle da cárie. O primeiro foi o flúor com ação remineralizante, seguido pela Clorexidina com atividade antimicrobiana, entre outros. A Nistatina é um fármaco antifúngico de tipo polieno, que é a primeira escolha no tratamento de candidíase oral no mundo. O veículo para as substâncias antimicrobianas varia de acordo com a sua aplicação clínica e pode ser encontrada como enxaguatórios, géis ou vernizes, e as soluções de Nistatina e de Clorexidina para uso tópico, entre outros fármacos. Esses produtos podem apresentar desvantagens relacionadas ao uso como, por exemplo, a toxicidade dos polímeros sintéticos e o desenvolvimento de resistência microbiana aos princípios ativos (LUCA et al., 2014; MANGUEIRA; MANGUEIRA; DINIZ, 2010).

Outro material usado para o tratamento de tecidos cariados são os sistemas adesivos, onde a adesão é o processo representado pela interação micromecânica em que os tecidos dentais, parcialmente desmineralizados por componentes ácidos, são hibridizados com resinas fluidas (adesivo); dando origem à camada híbrida; estrutura responsável pela ancoragem do material restaurador resinoso (VAN MEERBEEK et al., 2011).

3.3.1. Cárie

A cárie dentária é a doença bucal mais comum e uma das principais causas de perda dentária do mundo (FRENCKEN et al., 2017). De acordo com as estimativas globais recentes, 621 milhões crianças tinham cavidades não tratadas na dentina em dentes decíduos e 2,4 bilhões de pessoas tinham cavidades não tratadas na dentina em dentes permanentes (JEPSEN et al., 2017).

A cárie dentária é definida como resultado de uma dissolução química localizada da superfície do dente causada pela produção de ácido pelo biofilme dental (placa) exposto frequentemente a açúcares (FORSS et al., 2016; SHANMUGAM et al., 2017). A cárie dentária pode ser explicada como uma interação entre bactérias no biofilme da placa, carboidratos fermentáveis e estrutura dentária. As bactérias do biofilme produzem ácidos orgânicos que podem causar perda de minerais da superfície do dente (desmineralização). Em condições favoráveis, uma inversão, isto é, um ganho, é possível (remineralização). Se o processo de

desmineralização prevalece, ocorrem lesões de cárie visualmente detectáveis (FORSS et al., 2016).

Os micro-organismos do gênero *Streptococcus* são os principais agentes etiológicos da cárie dentária. *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *S. mutans* são os principais colonizadores do biofilme dental. *S. mutans*, *S. sobrinus*, e os *Lactobacillus* são todos capazes de produzir um meio ácido, causando a desmineralização do esmalte do dente (FRANCA et al., 2014).

Desde a década de 1970, ocorreu redução da prevalência de cárie nos países mais industrializados; Entretanto, a cárie dentária ainda é um problema para alguns indivíduos e populações, por exemplo, em muitos países do leste da Europa e da América do Sul, a prevalência de cárie entre crianças de 12 anos tem sido relatada como moderada ou elevada. Um aumento global da cárie foi relatado recentemente, mesmo em países onde a prevalência de cárie tinha sido relativamente baixa (FORSS et al., 2016).

3.4. Vernizes Odontológicos

Uma das diversas abordagens utilizadas na promoção da saúde bucal é o revestimento da superfície do dente ou da mucosa oral com uma formulação líquida de secagem rápida, capaz de formar uma espécie de filme. Os vernizes são formulações farmacêuticas que aderem à superfície do dente formando um filme polimérico, liberando lentamente uma substância antimicrobiana no meio bucal. Essa capacidade de formar um filme se dá através de um polímero, e dentre os mais usados são os sintéticos como a etilcelulose uma mistura de copolímero acetatos e vinil-copolímeros acrilatos. No entanto, esses copolímeros não são biodegradáveis e são citotóxicos (MORAIS et al., 2007).

3.4.1. Vernizes fluoretados

O objetivo da aplicação tópica de verniz fluoretado é tratar superfícies dentárias de tal forma que a cárie é presa ou invertida. O flúor age para prevenir a cárie de três maneiras: (1) inibindo a desmineralização e (2) promoção da remineralização de esmalte, e (3) inibindo a formação de ácido por bactérias de placa. Embora os vernizes fluoretados tenham uma concentração de flúor muito elevada (por exemplo, 22 660 ppm em Duraphat Verniz fluoretado), considera-se que a sua utilização é segura porque têm uma base rápida, liberando lentamente o flúor ao longo do tempo

e comparativamente pequenas quantidades de verniz para toda a dentição. Apenas uma pequena dose de fluoreto é engolida durante várias horas, e risco de reações tóxicas agudas (por exemplo, náuseas, vômitos) é mínima (FORSS et al., 2016).

O uso do Flúor tem se mostrado seguro e indicado quando se deseja reverter e prevenir lesões de cárie, mas se faz desnecessário quando não há necessidade de remineralização do dente. Quando ocorre a aplicação profissional de flúor tópico, altas concentrações de F^- tornam-se disponível no meio bucal, possibilitando a formação de fluoreto de cálcio (CaF_2). As moléculas de CaF_2 depositadas são envolvidas pela formação de uma camada protetora proveniente de proteínas da saliva, transformando-as em um reservatório de F^- que é estável em pH neutro. Durante as quedas de pH do desafio cariogênico, justamente quando há maior necessidade da presença de F^- no meio bucal, a camada protetora do CaF_2 se dissolve, liberando flúor lentamente. Além disso, o CaF_2 também serve como barreira mecânica contra a dissolução do esmalte e possui atividade antimicrobiana (MURAKAMI; BÖNECKER, 2010).

3.5. Quitosana

A quitosana é um derivado da quitina, composto natural que pode ser encontrado em exoesqueletos de artrópodes, conchas de crustáceos e cutículas de insetos. Industrialmente, pode ser obtida através da hidrólise alcalina da quitina. As propriedades da quitosana são muito importantes na área odontológica, pois é biocompatível e biodegradável (DIAS et al., 2013; SALOMON; GOYCOOLEA; MOERSCHBACHER, 2017).

A quitina, um mucopolissacarídeo naturalmente abundante, é um principal constituinte das conchas dos crustáceos, os exoesqueletos de insetos, e as paredes celulares de fungos. Quitosana, um copolímero de N-acetil-D-glucosamina e Dglucosamina, é obtido por N-desacetilação de quitina. Quitosana é um polímero carregado positivamente a pH <6,5 como resultado dos grupos amino livres na sua estrutura. Devido à suas propriedades biológicas únicas e atraentes, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade e inércia, a quitosana é amplamente utilizado como um polication, a quitosana tem a capacidade de formar complexos de polielectrólitos com polianions, sendo muito adequado para o desenvolvimento de diferentes tipos de sistemas de liberação controlada de fármacos (TEJADA et al., 2017).

A quitosana tem sido reconhecida há muito como um dos biopolímeros funcionais promissores, com potenciais aplicações em áreas tão diversas como materiais, alimentos, agricultura, biomedicina, e ciências farmacêuticas (SALOMON; GOYCOOLEA; MOERSCHBACHER, 2017).

3.6. Sistema Adesivo

O objetivo principal dos adesivos dentários é proporcionar retenção para resinas compostas ou cimentos resinosos. Além de suportar forças mecânicas e, em particular, encolhimento do material de revestimento, um bom adesivo também deve ser capaz de evitar vazamentos ao longo das margens da restauração. Clinicamente, a falha nas restaurações ocorre mais frequentemente devido a vedação inadequada, com posterior descoloração das margens da cavidade, do que devido à perda de retenção (VAN LANDUYT et al., 2007).

O princípio fundamental de adesão aos tecidos dentais baseia-se em um processo de troca, em que o material inorgânico do substrato dental é substituído por monômeros resinosos. Este processo é composto por duas fases: a primeira consiste na remoção de minerais do substrato e a segunda envolve a infiltração e polimerização de monômeros resinosos através das porosidades previamente criadas no esmalte e da hibridização na dentina. Os solventes respondem pela fluidez da solução e pelo deslocamento da água presente na superfície dentinária desmineralizada, facilitando, dessa forma, a infiltração da mistura monomérica nos espaços microscópicos criados na estrutura dental, após seu condicionamento (VAN MEERBEEK et al., 2011).

Patente depositada junto ao INPI

O relatório abaixo contém o documento da adição de patente registrado junto ao INPI com a aplicação do filme fitoprotetor desenvolvido pela EMBRAPA para uso odontológico, que foi o objeto de pesquisa desta tese.

870170059860



17/08/2017

16:40

03.158.8.6.17.0719388.6

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 13 2017 017686 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00348003000110

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB - S/N, Edifício Sede, Plano Piloto

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70770-901

País: Brasil

Telefone: (61) 34484545

Fax:

Email: cpi.sne@embrapa.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Depositante 2 de 2**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 92242080000100**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Centro, Campus Porto - 4º Andar - PRPPG**Cidade:** Pelotas**Estado:** RS**CEP:** 96010-610**País:** BRASIL**Telefone:** (53) 392 11225**Fax:****Email:** cit@ufpel.edu.br**Dados do Pedido**

Natureza Patente: 13 - Certificado de Adição (C)**Pedido Original:** BR1020120331497

Título da Invenção ou Modelo de PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÃO COM **Utilidade (54):** CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA, FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA, USO DE FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA

Resumo: O presente certificado de invenção apresenta formulações antimicrobianas para uso odontológico, compreendendo o extrato pirolenhoso destilado e/ou quitosana e/ou adição de minerais como cobre, silício e sal de flúor. As formulações são: extrato pirolenhoso destilado com a adição de quitosana nas doses de 1 e 3% e opcionalmente a adição de minerais como cobre (2g/L), silício (20mg/L) e/ou sal de flúor (NaF 5%). As formulações apresentam efeito anticariogênico e tratando doenças infecciosas orais causadas por microrganismos como Candida albicans, Streptococcus mutans e Lactobacillus acidophilus.

Figura a publicar: FIG 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: JULIANA LEITZKE SANTOS DE SOUZA

CPF: 01051455057

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Três de Maio, 2841, Jardim América

Cidade: Capão do Leão

Estado: RS

CEP: 96160-000

País: BRASIL

Telefone: (53) 913 43659

Fax:

Email: juliana.leitzke@gmail.com

Inventor 2 de 4

Nome: SIMONE GOMES DIAS DE OLIVEIRA

CPF: 00722539088

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua do Fogo, 427, Centro

Cidade: Diamantina

Estado: MG

CEP: 39100-000

País: BRASIL

Telefone: (38) 999 476875

Fax:

Email: sisi_mone@hotmail.com

Inventor 3 de 4

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Nome: ANGELA DINIZ CAMPOS

CPF: 39614794615

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: EMBRAPA Clima Temperado. Rodovia BR-392, Km 78, 9º Distrito, Monte Bonito Caixa Postal 403

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-971

País: BRASIL

Telefone: (53) 327 58144

Fax:

Email: angela.campos@embrapa.br

Inventor 4 de 4

Nome: RAFAEL GUERRA LUND

CPF: 95219668072

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua 15 de Novembro, 666, apto 810, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96015-000

País: BRASIL

Telefone: (53) 322 79876

Fax:

Email: rafael.lund@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU 03158861707193886.pdf
Procuração	Procuração Embrapa.pdf
Relatório Descritivo	CERT.ADIÇÃO_BR102012033149-7_RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	CERT.ADIÇÃO_BR102012033149-7_REIVINDICACAO.pdf
Resumo	CERT.ADIÇÃO_BR102012033149-7_RESUMO.pdf
Desenho	CERT.ADIÇÃO_BR102012033149-7_FIGURAS.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

SIAFI2017-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
 17/08/17 15:28 USUARIO : FATIMA
 DATA EMISSAO : 17Ago17 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2017GR800413
 UG/GESTAO EMITENTE : 135046 / 13203 - EMBRAPA/DAF-CAF
 UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
 RECOLHEDOR : 00348003000110 GESTAO :
 CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: AGO17 VENCIMENTO: 18Ago17
 DOC. ORIGEM: 135046 / 13203 / 2017NP001160 PROCESSO : AP-SNE371/17
 RECURSO : 3

(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00

(-) DESCONTO/ABATIMENTO:

(-) OUTRAS DEDUCOES :

(+) MORA/MULTA :

(+) JUROS/ENCARGOS :

(+) OUTROS ACRESCIMOS :

(=) VALOR TOTAL : 70,00

NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00003158861707193886

CODIGO DE BARRAS : 89650000000 6 70000001010 3 95523127220 9 00360620000 8

OBSERVACAO

PAGAMENTO AP 371/17 - SNE- DEPÓSITO DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO - EL
 ETRÔNICO - CÓDIGO 200, , CONF N.N.03158861707193886.

LANCADO POR : 39886972149 - HUGO UG : 135046 17Ago2017 13:59

PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA

Recibo do Pagador

BANCO DO BRASIL

001-9

00199.53637 10315.886175 07193.886210 4 72800000007000

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço

EMBRAPA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA CPF/CNPJ: 00348003000110

PARQUE ESTACAO BIOLOGICA PQEB S N EDIFICIO SEDE PLANO PILOTO, BRASILIA -DF CEP:70770-901

Sacador/Avalista

Nosso-Número	Nr. Documento	Data de Vencimento	Valor do Documento	(=) Valor Pago
3158861707193886	3158861707193886	12/09/2017	70,00	

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37

PRACA MAUA 7 - 14 ANDAR - SALA 1415 CENTRO RIO DE JANEIRO 20081240 RJ

Agência/Código do Beneficiário

2234-9 / 333028-1

Autenticação Mecânica

BANCO DO BRASIL

001-9

00199.53637 10315.886175 07193.886210 4 72800000007000

Local de Pagamento

PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37

Data do Documento

14/08/2017

Uso do Banco

3158861707193886

Nr. Documento

18

Espécie DOC

DS

Espécie

R\$

Aceite

N

Quantidade

Data do Processamento

14/08/2017

xValor

Data de Vencimento

12/09/2017

Agência/Código do Beneficiário

2234-9 / 333028-1

Nosso-Número

3158861707193886

(=) Valor do Documento

70,00

(-) Desconto/Abatimento

(+) Juros/Multa

(=) Valor Cobrado

Informações de Responsabilidade do Beneficiário

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.

O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.

Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de

Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço

EMBRAPA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA CPF/CNPJ: 00348003000110

PARQUE ESTACAO BIOLOGICA PQEB S N EDIFICIO SEDE PLANO PILOTO,

BRASILIA-DF CEP:70770-901

Código de Baixa

Autenticação Mecânica

Ficha de Compensação



AP 371



PROCURAÇÃO

OUTORGANTE: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, empresa pública federal vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, criada pela Lei 5.851, de 07.12.72, Estatuto aprovado pelo Decreto nº 7.766, de 25 de junho de 2012, CNPJ 00.348.003/0001-10, sediada em Brasília-DF, no Parque Estação Biológica-PqEB, Edifício Sede, neste ato representada pelo seu Presidente, **Maurício Antônio Lopes**, brasileiro, casado, Engenheiro Agrônomo, Carteira de Identidade M1617335 - SSP/MG e CPF 277.340.486-68, residente e domiciliado em Brasília, DF, nomeado nos termos do Decreto Presidencial, s/nº de 09/10/2012, publicado no DOU de 10.10.2012, Seção 2, na forma prevista do Art. 21 do Estatuto.

OUTORGADOS: **Vitor Hugo de Oliveira**, brasileiro, casado, empregado da Embrapa com matrícula 170.359, Engenheiro Agrônomo, Carteira de Identidade 20074324890 - SSPDS/CE e CPF nº 051.103.863-15, **Clarissa dos Santos Goldenberg Terra Theodoro**, brasileira, casada, empregada da Embrapa com matrícula 362.170, Engenheira Agrônoma, Carteira de Identidade 2082186 - SSP/DF e CPF nº 416.704.771-34, **Helma Ventura Guedes**, brasileira, casada, empregada da Embrapa com matrícula 346.274, Bióloga, Carteira de Identidade 110228772 - SSP/RJ e CPF nº 096.981.557-32, **Isabel Cristina Vinhal Freitas**, solteira, empregada da Embrapa com matrícula 354.679, Engenheira Agrônoma, Carteira de Identidade 6556862 - SSP/MG e CPF nº 060877966-06, **Janaina Tomazoni Santos**, brasileira, solteira, empregada da Embrapa com matrícula 360.471, Engenheira Mecânica, Carteira de Identidade 8.087.529-0 - SSP/PR e CPF nº 007.927.189-84, **Maria de Fátima Nassif Salomão Pellegrini**, brasileira, viúva, empregada da Embrapa com matrícula 192.570, Relações Públicas, Carteira de Identidade 453603 - SSP/DF e CPF nº 182.232.141-72, **Milena Olivieri Lisita**, brasileira, casada, empregada da Embrapa com matrícula 362.401, Engenheira de Alimentos, Carteira de Identidade 20129440 - SSP/SP e CPF nº 259.262.528.30, **Roberto Barbosa de Almeida**, brasileiro, casado, empregado da Embrapa com matrícula 359.940, Engenheiro Industrial Químico, Carteira de Identidade 22733454-1 - SSP/SP e CPF nº 141.836.818-04, **Sibelle de Andrade Silva**, brasileira, solteira, empregada da Embrapa com matrícula 355.088, Engenheira Química, Carteira de Identidade 12.659.475 SSP/MG e CPF nº 068.805.616-40 e **Simone Sayuri Tsuneda**, brasileira, casada, empregada da Embrapa com matrícula 366.122, Bióloga, Carteira de Identidade 6801835-8 - SSP/PR e CPF nº 008.123.949.17

PODERES: A Outorgante confere aos Outorgados poderes especiais, com a finalidade específica e exclusiva, para atuarem em seu nome, em conjunto ou separadamente, independentemente de ordem de nomeação no Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI, Serviço Nacional de Proteção de Cultivares-SNPC, Registro Nacional de Cultivares-RNC e nos demais órgãos de registro e proteção de direitos de propriedade intelectual, nacionais e de terceiros países, bem como multilaterais, com o objetivo de requerer e obter registros de direitos de propriedade intelectual, tais como, registros de patentes, marcas, desenhos industriais, programas de computador, topografia de circuitos integrados, cultivares; requerer buscas e certidões; promover perante a autoridade competente provas de uso e pagamento de anuidades ou quaisquer outras taxas de manutenção, bem como as prorrogações ou renovações cabíveis, podendo, para tais efeitos e para defesa ativa e passiva dos interesses da Outorgante, apresentar oposições, impugnações, pedidos de reconsideração, recursos, réplicas; podendo ainda requerer a anotação de alterações de nome e a averbação de transferências ou cessões, averbação de contratos de licença de uso de tecnologias, franquia e assistência técnica e tudo o mais que for necessário ao bom e fiel cumprimento deste mandato, conferindo EXCLUSIVAMENTE ao primeiro outorgado, **Vitor Hugo de Oliveira**, o poder especial de apresentar pedidos de renúncia daqueles ativos de propriedade intelectual que tenham sido objeto de decisão favorável da Diretoria Executiva da Embrapa nesse sentido, sendo vedado o subestabelecimento dos poderes ora concedidos.

Brasília-DF, 06 de abril de 2015.

MAURÍCIO ANTÔNIO LOPES
Presidente da Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Parque Estação Biológica - PqEB Av. W3 Norte (Final)
Ed. Sede Caixa Postal 8605 - CEP 70770-901 - Brasília - DF
Tel: (61) 3448-4433 - Fax: (61) 3347-1041
www.embrapa.br



4º. OFÍCIO DE NOTAS DE BRASÍLIA
W/3 NORTE QD. 504 - ED. MARIANA-TERRED
BRASÍLIA-DF - FONE: (0XX61) 3326-5234

RECONHECO e dou fe por AUTENTICIDADE
a(s) firma(s) de:
[0307819]-MAURICIO ANTONIO LOPES.....

Em testemunho da verdade.
BRASÍLIA, 09 de Abril de 2015
Selo: TJDFT20150090454727XGPS
Disponível no site www.tjdft.jus.br

042-ALISSON JACINTO DE MOURA
ESCREVENTE AUTORIZADO
IMDS hora da impressão: 15:07:35

Leônidas Fabiano R. Cruz
4º Ofício de Notas de Brasília DF
Escrevente Autorizado

Relatório Descritivo do Certificado de Adição de Invenção para “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA, FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA, USO DE FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA”.

[1] Certificado de Adição de Invenção do pedido de patente BR102012033149-7, depositado em 26/12/2012.

[2] O presente certificado de adição se refere a um aperfeiçoamento da invenção descrita e reivindicada no referido pedido BR102012033149-7. A invenção objeto de BR102012033149-7 se enquadra no contexto da química verde e se refere genericamente a uma formulação fertilizante e fitoprotetora e, em uma modalidade particular, a uma formulação formadora de filmes e indutora da resistência de plantas. A respectiva formulação, quando aplicada em plantas e/ou frutos resulta na formação de filme na superfície do material, o qual possui a característica de fotoproteção contra as radiações UV-B e UV-C, resistência mantida na água mesmo após alta higroscopicidade, maior estabilidade sob temperaturas ambientais elevadas, formação de porosidade desejada e homogeneidade de superfície.

FUNDAMENTOS DO CERTIFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO

[3] Dentre as principais afecções que afetam a cavidade oral estão a cárie, a gengivite, a periodontite e as estomatites aftosas. A cárie dentária é uma infecção microbiana dos tecidos calcificados dos dentes, um processo dinâmico caracterizado por perda mineral, que ocorre sempre que o equilíbrio entre a superfície dentária e o fluido da placa resultante da metabolização de carboidratos fermentáveis pelos microrganismos é alterado (OLIVEIRA, F.Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17(3). p. 466-476, 2007).

[4] A cárie é uma doença infectocontagiosa, de caráter crônico e multifatorial. Sabe-se da indispensabilidade de microrganismos na superfície dental para que tenhamos o desenvolvimento da doença cárie, porém só a presença deles não é o bastante. Fatores como higiene, hábitos alimentares, colonização bacteriana, composição da saliva, entre outros, influenciam o metabolismo das bactérias sobre os dentes, modulando a atividade

da cárie (LEITES, A.C.B.R. et al. Aspectos microbiológicos da cárie dental. Salusvita, Bauru, v. 25, n. 2, 2005).

[5] A cárie dentária é o problema bucal mais comum em seres humanos. Os microrganismos do gênero *Streptococcus* são os principais agentes etiológicos da cárie dentária. *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *S. mutans* são os principais colonizadores do biofilme dental. *S. mutans*, *S. sobrinus*, e os *Lactobacillus* são todos capazes de produzir um meio ácido, causando a desmineralização do esmalte do dente (LEITES, A.C.B.R.; et al. Aspectos microbiológicos da cárie dental. Salusvita, Bauru, v. 25, n. 2, 2005).

[6] Na estomatite aftosa ou candidíase há o desenvolvimento de ulcerações recidivantes dolorosas, solitárias ou múltiplas na mucosa bucal. Essa afecção pode ser desenvolvida por vários fatores locais, incluindo irritações crônicas locais, mau adaptação à prótese dentária, alterações na ecologia microbiana, devido ao uso de fármacos (AZEVEDO IZIDORO A.C.S, et al. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. Archives of Oral Biology, v. 57, p.148-153, 2012).

[7] Muitos produtos estão sendo desenvolvidos para o controle das infecções que afetam a cavidade oral, para o controle de cárie, os primeiros produtos desenvolvidos foram à base de flúor, com ação remineralizante, seguido pela clorexidina com atividade antimicrobiana (STROHMENGER, L. & BRAMBILLA, E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review, Oral Diseases. n. 7. p. 71-80, 2001). Já para o tratamento das infecções orais fúngicas, a Nistatina e a Anfotericina B são os fármacos antifúngicos de primeira escolha no tratamento de candidíase oral (Iqbal Z, Zafar MS. Role of antifungal medicaments added to tissue conditioners: A systematic review. J Prosthodont Res (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2016.03.006>).

[8] Para o controle da placa e gengivite a Clorexidina é considerada o padrão ouro em agentes quimioterápicos. No entanto, estes agentes antimicrobianos possuem seus efeitos adversos, que podem incluir coloração do dente e da restauração, coloração dos tecidos moles, aumento da deposição de cálculo, sabor desagradável, alteração do paladar, sensação de queimação, descamação e irritação da mucosa, o que tem impedido o seu uso diário para a higiene oral (RAHMANI-BADI, A.; SEPEHR, S.; BABAIE-

NAIEJ, H. A combination of cis-2-decenoic acid and chlorhexidine removes dental plaque. *Archives of Oral Biology*. v.60, p.1655–1661, 2015).

A. Além disso, a cavidade oral apresenta desafios adicionais quanto ao seu tratamento, como por exemplo: a ação diluidora da saliva e as concentrações subterapêuticas consequentes dessa ação; a difícil administração local de antifúngicos e/ou antibacterianos é um desafio clínico já enfrentado pelos profissionais.

B. O veículo para estas substâncias antimicrobianas varia de acordo com a sua aplicação clínica e pode ser encontrada como enxaguatórios, géis ou vernizes, (Strohmenger L, Brambilla E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review, *Oral Diseases*. n. 7. p. 71-80, 2001).

C. Uma das diversas abordagens utilizadas na promoção da saúde bucal é o revestimento da superfície do dente ou da mucosa oral com uma formulação líquida de secagem rápida, capaz de formar uma espécie de filme. Para tal procedimento. Os vernizes são formulações farmacêuticas que aderem à superfície do dente formando um filme, liberando lentamente uma substância antimicrobiana no meio bucal. Essa capacidade de formar um filme se dá através de um polímero, e dentre os mais usados está o de etilcelulose e uma mistura de copolímero acetatos e vinil-copolímeros acrilatos. No entanto, esses copolímeros não são biodegradáveis e são citotóxicos (MORAIS, F. A. I.; MELLO, B. A.; SOUZA, I. A.; PONZI, E. A. C.; REVOREDO, G. A. Polímeros a base de metil metacrilato. Importância em odontologia, *Indian Journal of Dentistry*. v. 6, p. 63-66, 2007).

D. A patente PI 1005619-0 A2 descreve formulações farmacêuticas poliméricas capazes de veicular própolis, seu processo de preparação e aplicação. As formulações apresentadas podem ser produzidas a partir de polímeros naturais (por exemplo, quitosanas, celulose e derivados) ou sintéticos (por exemplo, derivados do ácido metacrílico), podendo ser utilizadas sobre a superfície do dente para a prevenção de cáries ou sobre superfícies mucosas para tratamento de doenças inflamatórias e bacterianas diversas, como aftas, periodontite e herpes.

E. Os produtos usados para o tratamento das afecções orais encontrados no mercado são os vernizes e géis fluoretados, e as soluções de nistatina e de clorexidina para uso tópico, entre outros fármacos. Esses produtos podem apresentar desvantagens

relacionadas ao seu uso como, por exemplo, a toxicidade dos polímeros sintéticos e o desenvolvimento de resistência microbiana aos princípios ativos.

[14] Os efeitos adversos da clorexidina podem incluir coloração do dente e da restauração, coloração dos tecidos moles, aumento da deposição de cálculo, sabor desagradável, alteração do paladar, sensação de queimação, descamação e irritação da mucosa, o que tem impedido o seu uso diário para a higiene oral.

[15] O uso prolongado de antimicóticos na terapia de candidíase oral dá origem a problemas relacionados com a resistência aos medicamentos de fungos. Toxicidade, interações fármaco-fármaco, e pode aumentar a resistência fúngica, portanto, a necessidade de novas terapias é necessária.

[16] A utilização do flúor tem se mostrado seguro e indicado quando se deseja reverter e prevenir lesões de cáries, mas se faz desnecessário quando não há necessidade de remineralização do dente.

[17] A quitosana é um derivado da quitina, composto natural que pode ser encontrado em exoesqueletos de artrópodes, conchas de crustáceos e cutículas de insetos. Industrialmente, pode ser obtida através da hidrólise alcalina da quitina. As propriedades da quitosana são muito importantes na área odontológica, pois é biocompatível e biodegradável.

[18] Tendo em vista esses problemas e no propósito de superá-los foram desenvolvidas formulações à base de extrato pirolenhoso destilado e quitosana, e adição de minerais como cobre, silício e flúor, as quais consistem em oferecer potencial antimicrobiano e efeito anticariogênico e tratar doenças infecciosas orais.

[19] As formulações possuem a capacidade de secagem rápida e podem ser aplicadas sobre a superfície do dente para a prevenção de cáries ou sobre superfícies mucosas para tratamento de doenças inflamatórias e bacterianas e fúngicas diversas, como candidíase, aftas e periodontite.

SUMÁRIO DO CERTIFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO

[20] A formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora do pedido BR102012033149-7 foi utilizada na preparação de formulações para prevenir e tratar infecções causadas por microrganismos da cavidade oral, mais especificamente *Candida*

albicans, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*. Todas as formulações reivindicadas neste certificado de adição compreendem a adição de extrato pirolenhoso destilado e quitosana nas concentrações entre 0,05 g/L a 30 g/L. As formulações podem conter minerais como silício, boro, molibdênio, manganês, zinco, cálcio ou cobre, em concentrações de 2 a 20 mg/L. As formulações também podem compreender o sal de flúor (NaF) na concentração de 5%.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[16] A Figura 1 mostra o efeito na inibição da linha celular NIH/3T3 exposta por 24 horas de contato com diferentes formulações antimicrobianas na concentração de 1500µg/mL (Controle: sem aplicação de nenhuma formulação; EPD: extrato pirolenhoso destilado; EPDQ 1%: extrato pirolenhoso destilado + 1% quitosana; EPDQ 3%: extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana; EPDQ 3% + Cu: extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + Cobre (2g/L); EPDQ 3% + Si: Extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + Silício (20mg/L); EPDQ 3% + Flúor: extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + NaF 5%). Os dados são expressos como médias $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (u.a. – absorbância de 492nm). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as formulações testadas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo pelo teste de Tukey. MTT: brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio.

[17] A Figura 1 mostra o efeito na inibição da linha celular NIH/3T3 exposta por 24 horas de contato com diferentes formulações antimicrobianas na concentração de 7500µg/mL (Controle: sem aplicação de nenhuma formulação; EPD: extrato pirolenhoso destilado; EPDQ 1%: extrato pirolenhoso destilado + 1% quitosana; EPDQ 3%: extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana; EPDQ 3% + Cu: extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + Cobre (2g/L); EPDQ 3% + Si: Extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + Silício (20mg/L); EPDQ 3% + Flúor: extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + NaF 5%). Os dados são expressos como médias $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (u.a. – absorbância de 492nm). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as formulações testadas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado

significativo pelo teste de Tukey. MTT: brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO CERTIFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO

[18] O certificado de adição de invenção foi desenvolvido a partir da invenção descrita no pedido de patente BR102012033149-7 depositada em 26/12/2012.

[19] A referida invenção do pedido de patente BR102012033149-7 utiliza um subproduto do processo de obtenção de carvão a partir da queima da madeira para, após tratamento específico, utilizá-lo em combinação com quitosana e minerais específicos obtendo-se uma formulação que, após aplicação em plantas, possui características desejáveis e até então não atingidas plenamente por produtos similares tais como indução da resistência sistêmica, ação fungitóxica e nematicida comprovada, formação de filme na superfície da planta após a pulverização, fotoproteção contra as radiações UV-B e UV-C, resistência do filme mantida na água mesmo após alta absorção, maior estabilidade do filme sob temperatura ambiental elevada, formação de porosidade desejada e homogeneidade de superfície fotoprotetora.

[20] A formulação é termicamente estável até 60 °C e o filme resultante perde uma pequena quantidade de água sob aquecimento, mas é termicamente estável em uma ampla faixa de temperatura, sofrendo decomposição somente a 300 °C. O filme apresenta estrutura semicristalina que lhe confere flexibilidade e porosidade, características desejáveis nos processos de penetração de água e trocas gasosas.

[21] O presente certificado de adição se refere ao uso de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora descrita no documento BR102012033149-7 na preparação de um medicamento para prevenir e tratar infecções causadas por microorganismos da cavidade oral. Mais especificamente, a formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora é utilizada na preparação de um medicamento para prevenir e tratar infecções causadas por *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*. Em uma concretização preferida da invenção, a formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora compreende extrato pirolenhoso destilado. Em outra concretização preferida da invenção, a referida formulação fitoprotetora compreende extrato

pirolenhoso destilado e quitosana. Preferencialmente, a concentração de quitosana na formulação varia de 0,05 g/L a 30 g/L.

[22] Outra concretização da invenção, se refere ao uso da formulação fitoprotetora na preparação de um medicamento para prevenir e tratar infecções causadas por microorganismos da cavidade oral onde, tal formulação compreende, ainda, minerais.

[23] Preferencialmente, a formulação fitoprotetora compreende, pelo menos, um mineral selecionado dentre silício e/ou boro e/ou molibdênio e/ou manganês e/ou zinco e/ou cálcio e/ou cobre. Em uma concretização particular, a formulação compreende cobre na concentração de 2g/L. Em outra concretização particular a formulação compreende silício na concentração de 20 mg/L

[24] O presente certificado de adição também se refere ao uso da formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora descrita anteriormente, na preparação de um medicamento para prevenir e tratar infecções causadas por microorganismos da cavidade oral onde, tal medicamento compreende sal de flúor. Em uma concretização preferencial, o sal de flúor é o sal NaF. Em uma concretização ainda mais preferencial, a concentração de NaF no medicamento é de 5% em peso.

[25] Em todas as formulações o extrato pirolenhoso destilado é o diluente e foi adicionado quitosana como polímero. As formulações exemplificadas neste certificado de adição que demonstraram maior capacidade de inibir os microorganismos *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* estão listados na Tabela 1.

[26] Tabela 1. Caracterização das formulações antimicrobianas testadas para uso oral.

Caracterização dos filmes	Abreviaturas
Extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana	EPDQ 3%
Extrato pirolenhoso destilado + 1% quitosana	EPDQ 1%
Extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + Cu (2g/L)	EPDQ 3% + Cu
Extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + Si (20mg/L)	EPDQ 3%+ Si
Extrato pirolenhoso destilado + 3% quitosana + NaF 5%	EPDQ 3% +NaF 5%
Extrato pirolenhoso destilado	EPD
Verniz comercial	NaF 5% (controle)

[27] As formulações da Tabela 1 demonstraram excelente capacidade de inibir os microorganismos citados *in vitro*, em pequenas concentrações, e possuem capacidade para prevenir e tratar as infecções causadas por esses microorganismos orais. O verniz comercial fluoretado foi testado como controle.

[28] Estão especificados neste certificado de adição todos os exemplos dos bioensaios que foram realizados, comprovando a eficácia das formulações reivindicadas para a prevenção e controle de microrganismos orais.

BIOENSAIOS REALIZADOS

[29] Para a realização dos bioensaios foram selecionados 100 incisivos bovinos permanentes sem fraturas no esmalte dental. Os dentes foram limpos e seccionados com broca tipo trefina de núcleo de diamante sob irrigação ao nível do terço médio da coroa, a fim de obterem-se discos de esmalte padronizados (5mm diâmetro). Foi realizada a padronização em espessura (2,3mm) com a planificação da superfície com discos de lixa (granulometrias 320, 600, 1200, e 1500) e polimento com feltro e pasta diamantada em politriz.

[30] Para o teste de contato direto, os ensaios foram conduzidos *in vitro*. A metodologia do teste de contato direto foi realizada de acordo com os protocolos existentes no estado da técnica. Os microrganismos utilizados para este projeto são provenientes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas: *Candida albicans* (ATCC 63423), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e microrganismos orais totais (saliva). Para isso foram feitos repiques 48 horas antes das cepas bacterianas e fúngicas selecionadas em meio de cultura BHI ágar. Esses repiques foram levados à estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, 15 mL de BHI ágar foram semeados obedecendo-se a escala 0.5 de Macfarland (1x10⁸ CFU/mL).

[31] Para o teste de contato direto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços e este foi feito em triplicata. O controle positivo foi o inóculo sem o extrato e o controle negativo foi o extrato sem inóculo. Os extratos foram testados em cinco concentrações: 1500, 3000, 4500, 6000 e 7500µg. Cada extrato nas devidas concentrações foi depositado no fundo de cada poço da placa de teste e quando os mesmos estavam secos foi adicionado 10µL do inóculo em cada poço. Essa placa então foi levada à estufa a 37°C por 1h e 24h. Foi adicionado a cada poço 240µL de meio de cultura BHI caldo e a placa foi agitada por 3 minutos. Foram captados de cada poço 100µL que foram submetidos à diluição seriada para posterior contagem das cepas.

[32] Nas tabelas 2, 3 e 4 podem-se observar os potenciais de inibição das formulações nos tempos de uma hora e de 24 horas de exposição nos testes de contato direto. Após 24 horas de exposição todas as formulações contendo as formulações testadas a base de quitosana foram efetivos como antimicrobiano oral em todas as concentrações usadas. As formulações demonstram um potencial antimicrobiano oral já com uma hora de exposição, sendo os resultados comparáveis ao encontrados com o verniz comercial. A adição de flúor ao filme potencializou a ação antimicrobiana contra os agentes causadores de cárie *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* em uma hora de exposição inibindo mais de 97% até nas concentrações mais baixas testadas.

[33] Tabela 2. Efeito da aplicação das formulações antimicrobianas na inibição (%) sobre *Candida albicans*, no teste de contato direto.

Formulações ^a Tempo	1 hora					24 horas					
	Concentração (µg)	7500	6000	4500	3000	1500	7500	6000	4500	3000	1500
EPDQ 3%	24	32	23	13	45	100	100	100	100	100	100
EPDQ 1%	50	21	24	43	46	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% + Cu	100	99	100	74	100	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3%+ Si	19	4	9	44	45	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% +NaF 5%	27	96	78	67	32	100	100	100	100	100	100
EPD	86	86	91	56	32	100	100	100	100	100	100
NaF 5%	0					100					

^aFormulações: ver Tabela 1.

[34] Tabela 3. Efeito da aplicação das formulações antimicrobianas na inibição (%) sobre *Streptococcus mutans*, no teste de contato direto.

Formulações ^a Tempo	1 hora					24 horas					
	Concentração (µg)	7500	6000	4500	3000	1500	7500	6000	4500	3000	1500
EPDQ 3%	98,8	95,1	90,5	99,5	98,7	100	100	100	100	100	100
EPDQ 1%	97,2	99,3	99,2	99,4	94,7	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% + Cu	97,7	99,9	99,8	99,9	99,6	100	99,9	100	100	100	100
EPDQ 3%+ Si	94,2	91,8	93,7	93,8	74,6	100	99,8	100	100	100	100
EPDQ 3% +NaF 5%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EPD	94,6	93,0	91,3	91,9	59,5	100	100	99,9	99,9	100	100
NaF 5%	97,5					99,9					

^aFormulações: ver Tabela 1.

[35] Tabela 4. Efeito da aplicação das formulações antimicrobianas na inibição (%) sobre *Lactobacillus acidophilus*, no teste de contato direto.

Formulações ^a Tempo	1 hora					24 horas					
	Concentração (µg)	7500	6000	4500	3000	1500	7500	6000	4500	3000	1500
EPDQ 3%	29,2	93,4	NI	10,8	19,9	100	100	100	100	100	100
EPDQ 1%	81,8	71,1	42,3	61,7	56,9	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% + Cu	92,0	98,9	98,5	90,1	66,3	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3%+ Si	32,7	NI	NI	17,0	NI	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% +NaF 5%	87	93	86	87	90	100	100	100	100	100	100
EPD	52,0	30,3	NI	NI	NI	100	100	100	100	100	100
NaF 5%	100					100					

^aFormulações: ver Tabela 1.

NI: não houve inibição.

[36] Para o teste de viabilidade celular (MTT), as células que foram usadas para o ensaio de citotoxicidade foram células comerciais de fibroblastos de camundongos da linhagem NIH/3T3 imortalizadas, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ). As células foram cultivadas em meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS), adquirido a Vitrocell Embriolife (Campinas, SP, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, EUA), respectivamente. As células foram crescidas a 37°C numa atmosfera com 95% de ar umidificado e 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados com células na fase de crescimento logarítmico. A viabilidade das células NIH/3T3 será determinada medindo a redução do brometo de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] solúvel em formazan insolúvel em água.

[37] A suspensão das células do teste de viabilidade celular foi plaqueada em uma concentração de 2×10^4 células por poço e distribuídas em uma placa de cultura celular (ELISA) de 96 poços. Cada poço recebeu 200µL de DMEM completo. A placa foi então incubada a 37°C, em ar a 5% CO₂, por 24 horas. Após este período o meio de cultura foi removido dos poços e volumes iguais (200µL) dos vernizes foram adicionadas em cada poço. Nos poços controles, 200µL de DMEM serão adicionados. Após a remoção dos vernizes testes, 200µL de PBS e 20µL de MTT (sal de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo] foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada em sem luminosidade por 24 horas a 37°C. Então o MTT foi

aspirado e 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço subsequentemente, a absorbância a 570nm foi medida usando um espectrofotômetro e os resultados analisados estatisticamente.

[38] Para o teste de viabilidade celular, foram utilizadas microplacas de 96 poços.

Em cada poço foram adicionadas 2×10^4 células suspensas em 100µL de DMEM e a placa incubada em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com 100µL de diferentes concentrações do material experimental (1500 e 7500µg) por 24 e 48 horas. Após este período, os produtos foram removidos e, em seguida, 180µL de DMEM e 20µL de MTT foram adicionados em cada poço e a placa incubada por mais 3 horas. Passado o período, o meio foi descartado e os cristais de formazan ressuspensos em 200µL de DMSO. Subsequentemente, os resultados foram lidos em leitor de microplaca (MR-96A, Mindray Shenzhen, China) a um comprimento de onda de 492nm. Os valores de absorbância foram considerados como indicadores da viabilidade celular e a porcentagem de inibição do crescimento das células determinada através da fórmula: % de inibição = $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ células tratadas} / \text{Abs}_{492} \text{ células controles}) \times 100$ (NEDEL et al., 2012). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos em tempos diferentes.

[39] Os resultados mostram que em concentrações de 1,500 µg/mL (Figura 1) e 7,500 µg/mL (Figura 2), os compostos testes não apresentam citotoxicidade frente à linhagem celular NIH/3T3, onde o composto EPD mostrou um aumento da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle, em ambas as concentrações ($P=0,03$ - 1,500 µg/mL; - $P=0,001$ - 7,500 µg/mL).

[40] Foram feitos testes de inibição dos microrganismos orais totais através do ensaio de biofilme microcosmos. Para a formação de biofilme, foi realizado um estudo *in vitro*, completamente aleatorizado, no qual foram formados biofilmes em placas de micropoços contendo as formulações a serem testadas. Os biofilmes foram crescidos por 5 dias sobre 10 discos para cada tipo de extrato ($n=10$), sendo que 3 experimentos foram realizados para cada formulação. Os biofilmes foram formados independentemente sobre os discos, os quais foram individualizados nos poços das placas (cada placa com 24 poços). O meio de cultura a ser utilizado foi o DDM (meio definido enriquecido com mucina, WONG, L.; SISSONS, C.H., Arch. Oral Biol., 2001,

46:477-486.), o qual contém íons, mucina, aminoácidos, vitaminas, e fatores de crescimento em concentrações baseadas na saliva humana.

[41] A metodologia adotada para inóculo e crescimento dos biofilmes é a mesma descrita por Filoche et al. (2007) (FILOCHE, S.K. et al. Oral Microbiol. Immunol. 22 (2):73-79, 2007). As placas de micropoços foram incubadas em anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, e 10% H₂). O meio de cultura foi substituído diariamente. Após 5 dias, os discos foram removidos dos poços, as células não aderidas foram removidas gentilmente por lavagem com solução salina estéril, e então os discos foram colocados em tubo contendo 1mL de salina estéril, e então sonicados para remoção do biofilme. Em seguida, as suspensões de biofilme foram diluídas serialmente para contagem de microrganismos totais e lactobacilos.

[42] A análise microbiológica do biofilme microcosmos foi realizada através de uma alíquota de 100µl da suspensão sonicada, a qual foi diluída em NaCl a 0,9% e diluições seriadas foram inoculadas em duplicata (gotas de 20µL) nos seguintes meios de cultura: Ágar Sangue para cultivo de microbiota anaeróbica total (MT); Mitis Salivarius

Ágar para determinação do total de estreptococos (ST); Ágar Mitis Salivarius (Bacitracina MSB), para contagem de *Streptococcus mutans* (SM) e Ágar Rogosa para contagem de lactobacilos. As placas foram incubadas em anaerobiose (96h). As unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas e os resultados expressos como UFC/mg de peso seco do biofilme.

[43] Os resultados do teste de biofilme microcosmos, a análise antimicrobiana, reforça o potencial antimicrobiano encontrado no teste de contato direto não havendo diferença estatisticamente significativa entre as formulações testadas contendo extrato pirolenhoso e o verniz comercial contendo flúor (Tabela 5).

[44] As formulações testadas não apresentaram citotoxicidade contra essa linhagem de células testadas nas concentrações onde demonstrou atividade antimicrobiana.

[45] Tabela 5. Resultados do biofilme microcosmos em UFC/mg em LOG 10 para a concentração de verniz de 7500 µg. Letras diferentes na coluna representam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,050$).

Formulações	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococci</i> Total	<i>Streptococcus mutans</i>	Microbiota anaeróbica total
EPDQ 3%	5,4 ($\pm 1,2$) ^u	5,5($\pm 1,1$) ^a	4,3($\pm 0,6$) ^a	8,9($\pm 0,2$) ^a
EPDQ 1%	5,7($\pm 1,2$) ^a	5,6($\pm 1,2$) ^a	4,2($\pm 0,6$) ^a	8,8($\pm 0,2$) ^a
EPDQ 3%+ NaF 5%	6,1($\pm 0,8$) ^a	6,3($\pm 0,6$) ^a	4,9($\pm 1,6$) ^a	8,6($\pm 0,6$) ^a
EPD	6,7($\pm 0,4$) ^a	6,5($\pm 0,4$) ^a	4,5($\pm 1,2$) ^a	8,9($\pm 0,2$) ^a
NaF 5%	5,7($\pm 1,1$) ^a	6,1($\pm 0,6$) ^a	4,5($\pm 1,7$) ^a	8,6($\pm 0,6$) ^a
Controle negativo	6,2($\pm 0,2$) ^a	6,3($\pm 0,5$) ^a	3,5($\pm 0,5$) ^a	8,6($\pm 0,4$) ^a

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora caracterizado por ser utilizado na preparação de um medicamento para prevenir e tratar infecções causadas por microorganismos da cavidade oral.
2. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por ser utilizado na preparação de um medicamento para prevenir e tratar infecções causadas por *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*.
3. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado por tal formulação compreender extrato pirolenhoso destilado.
4. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por a formulação compreender quitosana.
5. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 4 caracterizado por a concentração de quitosana na formulação variar de 0,05 g/L a 30 g/L.
6. Uso de formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5 e 6 caracterizado por a formulação compreender minerais.
7. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por compreender pelo menos um mineral selecionado dentre silício e/ou boro e/ou molibdênio e/ou manganês e/ou zinco e/ou cálcio e/ou cobre.
8. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 7 caracterizado por a formulação compreender cobre na concentração de 2g/L.
9. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 7 caracterizado por a formulação compreender silício na concentração de 20 mg/L.
10. Uso de formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 caracterizado por o medicamento compreender sal de flúor.
11. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 10 caracterizado por o sal de flúor ser o NaF.
12. Uso de formulação de acordo com a reivindicação 11 caracterizado por a concentração de NaF do medicamento ser de 5% em peso.

RESUMO. Certificado de Adição de Invenção para “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA, FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA, USO DE FORMULAÇÃO COM CAPACIDADE FERTILIZANTE E FITOPROTETORA”. O presente

certificado de invenção apresenta formulações antimicrobianas para uso odontológico, compreendendo o extrato pirolenhoso destilado e/ou quitosana e/ou adição de minerais como cobre, silício e sal de flúor. As formulações são: extrato pirolenhoso destilado com a adição de quitosana nas doses de 1 e 3% e opcionalmente a adição de minerais como cobre (2g/L), silício (20mg/L) e/ou sal de flúor (NaF 5%). As formulações apresentam efeito anticariogênico e tratando doenças infecciosas orais causadas por microrganismos como *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*.

1/1

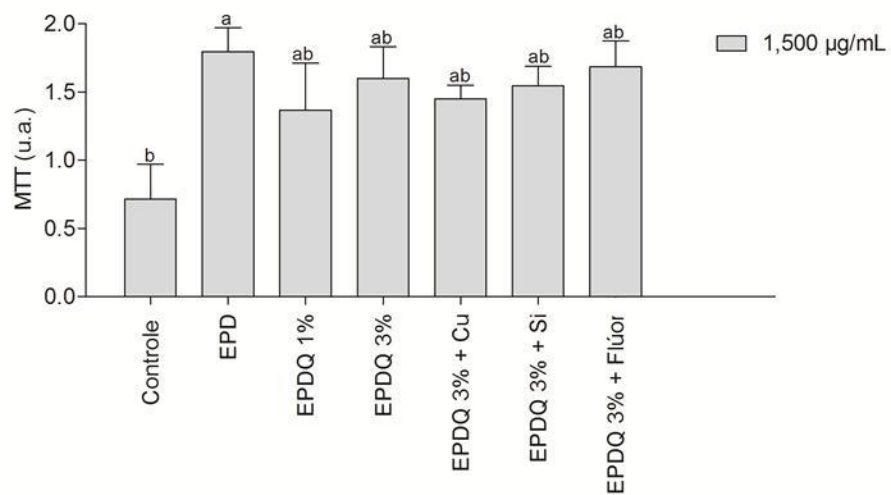
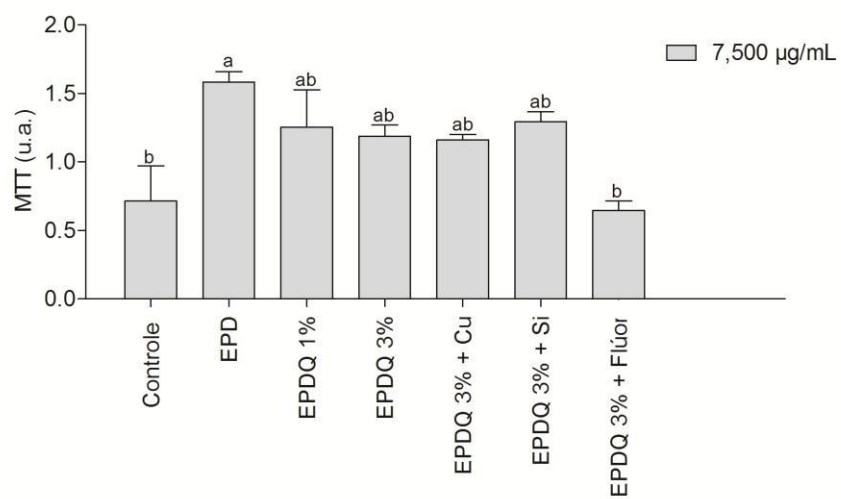


FIGURA 1



FIGURA

5. Artigos Científicos

5.1 Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technology prospecting.

5.2 Antimicrobial and cytotoxic potencial in vitro of films of *Eucalyptus grandis* pyroligneous extracts and chitosan for oral applications

5.3 Biological potential and mechanical characterization of a detin-bonding system containing *Eucalyptus grandis* pyroligneous extract.

5.1 Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technology prospecting.

Juliana L. S. Souza, Victoria B. S. Guimarães, Angela D. Campos, Rafael G. Lund.

Artigo **aceito para publicação** no periódico ***Brazilian Journal of Microbiology***
em 01 de julho de 2018 conforme ANEXO II

Antimicrobial potential of pyroligneous extracts—a systematic review and technological prospecting

Antimicrobial activity of pyroligneous extracts

Juliana Leitzke Santos de Souza¹, Victoria Burmann da Silva Guimarães², Angela Diniz Campos³ and Rafael Guerra Lund^{1,2*}.

¹Post-Graduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, ²Laboratory of Oral Microbiology, Pelotas Dental School, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil and ³Brazilian Agricultural Research Corporation Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply, Pelotas, RS, Brazil

ABSTRACT

Pyroligneous extract (PE) is applied in diverse areas as an antioxidant, an antimicrobial, and an anti-inflammatory agent. The discovery of new cost-effective antimicrobial agents of natural origin remains a challenge for the scientific community. This study aimed to conduct a systematic review and a technological forecasting of the existent evidence regarding the use of PE as a potential antimicrobial agent. Studies were identified through an investigation of various electronic databases: PubMed, SciFinder, Web of Science, Scopus, Scielo, Google scholar, and ProQuest. Patents were searched through INPI, Google patents, Espacenet, Patents online, USPTO, and WIPO. The literature on antimicrobial activity of PE are limited given the short duration of studies and variability in study design, use of pyroligneous preparations, and reports on results. However, evidence suggests the potential of PE as a natural antimicrobial agent. The most studied activity was the role of PE as a food preservative. However, *PEs* are also effective against pathogenic bacteria in the oral microflora and treatment of candidal infections. Further research is needed using standardized preparations of *PEs* to determine their long-term effectiveness and ability as antimicrobial agents.

Keywords: food preservation, antimicrobial, infections, preservative, pharmaceutical.

Introduction

Pyroligneous extract (PE), also called pyroligneous acid, liquid smoke, or wood vinegar, is a crude condensate produced from the distillation of smoke generated in wood carbonization. This extract is a complex mixture of compounds derived from the chemical breakdown of wood components through the condensation of vapors and gases generated during the pyrolysis of a limited amount of oxygen (IBRAHIM et al., 2014a). PE is a complex and highly oxygenated aqueous liquid fraction; it results from the thermochemical breakdown or pyrolysis of plant biomass components, such as cellulose, hemicellulose, and lignin (MATHEW; ZAKARIA, 2015; WU et al., 2015).

PE finds application in diverse areas, acting as an antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory agent. PE also acts as a source of valuable chemicals and imparts a smoky flavor and antimicrobial protection in food (MATHEW; ZAKARIA, 2015). PE has been reported to possess extreme antifungal activity against several plant pathogenic fungi (ORAMAHI; YOSHIMURA, 2013) and a termiticidal activity (YATAGAI, 2004). Several researchers have reported the antibacterial activity of PE against several pathogenic bacteria, including plant pathogens (HWANG et al., 2005). Recently, the medicinal use of PE has been studied intensively in the field of oriental medical science, where some natural resources have been used for investigating biological activities (IBRAHIM et al., 2013). However, the antimicrobial potential of PE against human and animal pathogenic microorganisms has not been elucidated. Therefore, the present work is carried out to evaluate the antimicrobial potential of PE against human and animal pathogenic microorganisms and organize its present status. PE, a by-product of charcoal-making and often considered as waste, was selected because of its availability in Rio Grande do Sul, Brazil.

Systematic reviews are considered the gold standard for evidence and used to evaluate the benefits and harms of healthcare interventions (PUSSEGODA et al., 2017). Such reviews are much more likely to yield valid conclusions (COOK et al., 1995). The levels of evidence of the studies are ranked according to the degree of confidence, which is related to the methodological quality. Thus, systematic review of the literature occupies the top of the pyramid, followed by randomized clinical trials, cohort studies, case-

control, case series, case reports, and lastly, expert opinion and research in animals or *in vitro* (COOK et al., 1993). This study aimed to search the various electronic databases for articles and online systems of patents and included assays of PE antimicrobial potential for humans and animals.

Material and methods

Eligibility criteria: The inclusion criteria comprised articles and patents that investigated the antimicrobial activity of PE against pathogenic microorganisms of humans and animals.

Information sources and search

This systematic review was conducted according to the guidelines of the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (HIGGINS; ALTMAN, 2011), following the four-phase flow diagram of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement (MOHER et al., 2015). This report is based on the PRISMA Statement. The following databases were screened: MedLine (PubMed), SciFinder, Web of Science, Scopus, Scielo, Google scholar, and ProQuest. For patents, the sources searched comprised the following: INPI, Google patents, Espacenet, Patents online, USPTO, and WIPO.

The search strategy is described in **Table 1**, and the focused question is as follows: *What is the antimicrobial potential of PE against human and animal pathogenic microorganisms?*

Study selection and data collection

Study characteristics, demographic information, enrollment criteria, microorganisms tested, antimicrobial assay types, duration, results, control and groups, and sample size (Table 2 and 3) were extracted independently for two reviewers (J.L.S.S. and V.B.S.G.). Missing information was sought from authors and/or inventors. The full text papers and patents were assessed independently and in duplicate by the reviewers. Any disagreement on the eligibility of studies included was resolved through discussion and consensus, and in case of disagreement, a third reviewer (R.G.L.) decided whether the article should be included. All titles and abstracts of articles and patents initially found were analyzed and selected in accordance to the eligibility criteria. No restrictions were considered regarding the language and year of publication. The reference

lists of studies included were hand-searched for additional articles. Full copies of all potentially relevant studies were identified. Studies that met the inclusion criteria or for which insufficient data were available in the title and abstract to make a decision were selected for full analysis. Authors of the studies were contacted in case of missing data (e.g., data provided in graphs); these studies were only included if the authors provided the missing information. Data extraction was conducted by consensus between the two researchers who conducted the collection.

Assessment of risk of bias

The risk of bias for all the included studies was assessed based on The Cochrane Collaboration's tool (HIGGINS; ALTMAN, 2011), and the methodological quality was adapted from another systematic review of antimicrobial monomers used in dental materials (COCCO et al., 2015). The parameters used for the evaluation of methodology assays were discussed by the researchers involved, and judgment was carried out by group discussion. Assessment of risk of bias was conducted using Review Manager 5.3 software.

Results

Results of searches

After database screening [Pubmed (16), Scopus (8), SciFinder (27), Web of Science (9), Scielo (0), Google scholar (34), and ProQuest (3)] and removal of duplicates, 89 studies were identified. After title and abstract screening, 29 studies remained, and this number was reduced to 14 after careful examination of the full texts. The last electronic search was conducted on December 4th, 2017. **Figure 1** shows a flowchart summarizing the selection process of articles and patents.

Of the 89 articles initially recovered from all databases, 75 articles were excluded because they were not related to the antimicrobial activity of PE and failed to satisfy the selection criteria. A total of 60 articles were excluded after reading the title and abstract, and 12 were excluded after screening the full text because they tested properties other than antimicrobial pathology for humans or animals. One study tested an intestinal protozoan parasite that causes diarrhea in both humans and domestic animals (WATARAI; TANA; KOIWA, 2008); one article used an agent accelerating the growth of plants and the development of roots (ZHAI et al., 2010). PE has been studied as a repellent and insecticide

against insect pests to crops (YATAGAI, 2004), as an antimicrobial agent for wood fungi, and as a weed control agent (HWANG et al., 2005; LEE et al., 2010; ORAMAHI; YOSHIMURA, 2013; VELMURUGAN et al., 2009a; VELMURUGAN; HAN; LEE, 2009; WEI; MA; DONG, 2010). Two studies used the PE as phenol source and tested the antibacterial activity of separate components (LEBOIS et al., 2004; THURETTE et al., 1998). In addition, two articles were excluded as the researchers featured no access to full text versions (QIN; XIHAN; TAO, 2008; WANG; CAO, 2014), and one article was a review study (LINGBECK et al., 2014a).

In the patent databases, INPI (0), Google patents (0), Espacenet (7), patents on line (44), USPTO (11), and WIPO (7), the search strategy initially retrieved 69 patents. After removal of duplicates, this number was reduced to 37. A total of 25 articles were excluded after reading the titles and abstracts (Fig. 1) as they were not related to PE. Of the remaining 12 patents, 1 patent was excluded because it reported a promoter of environmental properties in soil, plants, and fish (WADA, 1994). Twelve patents were included in the analysis.

Study characteristics

Table 2 describes the microorganisms tested, the source of PE, concentrations, methodologies used and the application area for each study from articles, and patents selected in the search. **Table 3** shows the data of the patents included in this review.

All articles were published between 1998 and 2014. Most studies showed different cellulose sources to burn and generate different types of PE for its test as an antimicrobial agent. Several sources were commercial extracts (GEDELA; ESCOUBAS; MURIANA, 2007; HARADA et al., 2013; IBRAHIM et al., 2013, 2014a; LINGBECK et al., 2014b; MARUMOTO et al., 2012; MILLY; TOLEDO; CHEN, 2008; MILLY; TOLEDO; SREEKUMAR RAMAKRISHNAN, 2005; SUÑEN, 1998; SUÑEN; FERNANDEZ-GALIAN; ARISTIMUÑO, 2001), and others were experimental extracts (GAO et al., 2011; KIM et al., 2012; WEI; MA; DONG, 2010). One study tested microbial strains isolated from dogs and cats (HARADA et al., 2013). One article analyzed four strains of pathogenic *Candida albicans*, which were isolated from patients suffering from urinary tract infection (two strains), vaginitis, and onychomycosis (one each) (IBRAHIM et al., 2013),

and one tested another *C. albicans* strain (SUÑEN, 1998). One study tested PE as an agent to prevent viral epidemics in agricultural and human environments (MARUMOTO et al., 2012). Various studies reported PE as a food preservative (KIM et al., 2009; LINGBECK et al., 2014b; MILLY; TOLEDO; CHEN, 2008; SUÑEN, 1998; SUÑEN; FERNANDEZ-GALIAN; ARISTIMUÑO, 2001; VAN LOO et al., 2012). Only one *in vivo* study used *Salmonella*-infected Balb/c mouse model (KIM et al., 2012). All *in vitro* studies reported the bacterial or antifungal activity of PE. The methods used for the tests included disc diffusion and minimum inhibitory concentration. The growth profile of the bacteria was examined via time-kill and viral inactivation assays (MARUMOTO et al., 2012).

Regarding patent documents, the data showed 11 patents deposited from 1981 to 2009. Antibacterial, antifungal, and preservative proprieties of PE were found in these patents, which claimed PE incorporation into additives for the treatment of animal feedstuffs, (TRIBBLE; ROSE, 1981), fiber-reinforced cellulosic food casing (CHIU, 1983), compositions for food preservation (BAKAL, 2008; LINDNER, 1991; MOELLER, PATRICK; RAMAKRISHNAM, 2004), carbon fiber (MATSUI, 1998), cosmetic composition (CHANG, 2003), biodeodorizing agent (KO et al., 2003), antimicrobial compositions (LEE et al., 2005), pharmaceutical composition for symptoms of atopic dermatitis (BYUN, 2007), and compositions for oral microbes (WU; BEDFORD; RILEY, 2007).

Discussion

From the literature reviewed, most researchers have reported promising results for PE as an antimicrobial agent. The most studied activity for PE was for food preservative, with seven articles (GEDELA; ESCOUBAS; MURIANA, 2007; LINGBECK et al., 2014b; MILLY; TOLEDO; CHEN, 2008; MILLY; TOLEDO; SREEKUMAR RAMAKRISHNAN, 2005; SUÑEN, 1998; SUÑEN; FERNANDEZ-GALIAN; ARISTIMUÑO, 2001) and five patents presenting related results (CHIU, 1983; LINDNER, 1991; MOELLER, PATRICK; RAMAKRISHNAM, 2004; TRIBBLE; ROSE, 1981; WU; BEDFORD; RILEY, 2007). The PE was effective for the following microorganisms important for the food industry: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella muenster*, *Salmonella seftenburg*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia*

enterocolitica, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Aspergillus niger*. **Table 2** shows all the strains tested in each study. PE was used as antimicrobial in food preservation and has demonstrated abilities to reduce or inhibit pathogenic and spoilage organisms. Comparing results of studies presented difficulty given their various differences. These studies used different methodologies for the antimicrobial activity and for preparation of PE. Some studies provided no information on the preparations. Most commercial extracts were tested for use as food preservative; one was for viral epidemics, two for antibacterial activity, and another for antifungal infections.

Sunen *et al.* (1998) tested seven commercial preparations of PE used in food industry in Spain against *Listeria monocytogenes* and other pathogenic microorganisms (SUÑEN, 1998). In 2001, the same author tested four other commercial preparations of PE used in the Spanish food industry and evaluated their antimicrobial properties at low temperature against *A. hydrophila*, *Y. enterocolitica*, and *L. monocytogenes*. All four extracts effectively eliminated or suppressed the growth of *A. hydrophila* after 21 days (SUÑEN; FERNANDEZ-GALIAN; ARISTIMUÑO, 2001). Another study on food preservative examined the effects of selected PEs on the control of *L. monocytogenes* in frankfurters. Treatments with PE reduced and controlled *L. monocytogenes* growth in the most permissive franks for 10 weeks. (GEDELA; ESCOUBAS; MURIANA, 2007) Milly *et al.* (2008) used PE fractions applied on ready-to-eat meat products to control the growth of inoculated *L. innocua* M1 (MILLY; TOLEDO; CHEN, 2008).

In 2012, Van Loo *et al.* investigated the antibacterial activity of eight commercial PE samples against *S. enteritidis*, *S. aureus*, and *E. coli*, demonstrating that the commercial smokes inhibited the growth of these foodborne pathogens (VAN LOO *et al.*, 2012).

Harada *et al.* (2013) determined the maximum inhibitory dilutions of bamboo PE against 104 *E. coli*, 112 *Staphylococcus pseudintermedius*, and 58 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs and cats. The results indicated that bamboo pyroligneous acid exerts significantly inhibit the growth of representative bacterial pathogens from companion animals, although inhibition differed among species (HARADA *et al.*, 2013).

Bamboo PE-inactivated picornavirus and encephalomyocarditis virus showed that phenol is the sole germicidal component, and that acetic acid

augmented the phenol inactivating activity. These findings suggest that bamboo PE is a potentially useful agent to prevent viral epidemics in agricultural and human environments (MARUMOTO et al., 2012).

Ibrahim et al. (2013) tested the PE, concentrated PE, and dichloromethane extracts of CPA, namely, DCM A and B, against four pathogenic strains of *C. albicans*. The results exhibited significant inhibition zones. The results also revealed that extract DCM B of CPA showed the most significant potential as an anti-candidal agent (IBRAHIM et al., 2013). In 2014, the author concluded that *Rhizophora apiculata* PE may also be a broad antimicrobial agent against pathogenic bacteria (IBRAHIM et al., 2014b).

Other authors investigated the effects of temperature on antimicrobial properties of two commercial PE fractions and PE derived from pecan shells, against two common foodborne pathogens, *Listeria* and *Salmonella*. Understanding how storage temperature affects the efficacy of antimicrobials is an important factor that can contribute to reducing high levels and costs of antimicrobials and ultimately improve food safety for consumers (LINGBECK et al., 2014b).

Three papers reported the development of new experimental PE. They tested different kinds of cellulose as feedstock: walnut tree branches, *Eucommia ulmoides*, olive branch, and rice hull. Wei et al. (2010) prepared and collected PE by pyrolyzing walnut tree branches at three temperature ranges: 90 °C–230 °C, 230 °C–370°C, and 370 °C–450°C. All the PEs exhibited antibacterial activity. The high level of antibacterial activity of WP3 indicated that pyrolygneous acids collected at higher temperature feature stronger inhibition effects on bacteria (WEI; MA; DONG, 2010).

PE of *E. ulmoides* olive branch was collected at different temperature ranges: 90 °C–200°C, 200 °C–340°C, and 340 °C–520°C. The results showed that the maximum amount of the PE was collected at the range 200 °C–340°C and also showed the most anti-pathogenic activities. After the preliminary analysis, phenols were considered the active components of bacteriostatic activity (GAO et al., 2011).

A previously characterized rice hull PE was tested for bactericidal activity against *S. typhimurium* using the disc-diffusion method. The *in vivo* antibacterial activity of rice hull smoke extract (1.0%, v/v) was also examined in a

Salmonella-infected Balb/c mouse model. The combination of rice hull smoke extract and vancomycin acted synergistically against the pathogen. The beneficial results suggest that the rice hull PE possesses the potential to complement wood-derived smokes as antimicrobial flavor formulation for application in human foods and animal feeds (KIM et al., 2012).

Technology prospecting for PE as an antimicrobial agent: The patent search

Studies on PE in patents were older than articles. In 1981, PEs incorporating selective additives were used as antifungal and antibacterial preservative agents for the treatment of animal feedstuffs (TRIBBLE; ROSE, 1981). In 1983, PE was used in a fibrous reinforced cellulosic food casing with PE to provide antimycotic quality in the casing without separating antimycotic agent (CHIU, 1983). In 1991, a PE derivative product was applied to wieners post-peeling and before packaging to inhibit *L. monocytogenes* reinoculation and extend the shelf life of the wieners without adversely affecting their taste and/or edibility (LINDNER, 1991). In 2004 and 2008, other patents developed methods and compositions for antimicrobial treatment of food products (BAKAL, 2008; MOELLER, PATRICK; RAMAKRISHNAM, 2004).

The antimicrobial property of PE was used for the development of carbon fiber by soaking carbon fibers in a heat treatment solution mainly comprising PE from wood or bamboo (MATSUI, 1998). PE was also used as biodeodorizing agent composition containing a culture solution; the PE solution showed an excellent antimicrobial activity against putrefactive or pathogenic bacteria and a long-lasting deodorizing effect (KO et al., 2003).

Two studies developed antimicrobial products for skin; a cosmetic composition containing a PE solution featuring an antimicrobial activity and antioxidant activity as a main component was obtained and considered suitable for skin protection (CHANG, 2003). A pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis comprising refined PE was proven to avoid side effects, such as skin irritation and bad smell, by removing harmful materials and toxicity and improving antimicrobial activity (BYUN, 2007).

One patent developed a silver-ionized PE to enhance antimicrobial activity of PE against pathogenic bacteria: *E. coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Vibrio* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp.,

and *Candida* sp. (LEE et al., 2005). Another patent used PE against pathogenic microorganisms of oral cavity and provided compositions and methods to inhibit the growth of oral microbes and promote oral care (WU; BEDFORD; RILEY, 2007).

The examination of PE as an antimicrobial agent, the broad spectrum of its properties, with and without enhancing additives, was evaluated against heat-resistant, spore-forming, aerobic bacilli, gram-negative bacillus associated with avian, and human enteritis. Various saprophytic molds (mycelial fungi) are associated with animal feeds, spoilage and, in several instances, human and animal mycotoxicoses. In each instance, our findings indicate that PE effectively and irreversibly reduces natural and/or experimental microbial contaminants associated to animal feedstuffs (TRIBBLE; ROSE, 1981).

Cellulosic sources of PE

The cellulose sources reported in the studies included in this systematic review comprised woods of hickory, mesquite, apple, pecan, moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*), *Rhizophora apiculata*, walnut tree branches, and *Eucommia ulmoides* olive. Branch and rice hull and five studies presented no information about these cellulose sources.

Future prospects for PE

Further *in vivo* studies are required for the development of new products using PE and the investigation of its possible use as an antimicrobial agent against resistant pathogenic microorganisms and development of pharmaceutical medicines. Many pathogenic microorganisms are tested for use as food preservative; this extract demonstrated a remarkable antimicrobial potential but was not identified in *in vivo* studies for humans or clinical assays.

Conclusion

In conclusion, the evidence suggests that PE features an antimicrobial activity against pathogenic microorganisms for humans and animals. Its use is prolonged and safe in food products. However, only one study was conducted on animals, and no clinical case was found.

Acknowledgments

The authors wish thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personal (CAPES, Brazil) for the granting of Doctorate's scholarship for the first author.

340 **Funding sources**

341 This research did not receive any specific grant from funding agencies in
342 the public, commercial, or not-for-profit sectors.

343

References

- AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380–386, 2008.
- ANTUNES, J. L. F. et al. Oral health in the agenda of priorities in public health. **Revista de saúde pública**, v. 50, p. 57, 2016.
- BAE, J. H. et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 74, n. 2, p. 822–828, 2005.
- BAKAL, G. J. Preservatives for food. **United States Patent Application 20090011096**, p. 1–6, 2008.
- BYUN, M. W. Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis without skin irritation comprising refined nontoxic wood vinegar having no harmful materials. **PATENTSCOPE KR1020070042868 - Korea**, p. 970334, 2007.
- CAMPOS, A. D. **Patentes Processo de obtenção de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , uso de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora**BRAZILINPI, , 2012.
- CAMPOS, Â. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, v. 65, p. 1–8, 2007.
- CAMPOS, Â. D. Circular Técnica. n. Figura 3, 2018.
- CARDOSO, M. V. et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. SUPPL. 1, p. 31–44, 2011.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian oral research**, v. 24, n. 2, p. 135–141, 2010.
- CHANG, M. S. Cosmetic composition containing pyroligneous acid solution. **Espacenet KR20030005075 A- Korea**, v. 2003000507, n. 20030005075, p. 20030115, 2003.
- CHIU, H. S. Liquid smoke impregnated fibrous food casing. **United States Patent 4377187**, p. 1–20, 1983.
- COCCO, A. R. et al. **A systematic review about antibacterial monomers**

378 **used in dental adhesive systems: Current status and further**
 379 **prospectsDental Materials**, 2015.

380 COOK, D. et al. HClinical Recommendations Using Levels of Evidence for
 381 Antithrombotic Agents. **Chest**, v. 108, n. 4 SUPPL., p. 227S–230S, 1995.

382 COOK, D. J. et al. Should Unpublished Data Be Included in Meta-
 383 analyses?Current Convictions and Controversies. **JAMA: The Journal of the**
 384 **American Medical Association**, v. 269, n. 21, p. 2749–2753, 1993.

385 DAMLAR, I. et al. Antimicrobial effects of several calcium silicate-based root-
 386 end filling materials. **Dental Materials Journal**, v. 33, n. 4, p. 453–457, 2014.

387 DE AZEVEDO IZIDORO, A. C. S. et al. Low virulent oral Candida albicans
 388 strains isolated from smokers. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 2, p. 148–
 389 153, 2012.

390 DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production
 391 current perspectives Quitina e quitosana : Características , perspectivas atuais
 392 de produção utilizações. v. 4, p. 184–191, 2013.

393 EBRAHIMI CHAHAROM, M. E. et al. Antibacterial Effect of All-in-one Self-etch
 394 Adhesives on Enterococcus faecalis. **Journal of dental research, dental**
 395 **clinics, dental prospects**, v. 8, n. 4, p. 225–9, 2014.

396 FAPERGS. PROPOSTA DE PRIORIDADES PARA O FOMENTO À PESQUISA
 397 NO RS. 2017.

398 FERNANDES, J. M. F. A. et al. Improving Antimicrobial Activity of Dental
 399 Restorative Materials. 2015.

400 FEUERSTEIN, O. et al. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive
 401 systems. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 138, n. 3, p.
 402 349- 54; quiz 396–8, 2007.

403 FORSS, H. et al. Pit and fissure sealants versus fluoride varnishes for
 404 preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents (
 405 Review). n. 1, 2016.

406 FRANCA, J. R. et al. Propolis--based chitosan varnish: drug delivery, controlled
 407 release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **BMC**
 408 **complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 478, 2014.

409 FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe
 410 periodontitis ??? a comprehensive review. **Journal of Clinical**
 411 **Periodontology**, v. 44, p. S94–S105, 2017.

- GAO, H. et al. Chemical Constituents Analysis and Antimicrobial Activities of Pyroligneous Acid of *Eucommia ulmoides* Oliv. Branch. **Acta Bot. Boreal. - Occident. Sin.**, v. 31, n. 10, p. 2106–2112, 2011.
- GEDELA, S.; ESCOUBAS, J. R.; MURIANA, P. M. Effect of inhibitory liquid smoke fractions on *Listeria monocytogenes* during long-term storage of frankfurters. **J Food Prot**, v. 70, n. 2, p. 386–391, 2007.
- GRECCO, F. et al. Distilled pyroligneous liquor obtained from *Eucalyptus grandis* and chitosan : physicochemical properties of the solution and films. 2018.
- HABIB, E.; WANG, R.; ZHU, X. X. Correlation of resin viscosity and monomer conversion to filler particle size in dental composites. **Dental Materials**, p. 1–8, 2018.
- HARADA, K. et al. Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Companion Animals : An in Vitro Study Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Com. v. 3, n. 11, p. 300–305, 2013.
- HIGGINS, J. P. T.; ALTMAN, D. G. **Higgins 2011 Higgins JPT, Green S (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011.** [s.l: s.n.].
- HWANG, Y. H. et al. Antimicrobial effect of the wood vinegar from *Cryptomeria japonica* sapwood on plant pathogenic microorganisms. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1106–1109, 2005.
- IBRAHIM, D. et al. Efficacy of pyroligneous acid from *Rhizophora apiculata* on pathogenic *Candida albicans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 7, p. 2231-3354, 2013.
- IBRAHIM, D. et al. Evaluation of antibacterial effects of *Rhizophora apiculata* pyroligneous acid on pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014a.
- IBRAHIM, D. et al. Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014b.
- JEPSEN, S. et al. Prevention and control of dental caries and periodontal

- diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S85–S93, 2017.
- KIM, S. P. et al. Rice hull smoke extract inactivates Salmonella Typhimurium in laboratory media and protects infected mice against mortality. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 80–85, 2012.
- KIM, T. et al. Probiotic material for livestock and its manufacturing method. **(Republic of Korea (Management Rural Development Administration), S. Korea; Gadel Organic Ferment Fodder Farming Association, Korea, 2009.**
- KO, S. H. et al. NATURAL BIODEODORIZING AGENT COMPOSITION. **Espacenet KR20010048390**, v. 2003001405, n. 20030014052, p. 20030215, 2003.
- KOYCHEV, S. et al. Antimicrobial Effects of Mastic Extract Against Oral and Periodontal Pathogens. **Journal of Periodontology**, p. 1–11, 2017.
- LEBOIS, M. et al. Effects of divercin V41 combined to NaCl content, phenol (liquid smoke) concentration and pH on *Listeria monocytogenes* ScottA growth in BHI broth by an experimental design approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 931–937, 2004.
- LEE, J. H. et al. Silver-ionized wood vinegar having enhanced antimicrobial activity and use thereof for improving or preventing disease caused by pathogenic bacteria. **Espacenet KR20060109757 A- Korea**, v. 2006010975, n. 20060109757, 2005.
- LEE, S. H. et al. **Production of pyroligneous acid from lignocellulosic biomass and their effectiveness against biological attacks** **Journal of Applied Sciences**, 2010.
- LINDNER, R. L. Meat processing with *Listeria monocytogene* re - inoculation control stage. **United States Patent 5043174**, p. 1–6, 1991.
- LINGBECK, J. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014a.
- LINGBECK, J. et al. Temperature effects on the antimicrobial efficacy of condensed smoke and lauric arginate against *Listeria* and *Salmonella*. **J Food Prot**, v. 77, n. 6, p. 934–940, 2014b.
- LINGBECK, J. M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014c.

- 480 LUCA, M. P. DE et al. Propolis Varnish : Antimicrobial Properties against
481 Cariogenic Bacteria , Cytotoxicity , and Sustained-Release Profile. v. 2014,
482 2014.
- 483 MANGUEIRA, D. F. B.; MANGUEIRA, L. F. B.; DINIZ, M. D. F. F. M. Candidose
484 Oral. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 69–72, 2010.
- 485 MARUMOTO, S. et al. Identification of a germicidal compound against
486 picornavirus in bamboo pyroligneous acid. **Journal of Agricultural and Food**
487 **Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9106–9111, 2012.
- 488 MATHEW, S.; ZAKARIA, Z. A.; MUSA, N. F. Antioxidant property and chemical
489 profile of pyroligneous acid from pineapple plant waste biomass. **Process**
490 **Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1985–1992, 2015.
- 491 MATHEW, Z. A.; ZAKARIA, S. Pyroligneous acid—the smoky acidic liquid from
492 plant biomass. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99:, p. 11, 2015.
- 493 MATSUI, S. Production of carbon fiber and carbon fiber produced thereby.
494 **Espacenet JP19980339429 - Japan**, v. 2000160476, n. 2000160476, p.
495 20000613, 1998.
- 496 MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; CHEN, J. Evaluation of liquid smoke treated
497 ready-to-eat (RTE) meat products for control of *Listeria innocua* M1. **J Food**
498 **Sci**, v. 73, n. 4, p. M179-83, 2008.
- 499 MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; SREEKUMAR RAMAKRISHNAN. Determination
500 of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. **Food**
501 **Microbiology and Safety**, v. 70, n. 1, p. 12–17, 2005.
- 502 MOELLER, PATRICK, W.; RAMAKRISHNAM, SREEKUMAR F. Natural
503 biodeodorizing agent composition. **US 536160**, v. 1, n. 19, p. 1–43, 2004.
- 504 MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-
505 analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, n.
506 1, p. 1, 2015.
- 507 MORAIS, F. A. . et al. Polímeros a Base De Metil Metacrilato. Importância Em
508 Odontologia. **INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTISTRY**, v. 6, n. 2, p. 63–
509 66, 2007.
- 510 MURAKAMI, C.; BÖNECKER, M. Utilização de Fluoretos na Clínica
511 Odontopediátrica Contemporânea. **Revista FGM News**, v. 12, p. 33–36, 2010.
- 512 NASCIMENTO, P. L. DE M. M. et al. Addition of ammonium-based
513 methacrylates to an experimental dental adhesive for bonding metal brackets:

- 514 Carious lesion development and bond strength after cariogenic challenge.
 515 **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 151, n.
 516 5, p. 949–956, 2017.
- 517 NEDEL, F. et al. Substituted diaryl diselenides: Cytotoxic and apoptotic effect in
 518 human colon adenocarcinoma cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 9–10, p. 345–352,
 519 2012.
- 520 OGLIARI, F. A. et al. 2,3-Epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer
 521 in a dental adhesive. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p. 472–477, 2006.
- 522 OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Brazilian**
 523 **Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 466–476, 2007.
- 524 ORAMAHI, H. A.; YOSHIMURA, T. Antifungal and antitermitic activities of wood
 525 vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. **Journal of Wood Science**, v. 59, n. 4, p.
 526 344–350, 2013.
- 527 PAULONE, S. et al. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are
 528 differently affected by mouthwashes: An in vitro study. **New Microbiologica**, v.
 529 40, n. 1, p. 45–52, 2017.
- 530 PENMETSA, R. K. R. et al. An invitro evaluation of antibacterial properties of
 531 self etching dental adhesive systems. **Journal of Clinical and Diagnostic**
 532 **Research**, v. 8, n. 7, p. 3–7, 2014.
- 533 PUSSEGODA, K. et al. Identifying approaches for assessing methodological
 534 and reporting quality of systematic reviews: A descriptive study. **Systematic**
 535 **Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2017.
- 536 QIN, W.; XIHAN, M.; TAO, Z. Preparation, chemical constituents analysis and
 537 antimicrobial activities of pyroligneous acid of walnut shell. **Transactions of the**
 538 **Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 24, n. 7, p. 276–279, 2008.
- 539 RAHMANI-BADI, A.; SEPEHR, S.; BABAIE-NAIEJ, H. A combination of cis-2-
 540 decenoic acid and chlorhexidine removes dental plaque. **Archives of Oral**
 541 **Biology**, v. 60, n. 11, p. 1655–1661, 2015.
- 542 SALOMON, C.; GOYCOOLEA, F. M.; MOERSCHBACHER, B. Recent Trends
 543 in the Development of Chitosan-Based Drug Delivery Systems. **AAPS**
 544 **PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 933–935, 2017.
- 545 SHANMUGAM, K. T. et al. Dental caries vaccine- A possible option? **Journal of**
 546 **Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 6, p. 1250–1253, 2013.
- 547 SHANMUGAM, K. T. et al. In situ study of the anticariogenic potential of fluoride

- 548 varnish combined with CO₂ laser on enamel. **Journal of Clinical**
 549 **Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 1512–1513, 2017.
- 550 SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a
 551 systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of**
 552 **Microbiology**, 2018a.
- 553 SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a
 554 systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of**
 555 **Microbiology**, 2018b.
- 556 SUÑEN, E. Minimum inhibitory concentrations of smoke wood extracts against
 557 spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. **Letters in**
 558 **Applied Microbiology**, v. 27, n. Cect 4030, p. 45–48, 1998.
- 559 SUÑEN, E.; FERNANDEZ-GALIAN, B.; ARISTIMUÑO, C. Antibacterial activity
 560 of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia*
 561 *enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. **Food**
 562 **Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 387–393, 2001.
- 563 TAKAHASHI, A. et al. Effects of mechanical properties of adhesive resins on
 564 bond strength to dentin. **Dental Materials**, v. 18, n. 3, p. 263–268, 2002.
- 565 TEJADA, G. et al. Development and Evaluation of Buccal Films Based on
 566 Chitosan for the Potential Treatment of Oral Candidiasis. **AAPS**
 567 **PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 936–946, 2017.
- 568 THURETTE, J. et al. Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected
 569 by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature. **Journal of Food**
 570 **Protection**, v. 61, n. 11, p. 1475–1479, 1998.
- 571 TRIBBLE, T. B.; ROSE, G. W. Antimicrobial treatment and preservation of
 572 animal feedstuffs. **United States Patent 4308293**, p. 1–9, 1981.
- 573 VAN DE SANDE, F. H. et al. Biofilm Model for Enamel Demineralization and
 574 Antimicrobial Dose-Response Studies. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1057–1063,
 575 2011.
- 576 VAN LANDUYT, K. L. et al. Systematic review of the chemical composition of
 577 contemporary dental adhesives. **Biomaterials**, v. 28, n. 26, p. 3757–3785,
 578 2007.
- 579 VAN LOO, E. J. et al. Screening of commercial and pecan shell-extracted liquid
 580 smoke agents as natural antimicrobials against foodborne pathogens. **Journal**
 581 **of food protection**, v. 75, n. 6, p. 1148–52, 2012.

- 582 VAN MEERBEEK, B. et al. State of the art of self-etch adhesives. **Dental**
 583 **Materials**, v. 27, n. 1, p. 17–28, 2011.
- 584 VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki
 585 and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale.
 586 **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 1,
 587 p. 13–22, 2009a.
- 588 VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki
 589 and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale.
 590 **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 1,
 591 p. 13–22, 2009b.
- 592 VELMURUGAN, N.; HAN, S. S.; LEE, Y. S. Antifungal Activity of Neutralized
 593 Wood Vinegar with Water Extracts of Pinus densiflora and Quercus serrata Saw
 594 Dusts. **International Journal of Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 167–
 595 176, 2009.
- 596 WADA, S. Promoter for sound activation of natural environment and its
 597 production. **Espacenet JP19900418589 - Japan**, v. 0656617, n. 19940301,
 598 1994.
- 599 WANG, H.; CAO, H. Progress of antimicrobial mechanism of wood vinegar from
 600 agricultural and forestry wastes. **J Agro-Environm**, v. 42, p. 741–742, 2014.
- 601 WATARAI, S.; TANA; KOIWA, M. Feeding activated charcoal from bark
 602 containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for
 603 cryptosporidiosis in calves. **J Dairy Sci**, v. 91, n. 4, p. 1458–1463, 2008.
- 604 WEGEHAUPT, F. J. et al. Influence of light-curing distance on degree of
 605 conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. **BMC**
 606 **Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 12, 2017.
- 607 WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial
 608 activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **Journal of Analytical**
 609 **and Applied Pyrolysis**, v. 87, n. 1, p. 24–28, 2010.
- 610 WU, Q. et al. Study on the preparation of wood vinegar from biomass residues
 611 by carbonization process. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 98–103, 2015.
- 612 WU, Y.; BEDFORD, J.; RILEY, K. Antimicrobial smoke flavor for oral microflora
 613 control United. **United States Patent Application 20070212310**, p. 2013–
 614 2014, 2007.
- 615 YATAGAI, M. Biological activity of wood vinegar and its recent applications.

616 **New Food Ind.**, v. 46, p. 5–16, 2004.

617 ZHAI, M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in
618 food preservation. **Bioresource Technology**, v. 10, n. 1, p. 6219–6224, 2010.

619

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

Table 1. Search strategy.

Search strategy
Pubmed #1 ("wood vinegar" OR "pyroligneous acid" OR "pyroligneous extract" OR "pyroligneous" OR "liquid smoke") AND #2 ("Anti-Infective Agents" [MESH] "Antimicrobial activity" OR "Antibacterial activity" OR "Antifungal activity" OR "Anti-Infective Agents" OR "Agents, Anti-Infective" OR "Anti Infective Agents" OR "Antiinfective Agents" OR "Agents, Antiinfective" OR "Microbicides" OR "Antimicrobial Agents" OR "Agents, Antimicrobial" OR "Anti-Microbial Agents" OR "Agents, Anti-Microbial" OR "Anti Microbial Agents")
Web of science #1 Topic: ("wood vinegar") OR Topic: ("pyroligneous acid") OR Topic: ("pyroligneous extract") OR Topic: ("pyroligneous") OR Topic: ("liquid smoke") AND #2 Topic: ("antimicrobial activity") OR Topic: ("Anti-Infective Agents")
Scopus #1 ("wood vinegar") OR ("pyroligneous acid") OR ("pyroligneous extract") OR ("pyroligneous") AND #2 ("antimicrobial activity") OR ("Anti-Infective Agents")
SciFinder #1 ("antimicrobial activity of Wood Vinegar") OR #2 ("antimicrobial activity of pyroligneous acid") OR #3 ("antimicrobial activity of pyroligneous extract")
Scielo #1 ("wood vinegar") OR ("pyroligneous acid") OR ("pyroligneous extract") OR ("pyroligneous") OR ("liquid smoke") AND #2 ("antimicrobial activity") OR ("Anti-Infective Agents")
Google Scholar and ProQuest #1 (wood vinegar) OR (pyroligneous acid) OR (pyroligneous extract) OR (pyroligneous) OR (liquid smoke) AND #2 (antimicrobial activity)
Patents databases: INPI, Google patents, Espacenet, Patents on line, USPTO and WIPO. #1 (wood vinegar) OR (pyroligneous acid) OR (pyroligneous extract) OR (pyroligneous) OR (liquid smoke) AND #2 (antimicrobial activity)

Table 2. Demographic data from articles and patents considered in this study.

	microorganism tested	Pyroligneous extract source	Concentrations	Methods					Application area
				Assays	Sample size (per group) / repetition of assays	Period	Positive control	Negative control	
(SUÑEN, 1998)	<i>Bacillus cereus</i> (CECT 495), <i>Bacillus subtilis</i> (CECT 38), <i>S. aureus</i> (CECT 239 and 976), <i>L. monocytogenes</i> (CECT 932), <i>L. innocua</i> (CECT 4030), <i>Brochothrix thermosphacta</i> (CECT 847), <i>L. plantarum</i> (CECT 220), <i>L. brevis</i> (CECT 216), <i>L. coryniformes</i> (CECT 982), <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (CECT 697), <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (CECT 185), <i>Leuconostoc carnosum</i> (CECT 4024), <i>Carnobacterium divergens</i> (CECT 4016), <i>E. coli</i> (CECT 533, 471, 405), <i>S. tyhimurium</i> (CECT 443), <i>S. enteritidis</i> (CECT 556), <i>Y. enterocolitica</i> (CECT 559), <i>P. aeruginosa</i> (CECT 378), <i>Vibrio vulnificus</i> (CECT 529) and	Seven commercial smoke condensates. ¹	0.05, 0.1, 0.2 and 0.4% for L1, L4, S2 and S3; 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 and 0.8% for L2; 0.5, 1, 2, 4, 8% for L3 and 0.5, 1, 1.5% for S2.	Agar dilution methods	n=2/ Twice.	24 and 48 h	TSA and MRS agar without smoke inoculated with the working cultures.	No	As food preservative.

	<i>Rhodotorula rubra</i> (CECT 1159). Strains of <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> and <i>P. aeruginosa</i> 022 were from their own collection (Spanish National Collection of Type Cultures Valencia, Spain).									
(SUÑEN; FERNANDEZ-GALIAN; ARISTIMUÑO, 2001)	<i>L. monocytogenes</i> (932), <i>A. hydrophila</i> (839) and <i>Y. enterocolitica</i> (559) (Spanish National Collection of Type Cultures, Valencia, Spain).	Four commercial smoke condensates. ¹	1% for the dried extract, 0.4% for L1, 0.6% for L2 and 4% for L3.	Broth and agar dilution methods	n=1/ three times	0, 1, 2, 7, 14 and 21 days	Inoculated TSB without smoke extracts served as positive controls.	Non-inoculated flasks were used for sterility control.	As food preservative.	
(MILLY; TOLEDO; SREEKUMAR RAMAKRISHNAN, 2005)	<i>S. muenster</i> , <i>S. seftenburg</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> 8677, and <i>P. putida</i> ; <i>L. plantarum</i> and <i>L. innocua</i> M1; <i>S. cerevisiae</i> and <i>A. niger</i> .	Nine commercial liquid smokes. ¹	fractions (v/v) were 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.5%, and 2.0% to 10.0%.	Broth or agar dilution methods	n=3/ three times	24 h	Petri dishes with no smoke extracts that were inoculated.	No.	As food preservative.	
(GEDELA; ESCOUBAS; MURIANA, 2007)	<i>L. monocytogenes</i> Scott A-2 (serotype 4b, clinical isolate), V7-2 (serotype 1/2a, milk isolate), 39-2 (retail frankfurter isolate), and 383-2 (ground beef isolate).	Two commercial liquid smokes. ¹	Dipped for 5, 15, 30, 60, and 90 s with liquid smoke extract.	Direct spiral plating methods	n=3	10 weeks	Frankfurters not dipped.	No.	As food preservative.	

(MILLY; TOLEDO; CHEN, 2008)	<i>L. innocua</i> M1, a strain of <i>Listeria</i> resistant to the antibiotics streptomycin and rifampicin.	Four commercial liquid smokes. ¹	2%	Direct spiral plating methods	n=15	2 and 4 weeks	Three samples of each meat product.	No.	As food preservative.
(VAN LOO et al., 2012)	<i>S. Enteritidis</i> (PTA 13A), <i>E. coli</i> 0157:H7 (ATCC 43888), <i>S. aureus</i> (ATCC 25923 and ATCC 6538), and two methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA). <i>L. monocytogenes</i> 174 (serotype 1/2a), <i>L. monocytogenes</i> 163 (serotype 4b), <i>S. typhimurium</i> 29, <i>S. typhimurium</i> LT2 (ATCC 19585), and <i>S. aureus</i> Col (MRSA).	Eight commercial liquid smoke extracts.	96% to 0.375%.	Broth micro dilution method	n=3	24 h	Control containing PBS solution.	No.	As food preservative.
(MARUMOTO et al., 2012)	<i>Picornavirus</i> , <i>encephalomyocarditis</i> virus.	Two commercial liquid smokes.	<i>Not informed.</i>	Viral Inactivation Assay	<i>Not informed.</i>	6 h	<i>Not informed.</i>	<i>Not informed.</i>	As an agent for preventing viral epidemics in agricultural and human environments.
(HARADA et al.,	104 <i>E. coli</i> , 112 <i>S. pseudintermedius</i> and 58 <i>P.</i>	One commercial	Serial dilutions of BPA (i.e. 1/2, 1/3,	Maximum inhibitory	n=1	18 h	<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S.</i>	No.	For antibacterial

2013)	<i>aeruginosa</i> strains isolated from dogs and cats.	liquid smokes.	1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10, 1/11, 1/12, 1/13, 1/14, 1/15, 1/16, 1/17, 1/18, 1/19, and 1/20).	dilution/agar method				<i>aureus</i> and <i>S. pseudintermedius</i> were used as quality controls.	infections in animals.
(IBRAHIM et al., 2013)	Four strains of pathogenic <i>C. albicans</i> which were isolated from patients with suffering from urinary tract infection (two strains), vaginitis and onychomycosis (one each).	Four extract of liquid smokes.	Between 0.39 and 100.00 mg/mL.	Disc diffusion method; broth dilution method; time-kill assay	n=3	24 and 48 h	<i>Not informed.</i>	No.	As an antifungal agent especially to treat candidal infections.
(IBRAHIM et al., 2014a)	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. spizizenii</i> , <i>S. aureus</i> , MRSA, <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>E. coli</i> , <i>Erwinia</i> sp., <i>K. pneumonia</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> and <i>Yersinia</i> sp.(Industrial Biotechnology Research Laboratory Culture Collection.	Four extract of liquid smokes.	Between 0.39 and 100.00 mg/mL.	Disc diffusion method; broth dilution method; time-kill assay	n=3	24 h	Chloramphenicol (Sigma, Germany) at the concentration of 30 µg/mL was used as a positive control.	Commercial antibiotic disk GF A (Whatman, England) with 6.0 mm.	As an antimicrobial agent against pathogenic bacteria.

(LINGBECK et al., 2014b)	<i>L. monocytogenes</i> 2045 (Scott A, serotype 4b, from Dr. Martin Weidemann, Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY), <i>L. monocytogenes</i> 10403S (serotype 1/2a, from Dr. Aubrey Mendonca, Department of Food Science and Human Nutrition, Iowa State University, Ames), <i>L. innocua</i> ATCC 33090, <i>L. innocua</i> MI ATCC 33091, <i>S. typhimurium</i> LT2 ATCC 19585, and <i>S. heidelberg</i> ATCC 8326 (American Type Culture Collection, Manassas, VA).	Three commercial liquid smokes from Mesquite, Hickory and pecan shell.	Eight serial dilutions ranged to 48 and 0.375% (v/v).	Broth micro dilution/ agar method	n=3	24 h	Controls containing only PBS plus bacteria were included.	No	As food preservative.
(WEI; MA; DONG, 2010)	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacterium proteus</i> , <i>Bacterium prodigiosus</i> , and <i>Aerobacter aerogenes</i> .	Walnut tree branches.	Concentrations of 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.625 mg/mL.	Disc diffusion and (EC50).	<i>Not informed.</i>	<i>Not informed.</i>	<i>Not informed.</i>	<i>Not informed.</i>	As natural germicide.
(GAO et al., 2011)	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. prodigiosus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>A. aerogenes</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> and others non-human	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv. Branch.	Concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0,781 mg/mL.	Disc diffusion method.	n=1/ three times	48 h	Sterile water.	No.	As germicide.

pathogenic.

(KIM et al., 2012)	<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium (ATCC #14028) (S. typhimurium) American Type Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., U.S.A.).	Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) hull.	Concentrations of 0.1%, 0.5%, and 1.0% (v/v).	Disc diffusion method.	n=3	24 h	Not informed.	Not informed.	As antimicrobial flavor formulations for application to human foods and animal feeds.
			For in vitro assay and (1.0%, v/w) for in vivo assay.	<i>Salmonella</i> -infected Balb/c mouse model.	Three groups of 10 mice each.	12/12h for 48h	PBS-treated control.	Vancomycin (20 mg/mL).	

Patents Data

(TRIBBLE; ROSE, 1981)	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953, <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028, <i>C. albicans</i> ATCC 10231, <i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9643, <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642, <i>Chaetomium globosum</i> ATCC 6205, <i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 11797, <i>Chaetomium globosum</i> ATCC 6205, <i>Gibberella zeae</i> ATCC 24688, <i>Trichoderma viride</i> QM 9123, <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Proteus</i> sp., and <i>Enterobacter</i> sp.	Cellulosic fiber materials, mainly hard wood fibers, such as hickory, maple and other hard woods.	Not informed.	Disc diffusion method	As antimicrobial formulations for application to animal feedstuffs.
(CHIU, 1983)	P.sub.2B <i>Penicillium</i> P.sub.2C No easily recognizable conidial state; may belong in Mycelia Steriles P.sub.2D <i>Penicillium</i> P.sub.2E <i>Penicillium</i> P.sub.4 <i>Trichoderms</i> P.sub.5 <i>Paecilomyces</i> P.sub.9 <i>Paecilomyces</i> P.sub.11A	Royal Smoke AA.sup.(a); Royal Smoke A.sup.(a); Royal Smoke B.sup.(a); Royal Smoke 16.sup.(a); Charsol C-12.sup.(b); Charsol C-10.sup.(b); Charsol X-11.sup.(b); Charsol C-	89 wt. %	Number of viable molds. Antimycotic	As a food preservative.

	<i>Penicillium</i> P.sub.11B <i>Penicillium</i> P.sub.12A <i>Aspergillus</i> P.sub.12B <i>Penicillium</i> S.sub.1 <i>Fusarium</i> S.sub.2 <i>Penicillium</i> S.sub.3 <i>Monocillium</i> S.sub.4 <i>Penicillium</i> S.sub.5 <i>Penicillium</i> S.sub.6 <i>Penicillium</i> R.sub.1 <i>Penicillium</i> R.sub.2 <i>Penicillium</i> R.sub.3 <i>Penicillium</i> V.sub.1 <i>Penicillium</i> V.sub.2 <i>Penicillium</i> <i>Penicillium</i> (either P.sub.2D or P.sub.12B) <i>Aspergillus</i> <i>glaucus</i> (source: T. LaBuza U. of Minnesota) <i>A. niger</i> ATCC 1004.	6.sup.(b); Charsol C-3.sup.(b); Smokaroma Code - 12.sup.(c); Code - 10.sup.(c); Code - S.sup.(c); Code - 6.sup.(c). (a) Griffith Laboratories, Inc. 12200 South Central Avenue, Alsip, I. (b) Red Arrow Products Co., P.O. Box 507, Manitowoc, WI. (c) Meat Industry Suppliers, Inc. 770 Frontage Road, Northfield, IL.		action.	
(LINDNER, 1991)	<i>L. monocytogenes</i>	ZESTI SMOKE (Code 10) Hickory Specialties, Inc. of Brentwood, Tenn.	Acetic acid in a concentration of about 6.5 to 8.0%; carbonyl 1.0 to 8.0% ; 0.1 to 1.0%; and water 83 to 92.4% (w/v).	Wieners sprayed. As preservative.	food
(MATSUI, 1998)	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Midori</i> Minorikin, <i>Serratia</i> , <i>Salmonella</i> .	Wood vinegar and bamboo vinegar, T= 500 °C ~ 900 °C.	<i>Not informed.</i>	Disc diffusion method.	Hospital textile industry.
(CHANG, 2003)	<i>E. coli</i> .	Wood vinegar is Quercus (by Caicos) T= 80-150 °C	Between 0.5% and 5.0%.	Detection of bacteria in the wood vinegar.	Cosmetic industry.
(KO et al., 2003)	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio</i> sp.	<i>Not informed.</i>	Between 3.0% and 5.0%.	Tested as to whether the growth inhibition	New natural bio deodorant

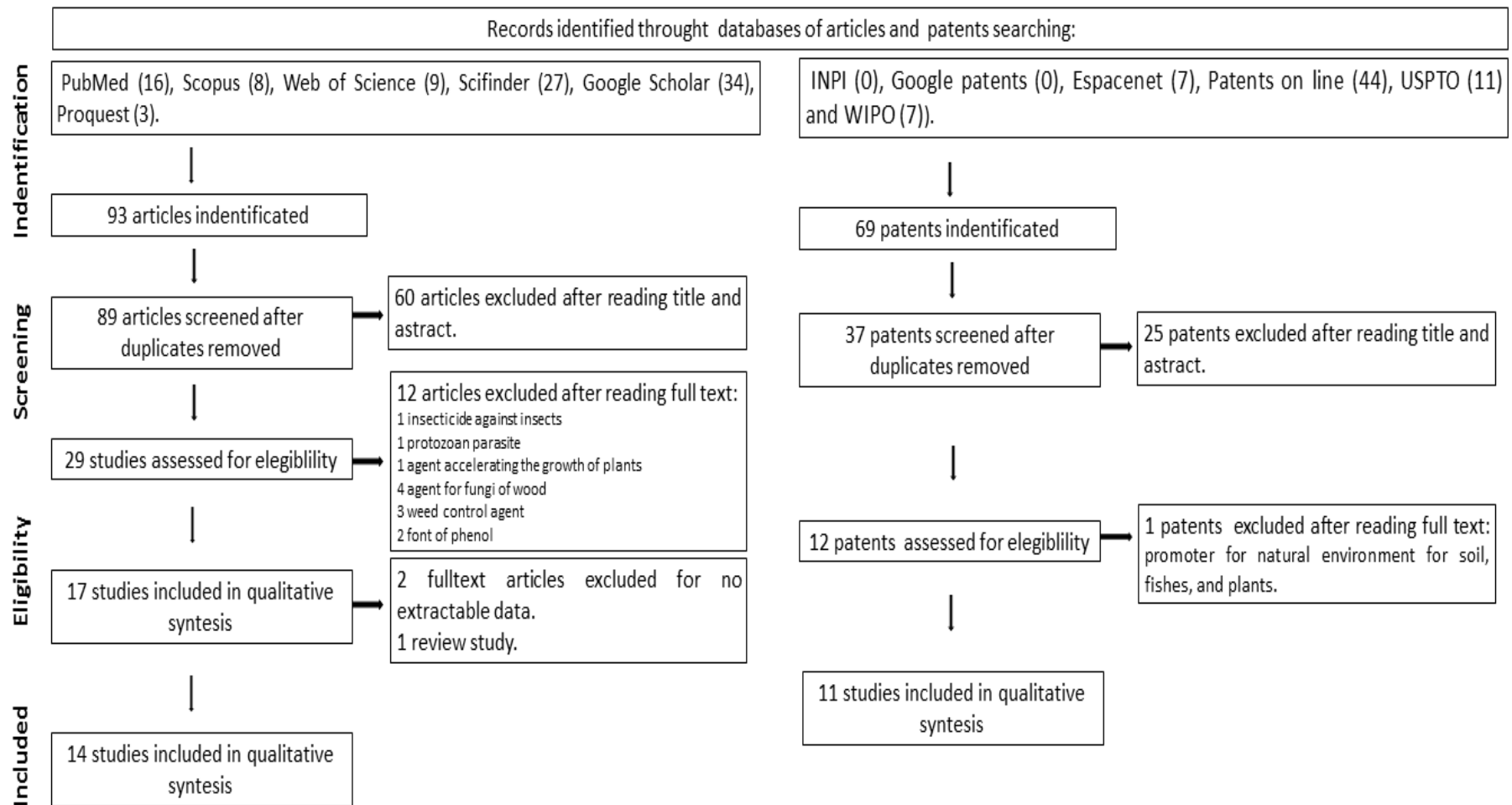
on. composition.

(MOELLER, PATRICK; RAMAKRISHNAM, 2004)	<i>E. coli</i> 8677, <i>S. seftenberg</i> , <i>L. innocua</i> M1, <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>A. niger</i> spores.	ZESTI-SMOKE Code 1O and ZESTI-SMOKE Code V. Mastertaste of Crossville, Tennessee.	Between 0.5% and 5.0%.	Minimum Inhibitory Concentrations.	As a food preservative.
(LEE et al., 2005)	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp. and <i>Candida</i> sp. (<i>Candida krusei</i> ATCC 6258, <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019, <i>Candida glabrata</i> ATCC 90.03, <i>C. albicans</i> ATCC 64550 and ATCC 90028).	Not informed.	Between 100µL to 1600 µL.	Minimum Inhibitory Concentrations.	As antiseptic is added to the food.
(BYUN, 2007)	<i>Trichophyton rubrum</i> .	Purified wood vinegar is acetic acid 2-4% by weight, formic acid 0.05 0.15 wt.%, Propionic acid 0.05 0.15 wt.%.	1-5% of weight of the total weight of the medicament.	Halo test.	A medicament of atopic dermatitis containing refined wood vinegar.
(WU; BEDFORD; RILEY, 2007)	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>fusobacterium nucleatin</i> ssp. <i>polymorphum</i> .	ZESTI-SMOKE Code 1O and ZESTI-SMOKE Code V. Mastertaste of Crossville, Tennessee.	Between 0.01% and 50.0%.	Minimum Inhibitory Concentrations.	As oral antimicrobial.
(BAKAL, 2008)	<i>L. monocytogenes</i> .	ZESTI-SMOKE Code 1O and ZESTI-SMOKE Code V. Mastertaste of Crossville, Tennessee.	Between 0.05% and 5.0%.	Halo test.	As a food preservative.

Table 3. Patents data, antibacterial compositions and claims related to pyroligneous extracts antimicrobial activity.

Patent		Country	Title	Year	Antibacterial composition	Claimed
US4308293 (ROSE, 1981)	(TRIBBLE;	United States	<u>Antimicrobial treatment and preservation of animal feedstuffs</u>	1981	Pyroligneous acid and pyroligneous acid complexes.	Preservative agents for the treatment of animal feedstuffs.
US4377187 (CHIU, 1983)		United States	<u>Liquid smoke impregnated fibrous food casing</u>	1983	Liquid smoke.	A fibrous reinforced cellulosic food casing with the impregnated liquid smoke providing antimycotic quality.
US5043174 (1991)	(LINDNER,	United States	<u>Meat processing with Listeria monocytogene re-inoculation control stage</u>	1991	Liquid smoke derivative product containing a minimum of carbonyl and phenol.	Compositions for antimicrobial treatment of food products.
JP2000160476 (A) (MATSUI, 1998)		Japan	Production of carbon fiber and carbon fiber produced thereby	2000	Extract of mugwort (Artemisia princeps) and one of pyroligneous acid from wood or bamboo.	Carbon fiber that has antimicrobial activity.
KR20030005075 (CHANG, 2003)	(A)	Korean	Cosmetic composition containing pyroligneous acid solution	2003	The cosmetic composition contains 0.5 to 5.0% by weight of a pyroligneous acid solution, based on the total weight of the composition.	A cosmetic composition containing a pyroligneous acid solution with antimicrobial activity and antioxidant activity for protecting the skin.

KR20030014052 (A) (KO et al., 2003)		Korean	Natural biodeodorizing agent composition	2003	The Bacillus strain has a final concentration of 0.5x10 not 7 to 1x10 not 7, based on 3 to 5% pyroligneous solution.	A biodeodorizing agent composition with an excellent antimicrobial activity against putrefactive or pathogenic bacteria and a long-lasting deodorizing effect.
US20050175746 (MOELLER, PATRICK; RAMAKRISHNAM, 2004)	A1	United States	<u>Low flavor anti-microbials drived from smoke flavors</u>	2005	Derivatives of liquid smoke.	Compositions for antimicrobial treatment of food products.
KR20060109757 (VELMURUGAN et al., 2009b)	(A)	Korean	Silver-ionized wood vinegar having enhanced antimicrobial activity and use thereof for improving or preventing disease caused by pathogenic bacteria	2006	The silver-ionized wood vinegar is prepared by ionizing silver in wood vinegar with electrolysis.	Compositions for antimicrobial activity.
KR1020070042868 (BYUN, 2007)		Korean	Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis without skin irritation Comprising refined nontoxic wood vinegar having no harmful materials	2007	Refined wood vinegar 24 wt.% of acetic acid, 0.050.15 wt.% of formic acid, 0.500.15 wt.% of propionic acid.	Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis and improving antimicrobial activity.
US20070212310 (WU; BEDFORD; RILEY, 2007)	A1	United States	<u>Antimicrobial smoke flavor for oral microflora control</u>	2007	Compositions that include low flavor antimicrobial liquid smoke derivatives.	Compositions and methods for inhibiting the growth of oral microbes in a subject.
US20090011096 (BAKAL, 2008)		United States	<u>Preservatives for food</u>	2009	Combination of N long chain alkyl of di basic amino acid alkyl ester acid salt biocides with liquid smoke compositions.	Compositions for antimicrobial treatment of food products.

Figure 1 Flow chart.

5.2 Antimicrobial and cytotoxic potential in vitro of films of *Eucalyptus grandis* pyroligneous extracts and chitosan for oral applications

Juliana Leitzke Santos de Souza; Tomaz Alves da Silva Neto; Laísa Camerini da Rosa; Fernanda Nedel; Angela Diniz Campos; Rafael Guerra Lund.

*Artigo formatado conforme as instruções de autores para periódico **Biofouling**, <http://www.tandfonline.com/loi/gbif20#.VMvNHdLF91Y> acesso em 20/09/2018.

Status: Submetido conforme ANEXO IV

Antimicrobial and cytotoxic potential *in vitro* of films of *Eucalyptus grandis* pyroligneous extracts and chitosan for oral applications

Oral varnish with antimicrobial potential

Juliana Leitzke Santos de Souza¹; Tomaz Alves da Silva Neto²; Laísa Camerini da Rosa³; Fernanda Nedel³; Angela Diniz Campos⁴; Rafael Guerra Lund⁵.

¹ Post-Graduate Program of Biochemistry and Bioprospection, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil; juliana.leitzke@gmail.com

² Post-Graduate Program of Dental Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

³ Post-Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil;

⁴Laboratory of Vegetable Physiology, Embrapa Clima Temperado, Br 392, Km 78, caixa postal 403, Pelotas 96010-971, Brazil

⁵Post-Graduate Program in Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

* Address correspondence to Rafael Lund, Post-graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel)–Rua Gonçalves Chaves, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas RS Brazil, Tel/Fax: + 00 55 53 3222-6690;

ABSTRACT

Chitosan films containing distilled pyroligneous extracts of *Eucalyptus grandis* (EPDQ) was characterized and developed by EMBRAPA-CPACT were evaluated for activity against *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, and *Lactobacillus acidophilus* in a direct contact test. Anticariogenic potential and cytotoxicity *in vitro* were also determined. These natural polymers were tested in different concentrations and in the formulation of an experimental fluoride varnish with antimicrobial potential. Antimicrobial activity was evaluated by the direct contact test, whereas cytotoxicity was analyzed through the colorimetric assay using MTT. Results demonstrated the ability to inhibit these organisms *in vitro* at low concentrations and possibly prevent and treat oral infections caused by these microorganisms. The preliminary results showed that EPDQ was not cytotoxic to the NIH/3T3 cell line because no statistically significant differences ($p < 0.05$) were found between the test groups in the different concentrations tested. All formulations of EPDQ films showed excellent results in the direct contact test, which proved that the formulation was advantageous for use or indication as an oral antimicrobial treatment and possibly prevent and treat oral infections caused by these microorganisms.

Keywords: Pyroligneous extract, pyroligneous acid, antimicrobial activity, oral cavity.

INTRODUCTION

Many oral health conditions are recognized as public health problems because of their prevalence, severity, and individual and community impact, which entail costs to the health system and the existence of effective methods of prevention and treatment. Untreated dental caries is considered the most prevalent condition throughout the world (ANTUNES et al., 2016; SHANMUGAM et al., 2013). *Candida albicans* is a well-known example of a microbial agent that is frequently harbored as a commensal of human healthy mucosae; it can behave as an opportunistic pathogen both locally and distally. Candidiasis is the most common opportunistic fungal infection affecting the oral mucosa (PAULONE et al., 2017).

Various antimicrobial agents are widely used in the therapy of oral inflammatory diseases. However, their side effects and the occurrence of drug resistance justify research on natural antimicrobial agents to target oral pathogens that are safe for the host (KOYCHEV et al., 2017).

Distilled pyroligneous extract (EPD) is a complex mixture of compounds derived from the chemical breakdown of components in wood through the condensation of vapors and gases generated during the pyrolysis of a limited access of oxygen (IBRAHIM et al., 2014a). EPD has applications in diverse areas and possesses antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory functions; it imparts organoleptic and antimicrobial properties to smoked food (IBRAHIM et al., 2014a; LINGBECK et al., 2014c; MATHEW; ZAKARIA, 2015; SOUZA et al., 2018a).

In the present study, the antimicrobial properties of chitosan films containing EPDs of *Eucalyptus grandis* (EPDQ) on commensal fungal and pathogenic oral bacteria, as well as their possible cytotoxic effect toward cells of epithelial origin, were evaluated in comparison with those of the common fluoride varnish. These formulations were registered as green chemistry materials at Instituto Nacional de Propriedade Intelectual in Brazil (PCT/BR2013/000597), the USA (US20150336854 A1), and Germany (DE112013006230T5) as a phytoprotector for use in agriculture (GRECCO et al., 2018). The results of this research were registered in the INPI (BR102012033149-7) for use as oral antimicrobial materials.

METHODS

Ethical approval was granted by the Ethics Committee, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Protocol No. 66039317.3.0000.5318 (Pelotas, RS, Brazil).

Characterization of extracts

The chitosan films containing pyroligneous extract were developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA-CPACT). Pyroligneous liquor was obtained through extraction of *E. grandis* proposed by Campos (2018), in which smoke and gases were collected in the temperature range of 80 °C–150 °C. The pyrolysis extract was stored for 6 months to be stabilized. The product was then distilled in a Buchi rotary evaporator (model R-114). The fraction collected in the temperature range of 60 °C–75 °C was used and named EPD (GRECCO et al., 2018). The main chemical compounds identified in the EPD are shown in Table 1.

The solutions were composed of chitosan and EPD. These formulations were also used to prepare the chitosan autosupported films, which were registered as green chemistry material at Instituto Nacional de Propriedade Intelectual in Brazil (PCT/BR2013/000597), the USA (US20150336854 A1), and Germany (DE112013006230T5) as a phytoprotector for use in agriculture (GRECCO et al., 2018). The characterizations of films in each group tested are shown in Table 2, and these films have been studied for use for dental antimicrobial varnish.

Direct contact test

The direct contact test was conducted according to Damlar et al. (DAMLAR et al., 2014). The strains of oral isolates tested were *C. albicans* (ATCC 62342), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), and *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356). The strains were acquired in the Microbiology Laboratory of the School of Dentistry, Federal University of Pelotas. At 24 h before challenge, strains were subcultured in Sabouraud, BHI, and MRS agar and then incubated at 37 °C. The inoculum was prepared by dissolving an aliquot of the microorganism in Sabouraud, BHI, and MRS broth obeying to 0.5 Macfarland scale (1×10^8 Colony forming units (CFU)). In this inoculum, we placed 10 µL in each well of a microtiter 96-well plate (Table 2). The five concentrations ranged from 1.500 µg/mL to 7.500 µg/mL. The plates were incubated for 1 and 24 h. Subsequently, 240 µL of Sabouraud, BHI, and MRS broth was added

to each well, and the plates were agitated for 5 min using a plate shaker. About 100 μL of each well was then passed into 900 μL of broth, for each serial 1:10 dilutions made, four aliquots of 25 μL were plated onto Petri dishes of 9 cm containing Sabouraud, BHI, or MRS agar and then incubated at 37 °C for 48 h. After this period, the numbers of colonies were previously determined by two trained examiners. Positive (inoculum without the presence of any product) and negative (only culture medium) controls were established in each group. Starting from the positive control for each group being accepted as 100%, growth inhibition percentages were calculated for each test.

Biofilm microcosms: Experimental design and conditions

The microcosm biofilm model described by Van de Sande et al. (2011) was used with slight modification. Human saliva was used as the inoculum, and bovine enamel was the substratum. The nutrient growth medium used for the experiments was a defined medium enriched with mucin (DMM; pH 6.8). For all experiments, the outcome variables assessed were pH from the medium supernatant and mineral loss evaluated by the percentage surface hardness change (%SHC) (Van de Sande et al., 2011).

Enamel disks

A cylindrical diamond-coated drill (trephine) was used perpendicular to the buccal surface of recently extracted bovine central incisors, and enamel disks (5 mm diameter and 2 mm thickness) were obtained. Dentine and enamel surfaces were wet ground with 600 and 600/800/1200/1500/2000-grit silicon carbide papers, respectively. Both surfaces were plane-parallel. Nail varnish was applied on the sides and bottom of the disks, leaving only the buccal enamel surface exposed. The disks were fixed with a holder prepared with orthodontic wire and kept in a vertical position during the experimental procedures. They were sterilized by gamma radiation at 4.08 KGy (Eldorado 78; Best Theratronics, Ottawa, Ontario, Canada) and kept at 4 °C in humid atmosphere until use.

Saliva collection

For each experimental run, fresh stimulated saliva was collected from a healthy subject (female, 20 years old) who had not been under antibiotic therapy for at least 6

months. Saliva was collected in the morning (during fasting), and the volunteer abstained from oral hygiene for 24 h prior to collection.

Treatment of chitosan films containing pyroligneous extract

A 10% sucrose solution was used as cariogenic challenge for all groups (6 h per day) (AIRES et al., 2008; CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010). About 7,500 µg of each experimental film described in Table 2 was used for antimicrobial and anticariogenic treatment. This film was applied on the first day using a microbrush and after drying with a jet of air. The negative control received no treatment, and a commercial varnish containing fluoride was applied as a positive control.

Inoculation procedure and biofilm growth

Enamel disks were transferred aseptically into sterile wells (24-well tissue culture plate; Techno Plastic Products, Trasadingen, SU), and 0.4 mL of fresh homogenized saliva was dispensed onto each enamel disk. After 1 h at room temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), saliva was aspirated and 1.8 mL of growth medium was added. After sucrose feeding, disks were dip-washed for 10 s in sterile saline solution and transferred to a new plate with DMM. Plates were incubated in 5%–10% CO₂ and 51% O₂ (Anaerobac–Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltd., Santa Cecília, SP, Brazil) in anaerobic jars (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltd.) for up to 5 days at 37 °C without shaking.

The growth medium was replaced daily in all experiments twice a day (6 h/DMM +10% sucrose and 18 h/DMM). Prior to medium replacement, the plates were gently shaken; the disks were dip washed for 10 s in sterile saline and transferred to a new plate where fresh medium was added. At the end of the experimental periods, the disks were sonicated in 1 mL of 0.9% NaCl for microbiological assays, carefully cleaned with a soft bristle toothbrush and distilled water, and kept at 4 °C in a humid atmosphere in microtubes until enamel hardness analysis was performed.

Bacterial viability

A 100 µL aliquot of the sonicated suspension was diluted in 0.9% NaCl, and serial dilutions were inoculated in duplicate (20 µL drops) in the following culture media: blood agar for total anaerobic microbiota (MT) culture; Mitis Salivarius Agar for the determination of total streptococci (ST); agar Mitis Salivarius (Bacitracin MSB) for

counting mutans streptococci (SM), and Rogosa agar for *Lactobacillus* counts. The plates were incubated in anaerobiosis (96 h). CFUs were quantified, and the results were expressed as CFU/mg dry weight of the biofilm (AIRES et al., 2008).

Biofilm supernatant pH readings

After growth medium replacements, the pH was individually recorded from each well (Quimis 50w-Quimis Aparelhos Científicos Ltd., Diadema, SP, Brazil; V621 electrode—Analion, Ribeirão Preto, SP, Brazil) twice a day. Readings were obtained after the period under DMM (18 h) and after the period under DMM with sucrose (6 h).

Enamel hardness

Hardness testing of the enamel disks was performed by making six indentations, spaced 100 mm from each other, with a Knoop diamond loaded with a 25 g weight for 5 s (Micro Hardness Tester FM 700—Future-Tech Corp., Kawasaki, Japan). The surface hardness reading was performed before (sound enamel; SH) and after experiments (SH2).

The percentage SHC was calculated with the following equation:

$$[\%SHC = 100(SH2 - SH)/SH].$$

Cytotoxicity assay

Cell culture

Mouse fibroblasts of the NIH/3T3 cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro RJ Brazil). The cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS); DMEM and FBS were purchased from Vitrocell Embriolife (Campinas, SP, Brazil) and Gibco (Grand Island, NY, USA), respectively. Cells were grown at 37 °C in an atmosphere with 95% humidified air and 5% CO₂. The experiments were performed with cells in the logarithmic growth phase.

Determination of cytotoxicity

The viability of NIH/3T3 cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to water-insoluble formazan (NEDEL et al., 2012). Cells were then seeded at a density of 2 x

10^4 cell per well in a volume of 100 μ L in 96-well plates and grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air for 24 h before use in MTT assay. Cells were incubated with two different concentrations (1.500 and 7.500 μ g/mL) of films for 24h. These compounds were dissolved in DMSO and added to DMEM supplemented with 10% FBS to the desired concentrations. Final DMSO concentration in the culture medium never exceeded 0.5%, and a control group exposed to an equivalent concentration of DMSO was evaluated. After incubation, 20 μ L of MTT (5 mg MTT/mL solution) was added to each well. The plates were incubated for an additional 3 h, and the medium was discarded. About 200 μ L of DMSO was added to each well, and formazan was solubilized on a shaker for 5 min. The absorbance of each well was read on a microplate reader (Thermo Plate TP-Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 492 nm. The percentage inhibition of cell growth was determined as follows: inhibitory rate = $(1 - \text{Abs}_{492\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100$. All observations were validated by at least two independent experiments, and analyses for each experiment were performed in triplicate.

Statistical analysis

Results of cytotoxicity were analyzed by Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks. Differences among groups were significant at $p < 0.001$. Statistical analyses were performed with SigmaPlot 12.0.

RESULTS

Formulations of chitosan films containing pyroligneous extract were evaluated for activity against *C. albicans*, *S. mutans*, and *L. acidophilus in vitro* using the direct contact method. The results demonstrated the films' ability to inhibit these organisms at low concentrations and possibly prevent and treat oral infections caused by these microorganisms. In this study, we evaluated four film formulations containing pyroligneous extract and chitosan, one pure pyroligneous extract control, and one commercial fluorine varnish.

Tables 3A, 3B, and 3C show the inhibition potential of the films at 1 and 24 h of exposure for *C. albicans*, *S. mutans*, and *L. acidophilus in vitro* using the direct contact method. After 24 h of exposure, the results demonstrated that all the films

containing the pyroligneous extract were effective as oral antimicrobial agents in all the concentrations tested.

Table 4 shows the antibacterial effect of the films of EPDQ in the test of biofilm microcosms. The films showed no statistically significant difference of these films compared with the control. The same occurred in aciduric organisms, *Lactobacilli*, and *S. mutans*. For *Lactobacilli*, only EPDQ 3% was statistically significantly different from the control.

The biofilm supernatant pH readings that were obtained after the period under DMM (18 h) and after the period under DMM with sucrose (6 h) for 5 days demonstrated changes depending on the addition of sucrose in cariogenic challenge. Enamel hardness percentage (%SHC; Figure 1) of pyroligneous films on biofilm exposed for 5 days with the concentration of 7.500 µg/mL EPDQ was analyzed. EPD and EPD1% exhibited potential ability to protect tooth enamel against demineralization and commercial varnish.

To evaluate whether the tested compounds can alter cell viability, the colorimetric assay of MTT (3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) was performed. At 1.500 and 7.500 µg/mL (Figure 2), the test compounds did not show cytotoxicity against the NIH/3T3 cell line, and the EPD compound showed increased cell viability ($P = 0.03$ –1.500 µg/mL, $-P = 0.001$ –7.500 µg/mL). Thus, the EPDQ films did not present cytotoxicity against this cell line at concentrations where it demonstrated antimicrobial activity.

DISCUSSION

All formulations of EPDQ films showed excellent results in the direct contact test, as well as 100% inhibition in the 24 h period. Therefore, the formulation was advantageous for use as an oral antimicrobial treatment. EPD alone is not considered because it does not form a film and is used only as a control in the tests.

Our results were consistent with the antimicrobial activities of representative natural low flavor antimicrobial pyroligneous extract derivatives developed in the patent US 20070212310 A1. These agents were tested for their ability to inhibit the growth of various bacterial strains that are known to be relevant to tooth decay and/or periodontal disease. These bacterial strains included *S. mutans* (dental caries), *Porphyromonas gingivalis* (periodontal disease), and *Fusobacterium nucleatum* ssp. *Polymorphum* (periodontal disease) (WU; BEDFORD; RILEY, 2007).

Mass spectroscopy analysis was performed as described by Grecco (2018) for each retention time for EPD used in this study. The results revealed the presence of different chemical species, including aromatic, phenolic, carbonylic, and organic compound containing heteroatoms (Table 1). These findings were consistent with those reported in the literature (GRECCO et al., 2018; MATHEW; ZAKARIA, 2015). The main chemical species present in EPD used in this work were aromatic or heteroaromatic compounds, carbonylic, phenolic, and carboxylic acids (GRECCO et al., 2018).

In the same line of research of this study the oral composition in the patent US 20070212310 A1 consisted of chewing gum, edible film, confectionary, dentifrice, lozenge, mouthwash, and mouth spray. With the concentration of 0 to about 6% weight per unit volume (w/v) of liquid smoke derivative (WU; BEDFORD; RILEY, 2007). However our study, EPDQ films were tested as odontological varnish for oral diseases, such as caries, periodontal disease, and candidal disease with concentrations of 1.500–7.500 µg or 0.5%–2.5%. Ibrahim et al. (2013) also tested pyroligneous extract and derivatives against four pathogenic strains of *C. albicans*. Their results showed the greatest potential for use as anti-candidal agent (IBRAHIM et al., 2013). In 2014, the same author concluded that *R. apiculata* pyroligneous extract may also be a broad antimicrobial agent against pathogenic bacteria (IBRAHIM et al., 2014a).

The advantage of these formulations with respect to commercial varnish is their ability to combine with a natural polymer and the antimicrobial action of the distilled pyroligneous extract. In addition, we can prepare formulations with and without fluoride depending on the need or not of remineralization of the tooth or elimination of dental plaque (also known as dental biofilm).

Dental biofilm is a complex microbial community that is developed on the tooth surface (Van de Sande et al., 2011). To verify the inhibition of biofilm, a microcosm biofilm model was employed, being a current trend once it offers the advantage of coming closer to the physical-chemical, microbiological and nutrient conditions, in addition to maintaining the complexity and heterogeneity of *in vivo* plaques (NASCIMENTO et al., 2017). Although the films of EPDQ did not inhibit the formation of the biofilm at 5 days of exposure, some EPDQ films proved to be efficient in protecting the enamel from demineralization, which demonstrated a possible protective capacity of the enamel.

The preliminary results showed that the EPDQ films were not cytotoxic to the NIH/3T3 cell line, and no statistically significant differences ($p < 0.05$) were noted between the test groups, in the different concentrations tested, and between the control group. Pyroligneous extract is an effective antimicrobial agent against an array of bacterial pathogens as demonstrated in both broth culture and food systems. Commercial use of pyroligneous extract in the food industry may satisfy consumer demand for all-natural foods while maintaining their safety. PE is used frequently in preserving protein-based foods, namely, meat, fish, and cheese, because it imparts a pleasant flavor and also has inhibitory effects on foodborne pathogens (LINGBECK et al., 2014a).

CONCLUSION

All formulations of EPDQ films showed excellent results in the direct contact test, which proved that the formulation was advantageous for use or indication as an oral antimicrobial treatment and possibly prevent and treat oral infections caused by these microorganisms.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for granting a Doctorate scholarship to the first author.

Funding sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brazil. We would also like to thank FAPERGS (PqG # 17/2551-0001067-1 and PRONEX # 16.0471-4).

Conflict of interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication, and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

References

- AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380–386, 2008.
- ANTUNES, J. L. F. et al. Oral health in the agenda of priorities in public health. **Revista de saúde pública**, v. 50, p. 57, 2016.
- BAE, J. H. et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 74, n. 2, p. 822–828, 2005.
- BAKAL, G. J. Preservatives for food. **United States Patent Application 20090011096**, p. 1–6, 2008.
- BYUN, M. W. Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis without skin irritation comprising refined nontoxic wood vinegar having no harmful materials. **PATENTSCOPE KR1020070042868 - Korea**, p. 970334, 2007.
- CAMPOS, A. D. **Patentes Processo de obtenção de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , uso de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora**BRAZILINPI, , 2012.
- CAMPOS, Â. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, v. 65, p. 1–8, 2007.
- CAMPOS, Â. D. Circular Técnica. n. Figura 3, 2018.
- CARDOSO, M. V. et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. SUPPL. 1, p. 31–44, 2011.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian oral research**, v. 24, n. 2, p. 135–141, 2010.
- CHANG, M. S. Cosmetic composition containing pyroligneous acid solution. **Espacenet KR20030005075 A- Korea**, v. 2003000507, n. 20030005075, p. 20030115, 2003.
- CHIU, H. S. Liquid smoke impregnated fibrous food casing. **United States Patent 4377187**, p. 1–20, 1983.
- COCCO, A. R. et al. **A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects**Dental Materials, 2015.
- COOK, D. et al. HClinical Recommendations Using Levels of Evidence for

- Antithrombotic Agents. **Chest**, v. 108, n. 4 SUPPL., p. 227S–230S, 1995.
- COOK, D. J. et al. Should Unpublished Data Be Included in Meta-analyses? Current Convictions and Controversies. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 269, n. 21, p. 2749–2753, 1993.
- DAMLAR, I. et al. Antimicrobial effects of several calcium silicate-based root-end filling materials. **Dental Materials Journal**, v. 33, n. 4, p. 453–457, 2014.
- DE AZEVEDO IZIDORO, A. C. S. et al. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 2, p. 148–153, 2012.
- DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production current perspectives Quitina e quitosana : Características , perspectivas atuais de produção utilizações. v. 4, p. 184–191, 2013.
- EBRAHIMI CHAHAROM, M. E. et al. Antibacterial Effect of All-in-one Self-etch Adhesives on *Enterococcus faecalis*. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 8, n. 4, p. 225–9, 2014.
- FAPERGS. PROPOSTA DE PRIORIDADES PARA O FOMENTO À PESQUISA NO RS. 2017.
- FERNANDES, J. M. F. A. et al. Improving Antimicrobial Activity of Dental Restorative Materials. 2015.
- FEUERSTEIN, O. et al. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 138, n. 3, p. 349-54; quiz 396–8, 2007.
- FORSS, H. et al. Pit and fissure sealants versus fluoride varnishes for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents (Review). n. 1, 2016.
- FRANCA, J. R. et al. Propolis--based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 478, 2014.
- FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis ??? a comprehensive review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S94–S105, 2017.
- GAO, H. et al. Chemical Constituents Analysis and Antimicrobial Activities of Pyroligneous Acid of *Eucommia ulmoides* Oliv. Branch. **Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.**, v. 31, n. 10, p. 2106–2112, 2011.
- GEDELA, S.; ESCOUBAS, J. R.; MURIANA, P. M. Effect of inhibitory liquid smoke

- fractions on *Listeria monocytogenes* during long-term storage of frankfurters. **J Food Prot**, v. 70, n. 2, p. 386–391, 2007.
- GRECCO, F. et al. Distilled pyroligneous liquor obtained from *Eucalyptus grandis* and chitosan : physicochemical properties of the solution and films. 2018.
- HABIB, E.; WANG, R.; ZHU, X. X. Correlation of resin viscosity and monomer conversion to filler particle size in dental composites. **Dental Materials**, p. 1–8, 2018.
- HARADA, K. et al. Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Companion Animals : An in Vitro Study Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Com. v. 3, n. 11, p. 300–305, 2013.
- HIGGINS, J. P. T.; ALTMAN, D. G. **Higgins 2011 Higgins JPT, Green S (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011.** [s.l: s.n.].
- HWANG, Y. H. et al. Antimicrobial effect of the wood vinegar from *Cryptomeria japonica* sapwood on plant pathogenic microorganisms. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1106–1109, 2005.
- IBRAHIM, D. et al. Efficacy of pyroligneous acid from *Rhizophora apiculata* on pathogenic *Candida albicans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 7, p. 7 %@ 2231-3354, 2013.
- IBRAHIM, D. et al. Evaluation of antibacterial effects of *Rhizophora apiculata* pyroligneous acid on pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014a.
- IBRAHIM, D. et al. Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014b.
- JEPSEN, S. et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S85–S93, 2017.
- KIM, S. P. et al. Rice hull smoke extract inactivates *Salmonella Typhimurium* in laboratory media and protects infected mice against mortality. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 80–85, 2012.
- KIM, T. et al. Probiotic material for livestock and its manufacturing method. **(Republic of Korea (Management Rural Development Administration), S. Korea; Gadel Organic Ferment Fodder Farming Association, Korea, 2009.**

- KO, S. H. et al. NATURAL BIODEODORIZING AGENT COMPOSITION. **Espacenet KR20010048390**, v. 2003001405, n. 20030014052, p. 20030215, 2003.
- KOYCHEV, S. et al. Antimicrobial Effects of Mastic Extract Against Oral and Periodontal Pathogens. **Journal of Periodontology**, p. 1–11, 2017.
- LEBOIS, M. et al. Effects of divercin V41 combined to NaCl content, phenol (liquid smoke) concentration and pH on *Listeria monocytogenes* ScottA growth in BHI broth by an experimental design approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 931–937, 2004.
- LEE, J. H. et al. Silver-ionized wood vinegar having enhanced antimicrobial activity and use thereof for improving or preventing disease caused by pathogenic bacteria. **Espacenet KR20060109757 A- Korea**, v. 2006010975, n. 20060109757, 2005.
- LEE, S. H. et al. **Production of pyroligneous acid from lignocellulosic biomass and their effectiveness against biological attacks** *Journal of Applied Sciences*, 2010.
- LINDNER, R. L. Meat processing with *Listeria monocytogenes* re-inoculation control stage. **United States Patent 5043174**, p. 1–6, 1991.
- LINGBECK, J. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014a.
- LINGBECK, J. et al. Temperature effects on the antimicrobial efficacy of condensed smoke and lauric arginate against *Listeria* and *Salmonella*. **J Food Prot**, v. 77, n. 6, p. 934–940, 2014b.
- LINGBECK, J. M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014c.
- LUCA, M. P. DE et al. Propolis Varnish : Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria , Cytotoxicity , and Sustained-Release Profile. v. 2014, 2014.
- MANGUEIRA, D. F. B.; MANGUEIRA, L. F. B.; DINIZ, M. D. F. F. M. Candidose Oral. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 69–72, 2010.
- MARUMOTO, S. et al. Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyroligneous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9106–9111, 2012.
- MATHEW, S.; ZAKARIA, Z. A.; MUSA, N. F. Antioxidant property and chemical profile of pyroligneous acid from pineapple plant waste biomass. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1985–1992, 2015.
- MATHEW, Z. A.; ZAKARIA, S. Pyroligneous acid—the smoky acidic liquid from plant

biomass. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99:, p. 11, 2015.

MATSUI, S. Production of carbon fiber and carbon fiber produced thereby.

Espacenet JP19980339429 - Japan, v. 2000160476, n. 2000160476, p. 20000613, 1998.

MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; CHEN, J. Evaluation of liquid smoke treated ready-to-eat (RTE) meat products for control of *Listeria innocua* M1. **J Food Sci**, v. 73, n. 4, p. M179-83, 2008.

MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; SREEKUMAR RAMAKRISHNAN. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. **Food Microbiology and Safety**, v. 70, n. 1, p. 12–17, 2005.

MOELLER, PATRICK, W.; RAMAKRISHNAM, SREEKUMAR F. Natural biodeodorizing agent composition. **US 536160**, v. 1, n. 19, p. 1–43, 2004.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

MORAIS, F. A. . et al. Polímeros a Base De Metil Metacrilato. Importância Em Odontologia. **INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTISTRY**, v. 6, n. 2, p. 63–66, 2007.

MURAKAMI, C.; BÖNECKER, M. Utilização de Fluoretos na Clínica Odontopediátrica Contemporânea. **Revista FGM News**, v. 12, p. 33–36, 2010.

NASCIMENTO, P. L. DE M. M. et al. Addition of ammonium-based methacrylates to an experimental dental adhesive for bonding metal brackets: Carious lesion development and bond strength after cariogenic challenge. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 151, n. 5, p. 949–956, 2017.

NEDEL, F. et al. Substituted diaryl diselenides: Cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 9–10, p. 345–352, 2012.

OGLIARI, F. A. et al. 2,3-Epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p. 472–477, 2006.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 466–476, 2007.

ORAMAHI, H. A.; YOSHIMURA, T. Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. **Journal of Wood Science**, v. 59, n. 4, p. 344–350, 2013.

PAULONE, S. et al. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: An in vitro study. **New Microbiologica**, v. 40, n.

1, p. 45–52, 2017.

PENMETSA, R. K. R. et al. An invitro evaluation of antibacterial properties of self etching dental adhesive systems. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 7, p. 3–7, 2014.

PUSSEGODA, K. et al. Identifying approaches for assessing methodological and reporting quality of systematic reviews: A descriptive study. **Systematic Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2017.

QIN, W.; XIHAN, M.; TAO, Z. Preparation, chemical constituents analysis and antimicrobial activities of pyroligneous acid of walnut shell. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 24, n. 7, p. 276–279, 2008.

RAHMANI-BADI, A.; SEPEHR, S.; BABAIE-NAIEJ, H. A combination of cis-2-decenoic acid and chlorhexidine removes dental plaque. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 11, p. 1655–1661, 2015.

SALOMON, C.; GOYCOOLEA, F. M.; MOERSCHBACHER, B. Recent Trends in the Development of Chitosan-Based Drug Delivery Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 933–935, 2017.

SHANMUGAM, K. T. et al. Dental caries vaccine- A possible option? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 6, p. 1250–1253, 2013.

SHANMUGAM, K. T. et al. In situ study of the anticariogenic potential of fluoride varnish combined with CO2 laser on enamel. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 1512–1513, 2017.

SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018a.

SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018b.

SUÑEN, E. Minimum inhibitory concentrations of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. Cect 4030, p. 45–48, 1998.

SUÑEN, E.; FERNANDEZ-GALIAN, B.; ARISTIMUÑO, C. Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 387–393, 2001.

- TAKAHASHI, A. et al. Effects of mechanical properties of adhesive resins on bond strength to dentin. **Dental Materials**, v. 18, n. 3, p. 263–268, 2002.
- TEJADA, G. et al. Development and Evaluation of Buccal Films Based on Chitosan for the Potential Treatment of Oral Candidiasis. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 936–946, 2017.
- THURETTE, J. et al. Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 11, p. 1475–1479, 1998.
- TRIBBLE, T. B.; ROSE, G. W. Antimicrobial treatment and preservation of animal feedstuffs. **United States Patent 4308293**, p. 1–9, 1981.
- VAN DE SANDE, F. H. et al. Biofilm Model for Enamel Demineralization and Antimicrobial Dose-Response Studies. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1057–1063, 2011.
- VAN LANDUYT, K. L. et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Biomaterials**, v. 28, n. 26, p. 3757–3785, 2007.
- VAN LOO, E. J. et al. Screening of commercial and pecan shell-extracted liquid smoke agents as natural antimicrobials against foodborne pathogens. **Journal of food protection**, v. 75, n. 6, p. 1148–52, 2012.
- VAN MEERBEEK, B. et al. State of the art of self-etch adhesives. **Dental Materials**, v. 27, n. 1, p. 17–28, 2011.
- VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 13–22, 2009a.
- VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 13–22, 2009b.
- VELMURUGAN, N.; HAN, S. S.; LEE, Y. S. Antifungal Activity of Neutralized Wood Vinegar with Water Extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata* Saw Dusts. **International Journal of Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 167–176, 2009.
- WADA, S. Promoter for sound activation of natural environment and its production. **Espacenet JP19900418589 - Japan**, v. 0656617, n. 19940301, 1994.
- WANG, H.; CAO, H. Progress of antimicrobial mechanism of wood vinegar from agricultural and forestry wastes. **J Agro-Environm**, v. 42, p. 741–742, 2014.
- WATARAI, S.; TANA; KOIWA, M. Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in

calves. **J Dairy Sci**, v. 91, n. 4, p. 1458–1463, 2008.

WEGEHAUPT, F. J. et al. Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 12, 2017.

WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 87, n. 1, p. 24–28, 2010.

WU, Q. et al. Study on the preparation of wood vinegar from biomass residues by carbonization process. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 98–103, 2015.

WU, Y.; BEDFORD, J.; RILEY, K. Antimicrobial smoke flavor for oral microflora control United. **United States Patent Application 20070212310**, p. 2013–2014, 2007.

YATAGAI, M. Biological activity of wood vinegar and its recent applications. **New Food Ind.**, v. 46, p. 5–16, 2004.

ZHAI, M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Bioresource Technology**, v. 10, n. 1, p. 6219–6224, 2010.

Table 1 Main chemical compounds identified in the distilled pyroligneous extract

Identified Compound	
1	Tetrahydropyran
2	3-Methyl-2-cyclopenten-1-one
3	Phenol
4	2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one
5	Phenol,2-methyl (ortho-cresol)
6	Phenol,3-methyl (meta-cresol)
7	Phenol,2-methoxy
8	Phenol,2,3-dimethyl (2,3-xilenol)
9	Para-cresol,2-methoxy
10	Phenol,4-ethyl-2-methoxy
11	Phenol-2,6-dimethoxy

Table 2. Description of films by chitosan containing pyroligneous extract in each group tested.

Characterizations of groups	Abbreviation
Distilled Pyroligneous Extract + 3% chitosan	EPDQ 3%
Distilled Pyroligneous Extract + 1% chitosan	EPDQ 1%
Distilled Pyroligneous Extract + 3% chitosan + Cu 2 mg/mL	EPDQ 3% + Cu
Distilled Pyroligneous Extract + 3% chitosan + Si 0.002 mg/mL	EPDQ 3%+ Si
Distilled Pyroligneous Extract + 3% chitosan + NaF 5%	EPDQ 3% +NaF 5%
Distilled Pyroligneous Extract (Control)	EPD
Commercial varnish (Control)	NaF 5%
Positive control	Control

Table 3 A, 3B and 3C. Inhibition percentage (%) of EPDQ on *C. albicans*, *S. mutans*, and *L. acidophilus* exposed for 1 and 24 h of direct contact with the concentration ranging from 1.500 µg/mL to 7.500 µg/mL of film groups.

Formulations Time	1 h					24 h					
	Concentration (µg)	7500	6000	4500	3000	1500	7500	6000	4500	3000	1500
EPDQ 3%	24	32	23	13	45	100	100	100	100	100	100
EPDQ 1%	50	21	24	43	46	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% + Cu	100	99	100	74	100	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3%+ Si	19	4	9	44	45	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% +NaF 5%	27	96	78	67	32	100	100	100	100	100	100
EPD	86	86	91	56	32	100	100	100	100	100	100
NaF 5%	0	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-

Formulations Time	1 h					24 h					
	Concentration (µg)	7500	6000	4500	3000	1500	7500	6000	4500	3000	1500
EPDQ 3%	98.8	95.1	90.5	99.5	98.7	100	100	100	100	100	100
EPDQ 1%	97.2	99.3	99.2	99.4	94.7	100	100	100	100	100	100
EPDQ 3% + Cu	97.7	99.9	99.8	99.9	99.6	100	99.9	100	100	100	100
EPDQ 3%+ Si	94.2	91.8	93.7	93.8	74.6	100	99.8	100	100	100	100
EPDQ 3% +NaF 5%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EPD	94.6	93.0	91.3	91.9	59.5	100	100	99.9	99.9	100	100
NaF 5%	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-

Formulations Time	1 h					24 h					
	Concentration (µg)	7500	6000	4500	3000	1500	7500	6000	4500	3000	1500
EPDQ 3%	29.2	93.4	NI	10.8	19.9		100	100	100	100	100
EPDQ 1%	81.8	71.1	42.3	61.7	56.9		100	100	100	100	100
EPDQ 3% + Cu	92.0	98.9	98.5	90.1	66.3		100	100	100	100	100
EPDQ 3%+ Si	32.7	NI	NI	17.0	NI		100	100	100	100	100
EPDQ 3% +NaF 5%	87.0	93	86	87	90		100	100	100	100	100
EPD	52.0	30.3	NI	NI	NI		100	100	100	100	100
NaF 5%	100						100				

Table 4. Results of biofilm microcosms in UFC/mg in LOG 10

Group	<i>Lactobacillus</i>	Total streptococci	<i>Mutans</i> streptococci	Total anaerobic
EPD	6.(±0.4) ^a	6.5(±0.4) ^a	4.5(±1.2) ^a	8.9(±0.2) ^a
EPDQ 1%	5.7(±1.2) ^a	5.6(±1.2) ^a	4.2(±0.6) ^a	8.8(±0.2) ^a
EPDQ 3%	5.4(±1.2) ^b	5.5(±1.1) ^a	4.3(±0.6) ^a	8.9(±0.2) ^a
EPDQ 3%+ Fluoride	6.1(±0.8) ^a	6.3(±0.6) ^a	4.9(±1.6) ^a	8.6(±0.6) ^a
Commercial Varnish	5.7(±1.1) ^a	6.1(±0.6) ^a	4.5(±1.7) ^a	8.6(±0.6) ^a
Control	6.2(±0.2) ^a	6.3(±0.5) ^a	3.5(±0.5) ^a	8.6(±0.4) ^a

Lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups tested. A value of $p < 0.05$ was considered significant (Tukey's test).

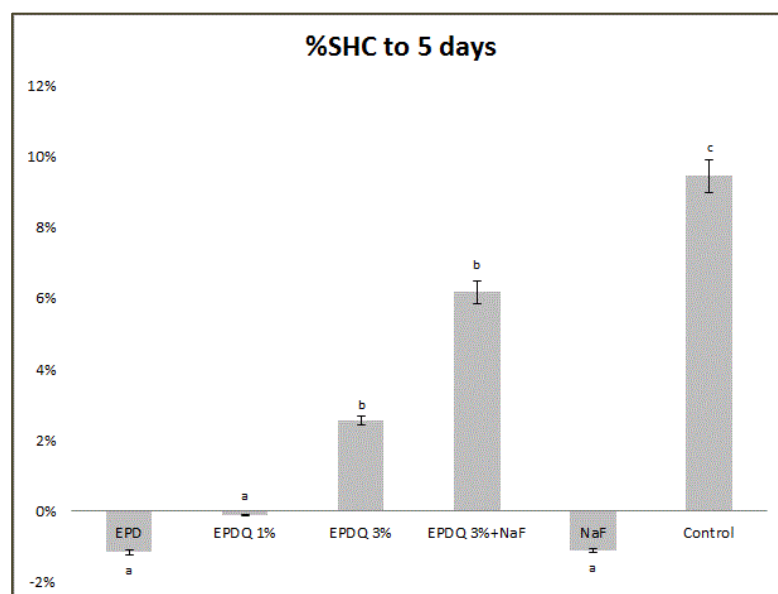


Figure 1. Mean values ($n=10$) and SD of the percentage surface hardness change (%SHC) for film by chitosan containing pyroligneous extract treatments and control (saline solution). Distinct letters show %SHC that was statistically different ($p = 0.05$) among treatments.

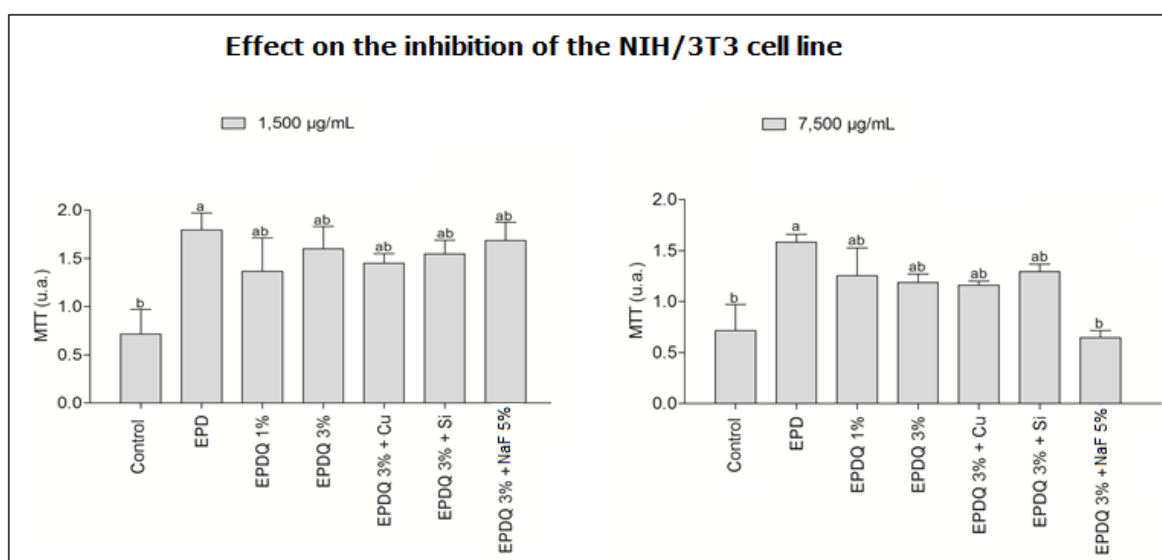


Figure 2. Effect on the inhibition of the NIH/3T3 cell line exposed to 24 h of contact at 1.500 and 7.500 µg/mL EPDQ films. Data are expressed as means $\pm$ SEM in arbitrary units (u.a.-absorbance at 492 nm). Lowercase letters indicate statistically significant differences between the compounds tested. A value of $p < 0.05$ was considered significant (Tukey's test).

5.3 Antimicrobial and mechanical characterization of a dental adhesive system containing *Eucalyptus grandis* pyroligneous extract

Juliana Leitzke Santos de Souza; Carlos Enrique Cuevas Suárez; Larissa Torres Nunes; Laísa Camerini da Rosa; Fernanda Nedel; Angela Diniz Campos; Rafael Guerra Lund.

.

Status: a submeter

Antimicrobial and mechanical characterization of a dental adhesive system containing *Eucalyptus grandis* pyroligneous extract

Juliana Leitzke Santos de Souza¹; Carlos Enrique Cuevas-Suárez²; Larissa Torres Nunes³ Laísa Camerini da Rosa⁴; Fernanda Nedel⁴; Angela Diniz Campos⁵; Rafael Guerra Lund^{1,3}.

¹Program of Post-Graduate in Biochemistry and Bioprospection, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil; ²Academic Area of Dentistry, Autonomous University of Hidalgo State, Mexico; ³Department of Restorative Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil; ⁴Program of Post-Graduate in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; ⁵ EMBRAPA Temperate Climate, Brazilian Agricultural Research Corporation Pelotas, RS, Brazil.

* Address correspondence to Rafael Lund, Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel)– Rua Gonçalves Chaves, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas RS Brazil, Tel/Fax: + 00 55 53 3222-6690; E-mail: rafael.lund@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the immediate and long-term antibacterial effect of a two-step self-etch adhesive system containing *Eucalyptus grandis* pyroligneous extract, as well as their mechanical properties and cytotoxicity *in vitro*. Pyroligneous extract was incorporated into the adhesive of an experimental two-step self-etch adhesive at three different concentrations: 1%, 5% and 10%. OneCoat SL was used as commercial reference. All materials were evaluated regarding degree of conversion (DC); shear bond strength to dentin (SBS); direct contact test (DCT) against *Streptococcus mutans* and cytotoxicity assay. DCT was measured in two different times: immediately after polymerization of the experimental materials or after storing the specimens for 7 days in phosphate buffered saline. In both cases, bacteria were allowed to directly contact the polymerized dental adhesives for 1h at 37°C. Data were analyzed using analysis of variance followed by the Tukey test ($\alpha = 0.05$). DC was increased with the addition of It can be noted that an increase in pyroligneous extract. The incorporation of pyroligneous extract did not affect the SBS to dentin of the experimental materials ($p > 0.05$). When tested immediately, all materials showed antibacterial activity. After aging, concentrations of 1% and 5% exhibited the highest antibacterial effect on *S. mutans*. Experimental adhesive systems did not present cytotoxicity against NIH/3T3 cell line.

Keywords: Pyroligneous extract, pyroligneous acid, antimicrobial activity, oral cavity, adhesive systems.

Introduction

The microbial flora of the oral cavity is extremely diverse. Residual bacteria in the oral cavity may remain at the tooth-restoration interface and increase the risk of developing recurrent caries (PENMETSA et al., 2014). Many dental products are used to promote dental protection from oral diseases, mouthwashes and toothpastes are accepted methods to deliver antimicrobials into the oral mouth. However, they are completely dependent on the discipline and compliance of the patient to the oral treatment and many of these antimicrobials are prescribed for short periods to avoid any risk of disturbing the resident oral microflora, one strategy is to incorporate antimicrobials into dental materials. The possibility that dental restorative material may release antimicrobial compounds are regarded as an interesting strategy for overcoming the development of cariogenic dental biofilms and the risk for secondary dental caries. There is a chance that under less biofilm stress dental materials could increase longevity (FERNANDES et al., 2015).

The antibacterial effects of non-polymerized or immediately polymerized adhesives are beneficial in the eradication of residual bacteria in the oral cavity. The long-lasting antibacterial activity of polymerized adhesives may be effective in inactivating bacteria that invade the tooth-restoration interface by microleakage (FEUERSTEIN et al., 2007).

Natural extracts are a great option for the development of materials with antimicrobial action. Due to its antimicrobial properties in nature several plants and extracts are used in dentistry and prescribed to patients with oral conditions for the treatment of these diseases (OLIVEIRA et al., 2007). Several plants and natural compounds are used to treat infections in the oral cavity.

The potential use of pyrolytic biomass offered a promising means of converting abundant agricultural biomass into high-value products, such as PE and others (WU et al., 2015). PE finds application in diverse areas, as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, plant growth stimulator, coagulant for natural rubber, and termiticidal and pesticidal agent. It is a source of valuable chemicals and imparts a smoky flavor in food (GRECCO et al., 2018; MATHEW; ZAKARIA; MUSA, 2015; SOUZA et al., 2018b).

We conducted a study to formulate experimental two-step self-etch adhesive systems containing pyroligneous extract as antimicrobial agent in three different concentrations: 1 %, 5% and 10%; and to examine the immediate and long-term

antibacterial effect against *S. mutans* by using the direct contact test. The mechanical properties by degree of conversion and shear bond strength to dentin and the cell viability *in vitro* were also evaluated. The null hypothesis to be tested is that the experimental adhesive systems will not present any antibacterial activity and the incorporation of pyroligneous extract will not compromise the mechanical properties and cytotoxicity.

Methods

Formulation of the experimental adhesive system

Experimental two-step self-etching adhesive system (AD) consisting in primer and adhesive formulated. The composition of the experimental materials is summarized in Table 1.

The pyroligneous extract was incorporated into the adhesive resin in three different molar concentrations: 1% (AD 1%), 5% (AD 5%) and 10% (AD 10%). An adhesive system without the incorporation of pyroligneous extract was used as control (AD 0%). OneCoat SL (Coltene Whaledent) was used as commercial reference (Commercial Control).

Degree of C=C conversion (DC)

DC was determined using a Fourier transform infrared spectrophotometer (Prestige 21 spectrometer Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with an attenuated total reflectance attachment incorporating a horizontal diamond crystal (PIKE Technologies, Madison, WI, USA). A small sample of the adhesive of the experimental materials was placed on the diamond cell of the ATR unit and a spectrum was captured. Then, the material was photoactivated during 20s using a photopolymerization unit equipped with a LED light (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália). After irradiation of the sample, another spectrum was taken. Infrared analysis was performed at a controlled room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and $60 \pm 5\%$ relative humidity. The spectra of the uncured and cured adhesive resin were acquired in absorbance mode between 1690 and 1575cm^{-1} . The DC was determined from the ratio of the absorbance intensities of the aliphatic C=C (peak height at 1637 cm^{-1}) to that of an aromatic C=C absorbance of the internal standard component (1608 cm^{-1}), both before and after curing the specimen (OGLIARI et al., 2006). Analyses were conducted in triplicate.

Shear bond strength to dentin

Fifty bovine incisors ($n = 10$) were embedded in a plastic ring using self-curing acrylic resin. Buccal faces were wet grounded to expose the dentin using an orthodontic grinder. Then, the dentin surfaces were wet-polished with 600-grit SiC abrasive papers for 30s in order to create a uniform smear layer. Dentin moisture was controlled with absorbent paper until no surface water was observed. The primer of the experimental adhesive primer was then vigorously applied to the dentin for 20s by using a disposable brush tip. After conditioning the dentin, the solvent was evaporated with a mild oil-free air system during 10s. The adhesive was then applied to the surface using a disposable tip and the bond film was made uniform using a gentle oil-free air stream. Elastomer molds (thickness 0.5mm) with a cylindrical orifice (diameter 1.5mm) were placed onto the adhesive layer and light activated (Radii Plus, SDI North America Inc., Bensenville, IL, USA) for 20s. The orifices were filled with the resin composite (Filtek Z250, 3MESPE, USA) to produce cylindrical specimens with bonded area of 1.77mm^2 ; the molds were covered with a polyester strip and a glass slide and the resin composite was photoactivated for 40s. After storage in distilled water at 37°C for 24h, a thin steel wire (diameter 0.2mm) was looped around the cylinder and aligned with the bonding interface. The shear test was conducted at a crosshead speed of 0.5mm/min until failure in a universal testing machine (EMIC DL 500, Brazil). Shear bond strength (SBS) values were calculated in MPa.

Contact direct test (DCT)

Direct contact test was performed according by a previous study (PENMETSA et al., 2014). The strain of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) was acquired in the Microbiology Laboratory of the School of Dentistry, Federal University of Pelotas. Strains were cultured in BHI agar and incubated at 37°C for 24 hours. The inoculum was prepared by dissolving an aliquot of the microorganism in BHI broth (BD, Sparks, MD, USA) second to 0.5 Macfarland scale (1×10^8 CFU). The direct contact test is based on turbidometric determination of bacterial growth in 96-well microtiter plates. The kinetics of the outgrowth in each well was monitored at 630 nm and recorded every 2h using a spectrophotometer.

To create the samples, the side walls of a 96-well plate were coated with the experimental materials and polymerized using a light curing unit. After polymerization,

all the materials were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) before inoculating them with bacteria. 10 μ L of bacterial suspension were placed on the side walls of the wells. The plate was held in a vertical position and wells were inspected for evaporation of the suspension's liquid, which occurred within 1h at 37°C. This ensured direct contact between bacteria and tested material. Brain Heart Infusion broth (220 μ L) was added to each of these wells and gently mixed for 2min. The positive control samples were eight wells with bacterial suspension only.

The microtiter plate was placed for incubation at 37°C in the incubator and the optical density in each well was measured at 630nm in spectrophotometer. The readings were taken at regular intervals (every 2h for 12h).

The antibacterial properties of the tested materials were examined using DCT immediately after polymerization and after aging them in PBS for seven days. During the aging process, the PBS was renewed every 24h. The whole experiment was carried out under aseptic conditions and was repeated three times to ensure reproducibility.

Cytotoxicity assay

Cell Culture

Mouse fibroblasts of the NIH/3T3 cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro RJ Brazil). The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were grown at 37°C in an atmosphere with 95% humidified air and 5% CO₂. The experiments were performed with cells in the logarithmic growth phase.

Determination of cytotoxicity

The viability of NIH/3T3 cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to water-insoluble formazan (NEDEL et al., 2012). Cells were then seeded at a density of 2 x 10⁴ cell per well in a volume of 100 μ L in 96-well plates and grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ 95% air, for 24h, before being used in the MTT assay. Cells were incubated with different concentrations of the experimental materials formulated for 48h. After incubation, 20 μ L of MTT (5mg MTT/mL solution) were added to each well. The plates were incubated for an additional 3h and the

medium was discarded. 200µL of DMSO were added to each well and the formazan was solubilized on a shaker for 5min. The absorbance of each well was read on a microplate reader (Thermo Plate TP-Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA) at wavelength 492nm. The percentage inhibition of cell growth was determined as follows: inhibitory rate = $(1 - \text{Abs}_{492\text{nm}}^{\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{nm}}^{\text{control cells}}) \times 100$. All observations were validated by at least two independent experiments; analyses for each experiment were performed in triplicate.

Results

Figure 1 shows the degree of conversion of the experimental adhesive systems formulated. The addition of EPD increased the degree of conversion of the materials ($p < 0.05$). Figure 2 shows the Shear bond strength to dentin of the experimental adhesives containing EPD. When compared with the control group, no statistical differences were found ($p > 0.05$).

Figure 3 and 4 shows the antimicrobial activity of the adhesive systems formulated. When evaluated immediately after polymerized, all materials inhibited all bacterial growth. For the aged material, only the control group AD 0% without the incorporation of pyroligneous extract showed a low antimicrobial activity and statistically different from the other groups ($p < 0.05$).

Figure 5 shows the cell viability of the experimental materials containing EPD. As it can be seen, the addition of EPD does not have any influence on the cell viability ($p < 0.05$). However, when compared with the cell control, a slight cytotoxicity could be seen ($p > 0.05$).

Discussion

The null hypotheses tested were partially accepted by the data of the present study. The incorporation of pyroligneous extract affected biological properties, but slightly influenced the mechanical properties. The concentrations of 1%, 5% and 10% allowed enhance the antibacterial activity of our experimental dental adhesive systems, and not altered the mechanical properties, indicating that had no negative influence on the curing behavior of Bis-GMA/HEMA-based adhesive resin.

In our study, the incorporation of pyroligneous extract affected positively the degree of conversion increasing the conversion values for all concentrations tested. The degree of conversion is a property influenced by various parameters, including

viscosity and thickness of adhesive layer (WEGEHAUPT et al., 2017). It is possible that the incorporation of EPD into the adhesive system caused a reduction in the viscosity of the material. This lower viscosity allowed better mobility and distribution of free radicals inside the growing polymer chain, enhancing the polymerization reaction and increasing the monomer conversion (HABIB; WANG; ZHU, 2018).

Shear bond strength to bovine dentin of the experimental materials was also evaluated. Achieving adequate bond strength values could ensure an optimal clinical performance (CARDOSO et al., 2011). The results obtained in this study demonstrated that the bonding performance of an experimental two-step self-etch adhesive was not affected by the addition of EPD in all concentrations tested. As the DC was not adversely affected by the EPD, any decrease in the SBS values was not to be expected too (TAKAHASHI et al., 2002). However, it should be noticed that the increase of the DC in the EPD containing adhesives did not increase the SBS values, which helps reinforce the idea that other characteristics of the adhesive system, like pH, wettability and, thickness of the adhesive layer have more influence (BAE et al., 2005).

Pyroligneous extract, is a complex highly oxygenated aqueous liquid fraction obtained by the condensation of pyrolysis vapors, (MATHEW; ZAKARIA, 2015; WU et al., 2015). The main products of wood pyrolysis are phenols, carbonyls and organic acids that are responsible for flavor, color and antimicrobial properties of pyroligneous extract (LINGBECK et al., 2014a; VAN LOO et al., 2012). And this complex composition probable affect positively to the antimicrobial activity.

The antibacterial effects of experimental self-etch adhesive systems were evaluated on *S. mutans*. All the adhesives included in the present study exhibited antimicrobial effects for 7 days and demonstrated significant differences from the positive control group, consistent with the results reported by Ebrahimi Chaharom et al, who evaluated one-bottle adhesives with the use of DCT and showed that one-bottle adhesives exhibit antimicrobial effects at least for 2 and 7 days. The antibacterial effects of the adhesives under study might be attributed to the low pH resulting from the remaining acidic monomers. However, polymerization of adhesive agents results in trapping of the polymer matrix, decreasing the release of polymerizable antibacterial components such as the acid monomers and promoting the adhesion process (EBRAHIMI CHAHAROM et al., 2014).

Penmeta et al. (2014) tested commercial dental adhesives and all showed antibacterial properties immediately and one day after polymerization but none of the self-etching adhesives had long-lasting antibacterial properties. Our results demonstrated the same for antibacterial properties immediately after polymerization and a substantial activity after aging for 7 days, which was potentially attributed at addition of pyroligneous extract to the formulation (PENMETSA et al., 2014).

Conclusion

Of all the experimental adhesives evaluated in the present study, concentrations of 1 and 5% exhibited the highest antibacterial effect on *S. mutans* after one week. All of the adhesives exhibited antibacterial activity immediately after polymerization and not influenced the mechanical properties.

Acknowledgements

The authors wish thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personal (CAPES, Brazil) for the granting of Doctorate's scholarship for the first author.

References

- AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380–386, 2008.
- ANTUNES, J. L. F. et al. Oral health in the agenda of priorities in public health. **Revista de saúde pública**, v. 50, p. 57, 2016.
- BAE, J. H. et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 74, n. 2, p. 822–828, 2005.
- BAKAL, G. J. Preservatives for food. **United States Patent Application 20090011096**, p. 1–6, 2008.
- BYUN, M. W. Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis without skin irritation comprising refined nontoxic wood vinegar having no harmful materials. **PATENTSCOPE KR1020070042868 - Korea**, p. 970334, 2007.
- CAMPOS, A. D. **Patentes Processo de obtenção de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , uso de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora**BRAZILINPI, , 2012.
- CAMPOS, Â. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, v. 65, p. 1–8, 2007.
- CAMPOS, Â. D. Circular Técnica. n. Figura 3, 2018.
- CARDOSO, M. V. et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. SUPPL. 1, p. 31–44, 2011.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian oral research**, v. 24, n. 2, p. 135–141, 2010.
- CHANG, M. S. Cosmetic composition containing pyroligneous acid solution. **Espacenet KR20030005075 A- Korea**, v. 2003000507, n. 20030005075, p. 20030115, 2003.
- CHIU, H. S. Liquid smoke impregnated fibrous food casing. **United States Patent**

4377187, p. 1–20, 1983.

COCCO, A. R. et al. **A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects** *Dental Materials*, 2015.

COOK, D. et al. HClinical Recommendations Using Levels of Evidence for Antithrombotic Agents. **Chest**, v. 108, n. 4 SUPPL., p. 227S–230S, 1995.

COOK, D. J. et al. Should Unpublished Data Be Included in Meta-analyses? Current Convictions and Controversies. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 269, n. 21, p. 2749–2753, 1993.

DAMLAR, I. et al. Antimicrobial effects of several calcium silicate-based root-end filling materials. **Dental Materials Journal**, v. 33, n. 4, p. 453–457, 2014.

DE AZEVEDO IZIDORO, A. C. S. et al. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 2, p. 148–153, 2012.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production current perspectives Quitina e quitosana : Características , perspectivas atuais de produção utilizações. v. 4, p. 184–191, 2013.

EBRAHIMI CHAHAROM, M. E. et al. Antibacterial Effect of All-in-one Self-etch Adhesives on *Enterococcus faecalis*. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 8, n. 4, p. 225–9, 2014.

FAPERGS. PROPOSTA DE PRIORIDADES PARA O FOMENTO À PESQUISA NO RS. 2017.

FERNANDES, J. M. F. A. et al. Improving Antimicrobial Activity of Dental Restorative Materials. 2015.

FEUERSTEIN, O. et al. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 138, n. 3, p. 349-54; quiz 396–8, 2007.

FORSS, H. et al. Pit and fissure sealants versus fluoride varnishes for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents (Review). n. 1, 2016.

FRANCA, J. R. et al. Propolis--based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 478, 2014.

FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis ??? a comprehensive review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S94–S105, 2017.

GAO, H. et al. Chemical Constituents Analysis and Antimicrobial Activities of Pyroligneous Acid of *Eucommia ulmoides* Oliv. Branch. **Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.**, v. 31, n. 10, p. 2106–2112, 2011.

GEDELA, S.; ESCOUBAS, J. R.; MURIANA, P. M. Effect of inhibitory liquid smoke fractions on *Listeria monocytogenes* during long-term storage of frankfurters. **J Food Prot.**, v. 70, n. 2, p. 386–391, 2007.

GRECCO, F. et al. Distilled pyroligneous liquor obtained from *Eucalyptus grandis* and chitosan : physicochemical properties of the solution and films. 2018.

HABIB, E.; WANG, R.; ZHU, X. X. Correlation of resin viscosity and monomer conversion to filler particle size in dental composites. **Dental Materials**, p. 1–8, 2018.

HARADA, K. et al. Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Companion Animals : An in Vitro Study Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Com. v. 3, n. 11, p. 300–305, 2013.

HIGGINS, J. P. T.; ALTMAN, D. G. **Higgins 2011 Higgins JPT, Green S (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011.** [s.l: s.n.].

HWANG, Y. H. et al. Antimicrobial effect of the wood vinegar from *Cryptomeria japonica* sapwood on plant pathogenic microorganisms. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1106–1109, 2005.

IBRAHIM, D. et al. Efficacy of pyroligneous acid from *Rhizophora apiculata* on pathogenic *Candida albicans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 7, p. 7 %@ 2231-3354, 2013.

IBRAHIM, D. et al. Evaluation of antibacterial effects of Rhizophora apiculata pyroligneous acid on pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014a.

IBRAHIM, D. et al. Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014b.

JEPSEN, S. et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S85–S93, 2017.

KIM, S. P. et al. Rice hull smoke extract inactivates Salmonella Typhimurium in laboratory media and protects infected mice against mortality. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 80–85, 2012.

KIM, T. et al. Probiotic material for livestock and its manufacturing method. **(Republic of Korea (Management Rural Development Administration), S. Korea; Gadel Organic Ferment Fodder Farming Association, Korea, 2009.**

KO, S. H. et al. NATURAL BIODEODORIZING AGENT COMPOSITION. **Espacenet KR20010048390**, v. 2003001405, n. 20030014052, p. 20030215, 2003.

KOYCHEV, S. et al. Antimicrobial Effects of Mastic Extract Against Oral and Periodontal Pathogens. **Journal of Periodontology**, p. 1–11, 2017.

LEBOIS, M. et al. Effects of divercin V41 combined to NaCl content, phenol (liquid smoke) concentration and pH on Listeria monocytogenes ScottA growth in BHI broth by an experimental design approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 931–937, 2004.

LEE, J. H. et al. Silver-ionized wood vinegar having enhanced antimicrobial activity and use thereof for improving or preventing disease caused by pathogenic bacteria. **Espacenet KR20060109757 A- Korea**, v. 2006010975, n. 20060109757, 2005.

LEE, S. H. et al. **Production of pyroligneous acid from lignocellulosic biomass and their effectiveness against biological attacks** **Journal of Applied Sciences**, 2010.

- LINDNER, R. L. Meat processing with *Listeria monocytogene* re - inoculation control stage. **United States Patent 5043174**, p. 1–6, 1991.
- LINGBECK, J. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014a.
- LINGBECK, J. et al. Temperature effects on the antimicrobial efficacy of condensed smoke and lauric arginate against *Listeria* and *Salmonella*. **J Food Prot**, v. 77, n. 6, p. 934–940, 2014b.
- LINGBECK, J. M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014c.
- LUCA, M. P. DE et al. Propolis Varnish : Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria , Cytotoxicity , and Sustained-Release Profile. v. 2014, 2014.
- MANGUEIRA, D. F. B.; MANGUEIRA, L. F. B.; DINIZ, M. D. F. F. M. Candidose Oral. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 69–72, 2010.
- MARUMOTO, S. et al. Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyroligneous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9106–9111, 2012.
- MATHEW, S.; ZAKARIA, Z. A.; MUSA, N. F. Antioxidant property and chemical profile of pyroligneous acid from pineapple plant waste biomass. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1985–1992, 2015.
- MATHEW, Z. A.; ZAKARIA, S. Pyroligneous acid—the smoky acidic liquid from plant biomass. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99:, p. 11, 2015.
- MATSUI, S. Production of carbon fiber and carbon fiber produced thereby. **Espacenet JP19980339429 - Japan**, v. 2000160476, n. 2000160476, p. 20000613, 1998.
- MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; CHEN, J. Evaluation of liquid smoke treated ready-to-eat (RTE) meat products for control of *Listeria innocua* M1. **J Food Sci**, v. 73, n. 4, p. M179-83, 2008.
- MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; SREEKUMAR RAMAKRISHNAN. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. **Food Microbiology**

and Safety, v. 70, n. 1, p. 12–17, 2005.

MOELLER, PATRICK, W.; RAMAKRISHNAM, SREEKUMAR F. Natural biodeodorizing agent composition. **US 536160**, v. 1, n. 19, p. 1–43, 2004.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

MORAIS, F. A. . et al. Polímeros a Base De Metil Metacrilato. Importância Em Odontologia. **INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTISTRY**, v. 6, n. 2, p. 63–66, 2007.

MURAKAMI, C.; BÖNECKER, M. Utilização de Fluoretos na Clínica Odontopediátrica Contemporânea. **Revista FGM News**, v. 12, p. 33–36, 2010.

NASCIMENTO, P. L. DE M. M. et al. Addition of ammonium-based methacrylates to an experimental dental adhesive for bonding metal brackets: Carious lesion development and bond strength after cariogenic challenge. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 151, n. 5, p. 949–956, 2017.

NEDEL, F. et al. Substituted diaryl diselenides: Cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 9–10, p. 345–352, 2012.

OGLIARI, F. A. et al. 2,3-Epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p. 472–477, 2006.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 466–476, 2007.

ORAMAHI, H. A.; YOSHIMURA, T. Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. **Journal of Wood Science**, v. 59, n. 4, p. 344–350, 2013.

PAULONE, S. et al. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: An in vitro study. **New Microbiologica**, v. 40, n. 1, p. 45–52, 2017.

PENMETSA, R. K. R. et al. An invitro evaluation of antibacterial properties of self etching dental adhesive systems. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 7, p. 3–7, 2014.

- PUSSEGODA, K. et al. Identifying approaches for assessing methodological and reporting quality of systematic reviews: A descriptive study. **Systematic Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2017.
- QIN, W.; XIHAN, M.; TAO, Z. Preparation, chemical constituents analysis and antimicrobial activities of pyroligneous acid of walnut shell. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 24, n. 7, p. 276–279, 2008.
- RAHMANI-BADI, A.; SEPEHR, S.; BABAIE-NAIEJ, H. A combination of cis-2-decenoic acid and chlorhexidine removes dental plaque. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 11, p. 1655–1661, 2015.
- SALOMON, C.; GOYCOOLEA, F. M.; MOERSCHBACHER, B. Recent Trends in the Development of Chitosan-Based Drug Delivery Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 933–935, 2017.
- SHANMUGAM, K. T. et al. Dental caries vaccine- A possible option? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 6, p. 1250–1253, 2013.
- SHANMUGAM, K. T. et al. In situ study of the anticariogenic potential of fluoride varnish combined with CO₂ laser on enamel. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 1512–1513, 2017.
- SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018a.
- SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018b.
- SUÑEN, E. Minimum inhibitory concentrations of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. Cect 4030, p. 45–48, 1998.
- SUÑEN, E.; FERNANDEZ-GALIAN, B.; ARISTIMUÑO, C. Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 387–393, 2001.

TAKAHASHI, A. et al. Effects of mechanical properties of adhesive resins on bond strength to dentin. **Dental Materials**, v. 18, n. 3, p. 263–268, 2002.

TEJADA, G. et al. Development and Evaluation of Buccal Films Based on Chitosan for the Potential Treatment of Oral Candidiasis. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 936–946, 2017.

THURETTE, J. et al. Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 11, p. 1475–1479, 1998.

TRIBBLE, T. B.; ROSE, G. W. Antimicrobial treatment and preservation of animal feedstuffs. **United States Patent 4308293**, p. 1–9, 1981.

VAN DE SANDE, F. H. et al. Biofilm Model for Enamel Demineralization and Antimicrobial Dose-Response Studies. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1057–1063, 2011.

VAN LANDUYT, K. L. et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Biomaterials**, v. 28, n. 26, p. 3757–3785, 2007.

VAN LOO, E. J. et al. Screening of commercial and pecan shell-extracted liquid smoke agents as natural antimicrobials against foodborne pathogens. **Journal of food protection**, v. 75, n. 6, p. 1148–52, 2012.

VAN MEERBEEK, B. et al. State of the art of self-etch adhesives. **Dental Materials**, v. 27, n. 1, p. 17–28, 2011.

VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 13–22, 2009a.

VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 13–22, 2009b.

VELMURUGAN, N.; HAN, S. S.; LEE, Y. S. Antifungal Activity of Neutralized Wood Vinegar with Water Extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata* Saw Dusts. **International Journal of Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 167–176, 2009.

WADA, S. Promoter for sound activation of natural environment and its production.

Espacenet JP19900418589 - Japan, v. 0656617, n. 19940301, 1994.

WANG, H.; CAO, H. Progress of antimicrobial mechanism of wood vinegar from agricultural and forestry wastes. **J Agro-Environm**, v. 42, p. 741–742, 2014.

WATARAI, S.; TANA; KOIWA, M. Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in calves. **J Dairy Sci**, v. 91, n. 4, p. 1458–1463, 2008.

WEGEHAUPT, F. J. et al. Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 12, 2017.

WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 87, n. 1, p. 24–28, 2010.

WU, Q. et al. Study on the preparation of wood vinegar from biomass residues by carbonization process. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 98–103, 2015.

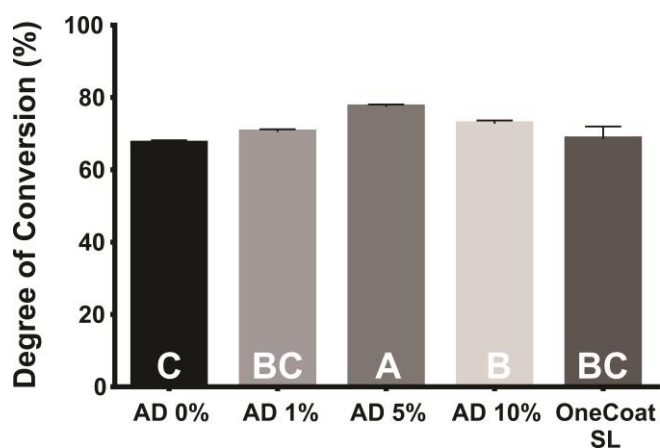
WU, Y.; BEDFORD, J.; RILEY, K. Antimicrobial smoke flavor for oral microflora control United. **United States Patent Application 20070212310**, p. 2013–2014, 2007.

YATAGAI, M. Biological activity of wood vinegar and its recent applications. **New Food Ind.**, v. 46, p. 5–16, 2004.

ZHAI, M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Bioresource Technology**, v. 10, n. 1, p. 6219–6224, 2010.

Table 1. Composition of the experimental materials.

Materials	% Weight
Primer	
2-hydroxyethyl methacrylate	30
Glycerol dimethacrylate phosphate	30
Distilled water	20
Ethanol	20
Adhesive	
Bisphenol A diglycidyl methacrylate	50
Triethylene glycol dimethacrylate	25
2-hydroxyethyl methacrylate	25
Camphorquinone	1%mol
4-dimethylaminobenzoate	2% molar
Diphenyliodonium hexafluorophosphate	1% molar
Butylated hydroxytoluene	1% molar

**Figure 1.** Degree of conversion of the experimental materials.

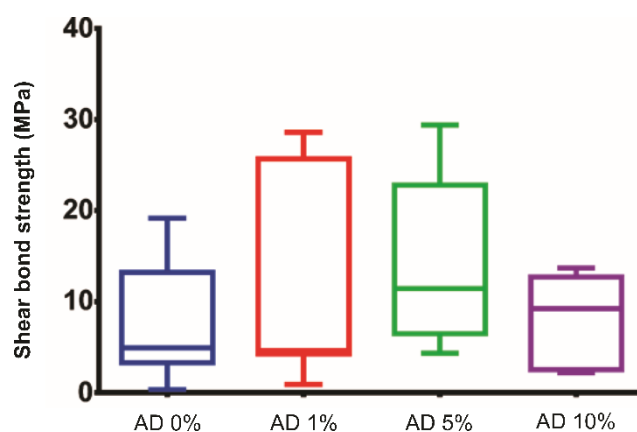


Figure 2. Shear bond strength of the experimental materials.

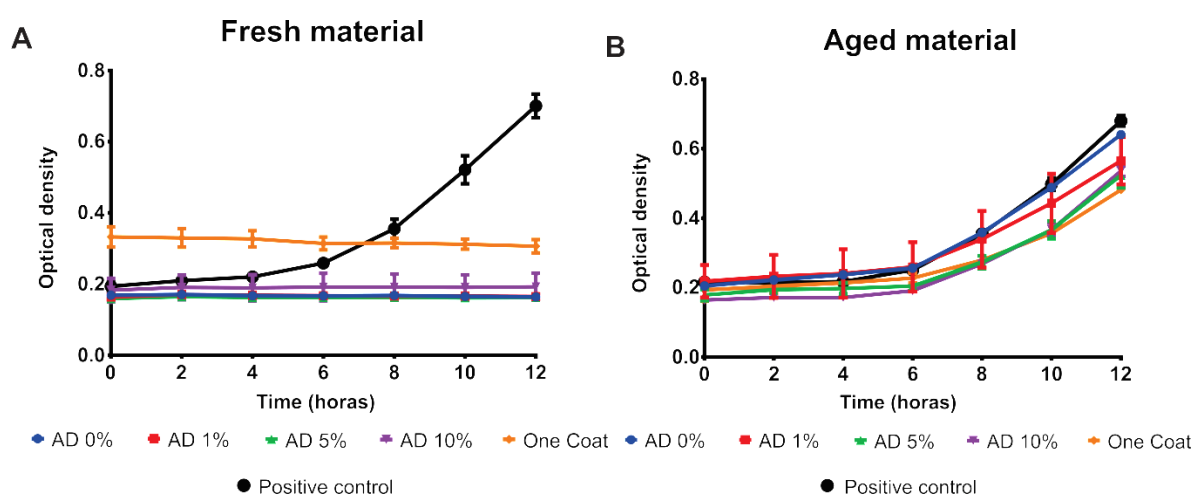


Figure 3A and 3B. Bacterial outgrowth (measured by changes in optical density [OD]) on the surface of self-etching adhesive materials immediately and after aging for 7 days in PBS. Each point is the average OD measured simultaneously in eight wells for 12 hours.

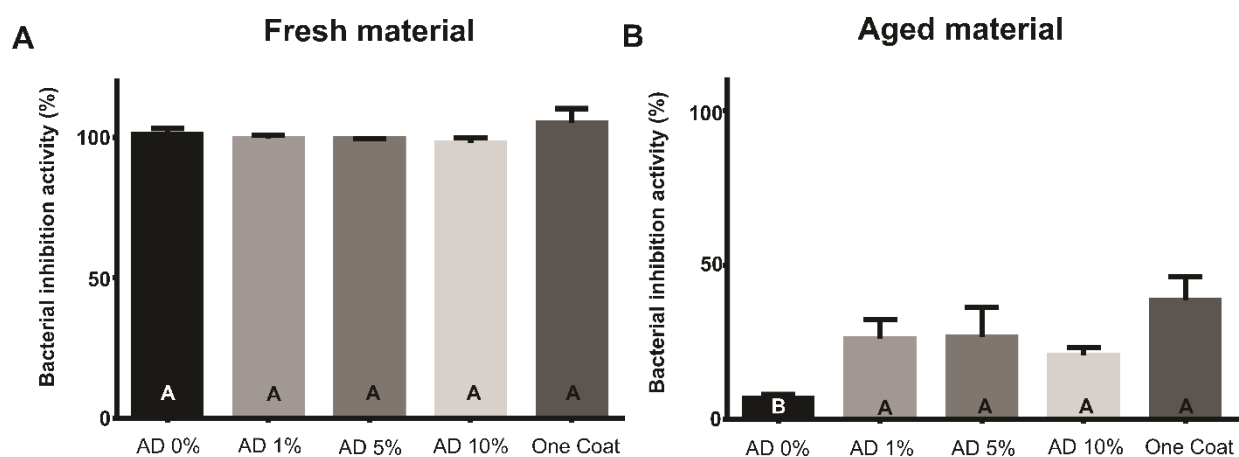


Figure 4A and 4B. Percentage inhibition of antimicrobial activity against *S. mutans*, for fresh and aged material in 12 hours.

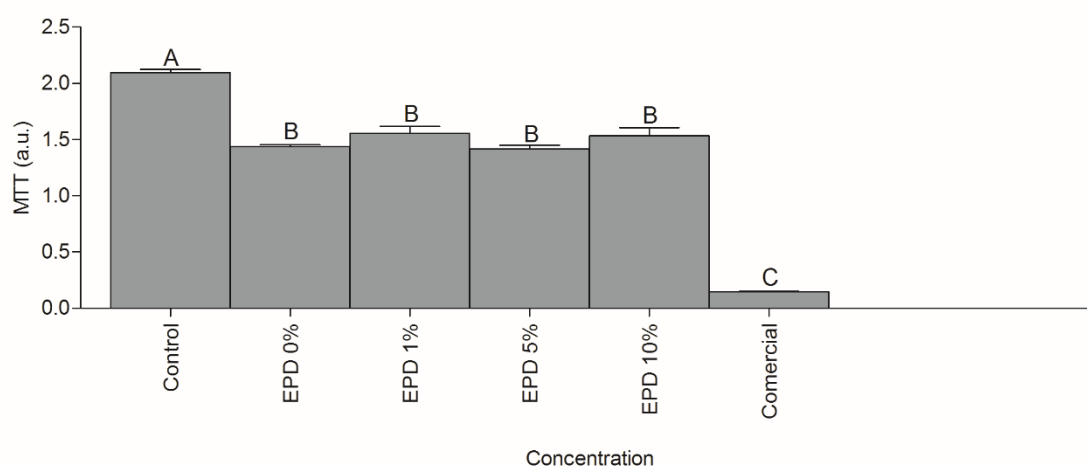


Figure 5. Effect on inhibition of NIH / 3T3 cell line exposed to 24 h of contact with 1%, 5% and 10% adhesive systems. Data are expressed as means $\pm$ SEM, in arbitrary units (u.a - absorbance at 492 nm).

6. Considerações finais

A partir dos resultados apresentados e discutidos nesse estudo foram elaboradas as seguintes considerações:

- 1) Novos compostos antibacterianos estão surgindo e sendo incorporados em muitos materiais odontológicos. O extrato pirolenhoso, tem demonstrado atividade antimicrobiana em estudos *in vitro*;
- 2) Um total de 14 artigos e 11 patentes relacionadas à atividade antimicrobiana de extratos pirolenhosos foram incluídos na análise referente ao monitoramento bibliográfico e tecnológico. Os estudos mais predominantes foram *in vitro*, e para micro-organismos patogênicos presentes em alimentos. A revisão sistemática e o levantamento tecnológico realizados neste projeto têm demonstrado que o extrato pirolenhoso é um agente antimicrobiano comumente utilizado na indústria alimentícia;
- 3) As formulações testadas apresentaram atividade antimicrobiana (*C. albicans*, *S. mutans* e *L. acidophilus*) em baixas concentrações 1,500µg a 7,500µg e não demonstraram serem citotóxicos frente a células comerciais de fibroblastos de camundongos da linhagem NIH/3T3;
- 4) Foi possível desenvolver resinas adesivas contendo extrato pirolenhoso em três concentrações 1, 5 e 10%;
- 5) As resinas adesivas testadas neste estudo, não afetaram as propriedades mecânicas do material.
- 6) O uso de extrato pirolenhoso em resinas adesivas podem ser uma opção para promover ação antimicrobiana no material.
- 7) Apesar de serem necessários estudos clínicos para confirmar a efetividade desses materiais na prevenção e controle de patologias orais, a revisão sistemática e o estudo laboratorial demonstraram que há evidência de atividade antibacteriana desses materiais *in vitro*.

7. Referências Bibliográficas

- AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380–386, 2008.
- ANTUNES, J. L. F. et al. Oral health in the agenda of priorities in public health. **Revista de saúde pública**, v. 50, p. 57, 2016.
- BAE, J. H. et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 74, n. 2, p. 822–828, 2005.
- BAKAL, G. J. Preservatives for food. **United States Patent Application 20090011096**, p. 1–6, 2008.
- BYUN, M. W. Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis without skin irritation comprising refined nontoxic wood vinegar having no harmful materials. **PATENTSCOPE KR1020070042868 - Korea**, p. 970334, 2007.
- CAMPOS, A. D. **Patentes Processo de obtenção de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora , uso de formulação com capacidade fertilizante e fitoprotetora**BRAZILINPI, , 2012.
- CAMPOS, Â. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, v. 65, p. 1–8, 2007.
- CAMPOS, Â. D. Circular Técnica. n. Figura 3, 2018.
- CARDOSO, M. V. et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. SUPPL. 1, p. 31–44, 2011.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian oral research**, v. 24, n. 2, p. 135–141, 2010.
- CHANG, M. S. Cosmetic composition containing pyroligneous acid solution. **Espacenet KR20030005075 A- Korea**, v. 2003000507, n. 20030005075, p. 20030115, 2003.

CHIU, H. S. Liquid smoke impregnated fibrous food casing. **United States Patent 4377187**, p. 1–20, 1983.

COCCO, A. R. et al. **A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects** *Dental Materials*, 2015.

COOK, D. et al. HClinical Recommendations Using Levels of Evidence for Antithrombotic Agents. **Chest**, v. 108, n. 4 SUPPL., p. 227S–230S, 1995.

COOK, D. J. et al. Should Unpublished Data Be Included in Meta-analyses? Current Convictions and Controversies. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 269, n. 21, p. 2749–2753, 1993.

DAMLAR, I. et al. Antimicrobial effects of several calcium silicate-based root-end filling materials. **Dental Materials Journal**, v. 33, n. 4, p. 453–457, 2014.

DE AZEVEDO IZIDORO, A. C. S. et al. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 2, p. 148–153, 2012.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production current perspectives Quitina e quitosana : Características , perspectivas atuais de produção utilizações. v. 4, p. 184–191, 2013.

EBRAHIMI CHAHAROM, M. E. et al. Antibacterial Effect of All-in-one Self-etch Adhesives on *Enterococcus faecalis*. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 8, n. 4, p. 225–9, 2014.

FAPERGS. PROPOSTA DE PRIORIDADES PARA O FOMENTO À PESQUISA NO RS. 2017.

FERNANDES, J. M. F. A. et al. Improving Antimicrobial Activity of Dental Restorative Materials. 2015.

FEUERSTEIN, O. et al. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 138, n. 3, p. 349–54; quiz 396–8, 2007.

FORSS, H. et al. Pit and fissure sealants versus fluoride varnishes for preventing

dental decay in the permanent teeth of children and adolescents (Review). n. 1, 2016.

FRANCA, J. R. et al. Propolis--based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 478, 2014.

FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis ??? a comprehensive review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S94–S105, 2017.

GAO, H. et al. Chemical Constituents Analysis and Antimicrobial Activities of Pyroligneous Acid of *Eucommia ulmoides* Oliv. Branch. **Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.**, v. 31, n. 10, p. 2106–2112, 2011.

GEDELA, S.; ESCOUBAS, J. R.; MURIANA, P. M. Effect of inhibitory liquid smoke fractions on *Listeria monocytogenes* during long-term storage of frankfurters. **J Food Prot**, v. 70, n. 2, p. 386–391, 2007.

GRECCO, F. et al. Distilled pyroligneous liquor obtained from *Eucalyptus grandis* and chitosan : physicochemical properties of the solution and films. 2018.

HABIB, E.; WANG, R.; ZHU, X. X. Correlation of resin viscosity and monomer conversion to filler particle size in dental composites. **Dental Materials**, p. 1–8, 2018.

HARADA, K. et al. Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Companion Animals : An in Vitro Study Determination of Maximum Inhibitory Dilutions of Bamboo Pyroligneous Acid Against Pathogenic Bacteria from Com. v. 3, n. 11, p. 300–305, 2013.

HIGGINS, J. P. T.; ALTMAN, D. G. **Higgins 2011 Higgins JPT, Green S (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. [s.l: s.n.].**

HWANG, Y. H. et al. Antimicrobial effect of the wood vinegar from *Cryptomeria japonica* sapwood on plant pathogenic microorganisms. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1106–1109, 2005.

IBRAHIM, D. et al. Efficacy of pyroligneous acid from *Rhizophora apiculata* on pathogenic *Candida albicans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 7, p. 7 %@ 2231-3354, 2013.

IBRAHIM, D. et al. Evaluation of antibacterial effects of *Rhizophora apiculata* pyroligneous acid on pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014a.

IBRAHIM, D. et al. Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology pathogenic bacteria**, v. 10, n. 3, p. 197–204, 2014b.

JEPSEN, S. et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S85–S93, 2017.

KIM, S. P. et al. Rice hull smoke extract inactivates *Salmonella Typhimurium* in laboratory media and protects infected mice against mortality. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 80–85, 2012.

KIM, T. et al. Probiotic material for livestock and its manufacturing method. **(Republic of Korea (Management Rural Development Administration), S. Korea; Gadel Organic Ferment Fodder Farming Association, Korea, 2009.**

KO, S. H. et al. NATURAL BIODEODORIZING AGENT COMPOSITION. **Espacenet KR20010048390**, v. 2003001405, n. 20030014052, p. 20030215, 2003.

KOYCHEV, S. et al. Antimicrobial Effects of Mastic Extract Against Oral and Periodontal Pathogens. **Journal of Periodontology**, p. 1–11, 2017.

LEBOIS, M. et al. Effects of divercin V41 combined to NaCl content, phenol (liquid smoke) concentration and pH on *Listeria monocytogenes* ScottA growth in BHI broth by an experimental design approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 931–937, 2004.

LEE, J. H. et al. Silver-ionized wood vinegar having enhanced antimicrobial activity and use thereof for improving or preventing disease caused by pathogenic bacteria. **Espacenet KR20060109757 A- Korea**, v. 2006010975, n. 20060109757, 2005.

LEE, S. H. et al. **Production of pyroligneous acid from lignocellulosic biomass and their effectiveness against biological attacks** *Journal of Applied Sciences*, 2010.

LINDNER, R. L. Meat processing with *Listeria monocytogene* re - inoculation control stage. **United States Patent 5043174**, p. 1–6, 1991.

LINGBECK, J. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014a.

LINGBECK, J. et al. Temperature effects on the antimicrobial efficacy of condensed smoke and lauric arginate against *Listeria* and *Salmonella*. **J Food Prot**, v. 77, n. 6, p. 934–940, 2014b.

LINGBECK, J. M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Sci**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014c.

LUCA, M. P. DE et al. Propolis Varnish : Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria , Cytotoxicity , and Sustained-Release Profile. v. 2014, 2014.

MANGUEIRA, D. F. B.; MANGUEIRA, L. F. B.; DINIZ, M. D. F. F. M. Candidose Oral. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 69–72, 2010.

MARUMOTO, S. et al. Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyroligneous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9106–9111, 2012.

MATHEW, S.; ZAKARIA, Z. A.; MUSA, N. F. Antioxidant property and chemical profile of pyroligneous acid from pineapple plant waste biomass. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1985–1992, 2015.

MATHEW, Z. A.; ZAKARIA, S. Pyroligneous acid—the smoky acidic liquid from plant biomass. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99:, p. 11, 2015.

MATSUI, S. Production of carbon fiber and carbon fiber produced thereby. **Espacenet JP19980339429 - Japan**, v. 2000160476, n. 2000160476, p. 20000613, 1998.

MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; CHEN, J. Evaluation of liquid smoke treated ready-to-

eat (RTE) meat products for control of *Listeria innocua* M1. **J Food Sci**, v. 73, n. 4, p. M179-83, 2008.

MILLY, P. J.; TOLEDO, R. T.; SREEKUMAR RAMAKRISHNAN. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. **Food Microbiology and Safety**, v. 70, n. 1, p. 12–17, 2005.

MOELLER, PATRICK, W.; RAMAKRISHNAM, SREEKUMAR F. Natural biodeodorizing agent composition. **US 536160**, v. 1, n. 19, p. 1–43, 2004.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

MORAIS, F. A. . et al. Polímeros a Base De Metil Metacrilato. Importância Em Odontologia. **INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTISTRY**, v. 6, n. 2, p. 63–66, 2007.

MURAKAMI, C.; BÖNECKER, M. Utilização de Fluoretos na Clínica Odontopediátrica Contemporânea. **Revista FGM News**, v. 12, p. 33–36, 2010.

NASCIMENTO, P. L. DE M. M. et al. Addition of ammonium-based methacrylates to an experimental dental adhesive for bonding metal brackets: Carious lesion development and bond strength after cariogenic challenge. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 151, n. 5, p. 949–956, 2017.

NEDEL, F. et al. Substituted diaryl diselenides: Cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 9–10, p. 345–352, 2012.

OGLIARI, F. A. et al. 2,3-Epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p. 472–477, 2006.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 466–476, 2007.

ORAMAHI, H. A.; YOSHIMURA, T. Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. **Journal of Wood Science**, v. 59, n. 4, p. 344–350, 2013.

PAULONE, S. et al. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are

differently affected by mouthwashes: An in vitro study. **New Microbiologica**, v. 40, n. 1, p. 45–52, 2017.

PENMETSA, R. K. R. et al. An invitro evaluation of antibacterial properties of self etching dental adhesive systems. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 7, p. 3–7, 2014.

PUSSEGODA, K. et al. Identifying approaches for assessing methodological and reporting quality of systematic reviews: A descriptive study. **Systematic Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2017.

QIN, W.; XIHAN, M.; TAO, Z. Preparation, chemical constituents analysis and antimicrobial activities of pyroligneous acid of walnut shell. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 24, n. 7, p. 276–279, 2008.

RAHMANI-BADI, A.; SEPEHR, S.; BABAIE-NAIEJ, H. A combination of cis-2-decenoic acid and chlorhexidine removes dental plaque. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 11, p. 1655–1661, 2015.

SALOMON, C.; GOYCOOLEA, F. M.; MOERSCHBACHER, B. Recent Trends in the Development of Chitosan-Based Drug Delivery Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 933–935, 2017.

SHANMUGAM, K. T. et al. Dental caries vaccine- A possible option? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 6, p. 1250–1253, 2013.

SHANMUGAM, K. T. et al. In situ study of the anticariogenic potential of fluoride varnish combined with CO2 laser on enamel. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 1512–1513, 2017.

SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018a.

SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018b.

SUÑEN, E. Minimum inhibitory concentrations of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. Cect 4030, p. 45–48, 1998.

SUÑEN, E.; FERNANDEZ-GALIAN, B.; ARISTIMUÑO, C. Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 387–393, 2001.

TAKAHASHI, A. et al. Effects of mechanical properties of adhesive resins on bond strength to dentin. **Dental Materials**, v. 18, n. 3, p. 263–268, 2002.

TEJADA, G. et al. Development and Evaluation of Buccal Films Based on Chitosan for the Potential Treatment of Oral Candidiasis. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 936–946, 2017.

THURETTE, J. et al. Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 11, p. 1475–1479, 1998.

TRIBBLE, T. B.; ROSE, G. W. Antimicrobial treatment and preservation of animal feedstuffs. **United States Patent 4308293**, p. 1–9, 1981.

VAN DE SANDE, F. H. et al. Biofilm Model for Enamel Demineralization and Antimicrobial Dose-Response Studies. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1057–1063, 2011.

VAN LANDUYT, K. L. et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Biomaterials**, v. 28, n. 26, p. 3757–3785, 2007.

VAN LOO, E. J. et al. Screening of commercial and pecan shell-extracted liquid smoke agents as natural antimicrobials against foodborne pathogens. **Journal of food protection**, v. 75, n. 6, p. 1148–52, 2012.

VAN MEERBEEK, B. et al. State of the art of self-etch adhesives. **Dental Materials**, v. 27, n. 1, p. 17–28, 2011.

VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale. **International**

Journal of Environmental Science and Technology, v. 6, n. 1, p. 13–22, 2009a.

VELMURUGAN, N. et al. Characterization of chikusaku-eki and mokusaku-eki and its inhibitory effect on sapstaining fungal growth in laboratory scale. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 13–22, 2009b.

VELMURUGAN, N.; HAN, S. S.; LEE, Y. S. Antifungal Activity of Neutralized Wood Vinegar with Water Extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata* Saw Dusts. **International Journal of Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 167–176, 2009.

WADA, S. Promoter for sound activation of natural environment and its production. **Espacenet JP19900418589 - Japan**, v. 0656617, n. 19940301, 1994.

WANG, H.; CAO, H. Progress of antimicrobial mechanism of wood vinegar from agricultural and forestry wastes. **J Agro-Environm**, v. 42, p. 741–742, 2014.

WATARAI, S.; TANA; KOIWA, M. Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in calves. **J Dairy Sci**, v. 91, n. 4, p. 1458–1463, 2008.

WEGEHAUPT, F. J. et al. Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 12, 2017.

WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 87, n. 1, p. 24–28, 2010.

WU, Q. et al. Study on the preparation of wood vinegar from biomass residues by carbonization process. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 98–103, 2015.

WU, Y.; BEDFORD, J.; RILEY, K. Antimicrobial smoke flavor for oral microflora control United. **United States Patent Application 20070212310**, p. 2013–2014, 2007.

YATAGAI, M. Biological activity of wood vinegar and its recent applications. **New Food Ind.**, v. 46, p. 5–16, 2004.

ZHAI, M. et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food

preservation. **Bioresource Technology**, v. 10, n. 1, p. 6219–6224, 2010.

ANEXO I

Comprovante de autorização do Comitê de Ética em pesquisa (CEP) Faculdade de
Odontologia – UFPel



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Título da Pesquisa: Propriedades biológicas de um veniz de extrato natural para aplicação odontológica

Pesquisador: Rafael Guerra Lund

CAAE: 66039317.3.0000.5313

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas/ FO-UFPEL

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P RQUIFTO_379116.pdf	01/06/2017 17:12:49		Acolto
Declaração de Rescisão	CartaRespostaCEP.docx	01/06/2017 17:11:52	Rafael Guerra Lund	Acolto
Declaração de Instituição e	Scan.pdf	01/06/2017 16:54:05	Rafael Guerra Lund	Acolto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.docx	01/06/2017 16:52:33	Rafael Guerra Lund	Acolto
Folha de Rosto	folhaderosto2.pdf	26/05/2017 16:19:10	Rafael Guerra Lund	Acolto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLECEP.docx	26/05/2017 15:17:35	Rafael Guerra Lund	Acolto
Orçamento	OrçamentoCEP.docx	26/05/2017 15:17:12	Rafael Guerra Lund	Acolto
Cronograma	CronogramaCEP.docx	26/05/2017 15:15:28	Rafael Guerra Lund	Acolto

Situação do Parecer: Aprovado

PELOTAS, 02 de Agosto de 2017

ANEXO II

Comprovante de Publicação do Artigo 1

Antimicrobial potential of pyrolygneous extracts – a systematic review and technological prospecting

Article reference	BJM423
Journal	Brazilian Journal of Microbiology
Corresponding author	Rafael Lund
First author	Juliana Leitzke Santos Souza
Received at Editorial Office	28 Feb 2018
Article revised	29 May 2018
Article accepted for publication	1 Jul 2018
DOI	10.1016/j.bjm.2018.07.001


[ISSN 1517-8382](#)

Last update: 24 Aug 2018

[Share via email](#)

Status comment

- Full bibliographic details are now available to cite your article. You will be alerted by email when the final version of your article (including full bibliographic details) has been published online.

Production events

24 Aug 2018	Corrected proof of your article published online	📄
16 Aug 2018	Your proof corrections have been returned to Elsevier	
16 Aug 2018	Proofs available for checking	
14 Aug 2018	Uncorrected proof of your article published online	📄
10 Aug 2018	Rights & Access form completed by you	
7 Aug 2018	Rights & Access form sent to you for completion	
3 Aug 2018	Received for production	

Bibliographic information

Volume/Issue
49S1

Full bibliographic details
Brazilian Journal of Microbiology 49S1
(2018) pp. 201-212

Corrected proof available online
24 Aug 2018

[View your corrected proof](#) [📄](#)

[Cited by in Scopus: 0](#) [📄](#)

[Get your Stats on Mendeley](#) [📄](#)

[Track another article](#)

ANEXO III

Comprovante de submissão do Artigo 2

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to
Biofouling

Manuscript ID
GBIF-2018-0240

Title
Antimicrobial and cytotoxic potential in vitro of films of *Eucalyptus grandis* pyroligneous extracts and chitosan for oral applications

Authors
Souza, Juliana
Neto, Tomaz
da Rosa, Laisa
Nedel, Fernanda
Campos, Angela
Lund, Rafael

Date Submitted
29-Nov-2018