

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**



**Dissertação**

**Compósito fotoativado contendo alfa-humuleno: caracterização, propriedades  
microbiológicas e biológicas**

**Tharsis Christini de Almeida Rossato**

**Pelotas, 2017**

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R826c Rossato, Tharsis Christini de Almeida

Compósito fotoativado contendo alfa-humuleno: caracterização, propriedades microbiológicas e biológicas / Tharsis Christini de Almeida Rossato ; Rafael Guerra Lund, orientador ; Cesar Henrique Zanchi, coorientador. — Pelotas, 2017.

85 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Alfa-humuleno. 2. Viabilidade celular. 3. Efeito antimicrobiano. 4. Propriedades físico-químicas. 5. Cimento periodontal. I. Lund, Rafael Guerra, orient. II. Zanchi, Cesar Henrique, coorient. III. Título.

Black : D151

**Tharsis Christini de Almeida Rossato**

**Compósito fotoativado contendo alfa-humuleno: caracterização, propriedades  
microbiológicas e biológicas**

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Henrique Zanchi

Pelotas, 2017

Tharsis Christini de Almeida Rossato

Compósito fotoativado contendo alfa-humuleno: caracterização, propriedades  
microbiológicas e biológicas

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 31/08/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Doutor em Odontologia (área de concentração, Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Evandro Piva

Doutor em Odontologia (área de concentração, Materiais Dentários) pela Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Josué Martos

Doutor em Odontologia (área de concentração, Investigação em Materiais Odontológicos) pela Universidade de Granada

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Luque Peralta (suplente)

Doutora em Odontologia (área de concentração, Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natália Marcumini Pola (suplente)

Doutora em Odontologia (área de concentração, Periodontia) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita

***“O coração do homem propõe o seu caminho; mas o Senhor *Ihe* dirige os passos. ” Provérbios 16.9***

## **Agradecimentos**

A **Deus** pela vida, saúde e permissão em finalizar mais esta etapa.

À **Universidade Federal de Pelotas** na pessoa do Excelentíssimo Reitor Pedro Rodrigues Curi Hallal.

À **Faculdade de Odontologia** na pessoa da Diretora Prof. Dr<sup>a</sup>. Adriana Etges, pela simpatissidade e ótimo trabalho demonstrados.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** na pessoa do Coordenador Prof. Dr<sup>o</sup>. Rafael Ratto de Moraes pelo exímio desempenho na função do cargo e profissionalismo.

Aos **mestres** que muito me ensinaram e influenciaram, permitindo maior desenvolvimento profissional.

Ao Professor Orientador **Dr<sup>o</sup>. Rafael Guerra Lund**, ao Professor Co-orientador **Dr<sup>o</sup>. Cesar Henrique Zanchi** pelo tempo disponibilizado e alto nível de orientação, fica minha admiração pela profissionalidade e alto grau de instrução de cada um de vocês.

À Professora **Dr<sup>a</sup>. Adriana Fernandes da Silva** pela oportunidade quando de forma fácil e inteligente me introduziu no ambiente da iniciação científica logo no 3<sup>o</sup> semestre da graduação, além de continuar contribuindo até o momento.

Aos laboratórios: Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais (CDC-Bio); Microbiologia; Núcleo de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Federal de Pelotas, nos quais o estudo foi desenvolvido.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pelo incentivo à pesquisa por meio da concessão de bolsa de estudos durante dezesseis meses do decorrido mestrado.

Ao meu esposo, **Hugo Arantes**, pelo amor, apoio, encorajamento, cumplicidade, amizade e também compreensão pelos meus períodos de ausência, amo muito você.

Aos meus pais, **Aginaldo Rossato** e **Gehias Jacqueline de Almeida Rossato**, pela contribuição psicológica e fomento financeiro para início e fim deste período, sem o apoio de vocês não seria possível concluir essa fase. Além de toda forma de amor demonstrada, minha honra, orgulho e admiração por vocês. Amo vocês sem fim.

Aos meus orgulhos de irmãos, **Rebecca Luiza** e **Isaac Rossato**, pela força, união, amizade, amor e por estarem sempre presentes de uma forma ou de outra em todos os momentos da minha caminhada. Amo vocês.

Ao funcionário **Celaniro Jr.** e às técnicas **Tatiana Ramos, Jozi** e **Lizangela Ferreira** pelo profissionalismo, assistência, contribuição e bate-papos (mesmo que rápidos) que permitiram o desenvolvimento do trabalho com mais ânimo, proporcionando um ambiente de trabalho excelente. Assim como os demais funcionários e servidores da FO-UFPel que desempenham suas atividades com um belo sorriso e simpatissidae.

Aos **Amigos** com os quais eu pude contar e que estiveram perto de mim, mas também aos que mesmo de longe me auxiliaram com palavras de incentivo.

Aos **alunos** e **ex-alunos** do PPGO-UFPel, em especial a **Ma. Bruna Vetromila** e **Dr<sup>a</sup>. Marina Kaiser** pelo auxílio na obtenção de um dos materiais primordiais nesta dissertação.

Aos **alunos da iniciação científica** que eu detive oportunidade de compartilhar e somar conhecimento.

Minha gratidão!

## **Notas Preliminares**

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição em Capítulos não convencionais, descrita no referido manual. <<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=documentos&i=7>> Acesso em: <26/07/2017>.

O projeto de pesquisa contido nesta dissertação é apresentado em sua forma final após qualificação realizada em 22 de fevereiro de 2016 e aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores Dr<sup>a</sup> Adriana Fernandes da Silva, Dr<sup>a</sup> Giana da Silveira Lima, Dr<sup>o</sup> Thiago Marchi Martins.

## Resumo

ROSSATO, Tharsis Christini de Almeida. **Compósito fotoativado contendo alfa-humuleno: caracterização, propriedades microbiológicas e biológicas**. 2017. 85f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Objetivou-se desenvolver um cimento periodontal fotoativado com base em monômeros metacrilatos de características elastoméricas, com viscosidade adequada para aplicação em odontologia. Além disso, adicionou-se óleo de alfa-humuleno, substância com propriedades antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, sem odor ou gosto desagradáveis. Como referencia comercial foram utilizados os cimentos cirúrgicos Barricaid® e Periobond®. Duas formulações foram desenvolvidas, A e outra, B. Para desenvolver os materiais experimentais utilizou-se monômeros, plastificantes, fotoiniciador, inibidor de polimerização, alfa-humuleno e sílica. A adição do alfa-humuleno (Hum) foi realizada em porcentagem por peso de 1%, 5%, 10%, 20%. Para o delineamento do grupo A: Ea, refere-se ao cimento experimental sem óleo da formulação A; EaHum1%, EaHum5%, EaHum10%, EaHum20%, referem-se aos materiais formulados com Ea nas respectivas porcentagens de óleo. Para o delineamento do grupo B: Eb, refere-se ao cimento experimental sem óleo da formulação B; EbHum1%, EbHum5%, EbHum10%, EbHum20%, referem-se aos materiais formulados com Eb nas respectivas porcentagens de óleo. Os materiais testados foram caracterizados por grau de conversão por meio de aparelho espectrofotômetro infravermelho por Transformada de Fourier (n = 3), resistência coesiva máxima (n = 4) e sorção e solubilidade (n = 10). A citotoxicidade do material foi analisada pelo ensaio de viabilidade celular utilizando a linhagem de células L929 (n = 4) e o efeito antimicrobiano pelo teste de contato direto modificado contra *E. faecalis* (n = 3) e *S. aureus* (n = 3). Avaliaram-se as diferenças estatísticas por análise de variância uma via ou duas vias seguido do teste complementar de SNK para os materiais experimentais (p < 0,05). O teste de Dunnet, para comparar as referenciais comerciais contra os materiais experimentais (p < 0,05). Os cimentos com EaHum1% e EbHum1% e EbHum5% apresentaram alta viabilidade celular estatisticamente semelhante ao Barricaid®. Todos os cimentos experimentais apresentaram características antimicrobianas contra *E. faecalis* e *S. aureus* em relação ao controle positivo. O grau de conversão e a sorção e solubilidade não foram influenciadas pela adição do óleo para a formulação B sendo similar ao Barricaid®. A resistência coesiva de Ea e Eb foram semelhantes ao Barricaid®. Em relação às propriedades avaliadas conclui-se que a formulação B apresentou melhor desempenho *in vitro* e quando acrescentado o alfa-humuleno obteve maior viabilidade celular e resistência coesiva em relação a formulação A, sem perder sua característica antimicrobiana.

**Palavras-chave:** alfa-humuleno; viabilidade celular; efeito antimicrobiano; propriedades físico-químicas; cimento periodontal.

## Abstract

ROSSATO, Tharsis Christini de Almeida. **Light-cured composite containing alpha-humulene: characterization, microbiological and biological properties.** 2017. 85p. Dissertation (Master degree in Dentistry). Graduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

The objective of this study was to develop a light-cured periodontal dressing based on methacrylate monomers with elastomeric characteristics and viscosity suitable for dentistry application. In addition, alpha-humulene oil which has anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial properties, without odor or taste disagreeable. Two formulations were developed A formulation and B formulation. Monomers, photoinitiator, polymerization inhibitor, alpha-humulene and silica were used to create the two base formulations. Alpha-humulene addition was performed in 1 w%, 5 w%, 10 w%, 20 w%. Barricaid® and Periobond® were used as commercial references. Formulation A design: Ea, refers to experimental dressing without oil; EaHum1%, EaHum5%, EaHum10%, EaHum20%, refers to experimental dressing with the corresponding percentages of oil. Formulation B design: Eb, refers to experimental dressing without oil; EbHum1%, EbHum5%, EbHum10%, EbHum20%, refers to experimental dressing with the corresponding percentages of oil. Cytotoxicity was verified by the cell viability assay using the L929 rat cell line at 24 hours (n = 4) and the antimicrobial effect by the modified direct contact test against *E. faecalis* (n = 3) and *S. aureus* (n = 3). The materials tested were characterized by degree of conversion by Fourier transform infrared spectroscopy (n = 3), cohesive strength (n = 4) and sorption and solubility (n = 10). Statistical analysis were assessed by one or two-way analysis of variance followed by the SNK' test to compare the experimental materials and Dunnett's test to compare commercial references against the experimental materials ( $p < 0.05$ ). Periodontal dressings EaHum1%, EbHum1% and EbHum5% showed cell viability statistically similar to Barricaid®. All the experimental dressings showed antimicrobial properties against *E. faecalis* and *S. aureus* according to the positive control. The degree of conversion, sorption and solubility were not influenced by the addition of the oil to the B formulation, being similar to Barricaid®. Cohesive strength values of Ea and Eb were similar to Barricaid®. In relation to the evaluated properties, it was concluded that the formulation B showed better *in vitro* performance and when added the alpha-humulene obtained greater cellular viability and cohesive strength than A formulation, without losing antimicrobial properties.

**Key-words:** alpha-humulene; cell viability; antimicrobial effect; physical-chemical properties; periodontal dressing.

## Sumário

<b>1 Introdução .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Justificativa .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Objetivo geral .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Hipótese .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Metodologia .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1 Confeção dos corpos de prova .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.2 Ensaio Físico-químicos .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.3 Ensaio biológico .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.4 Ensaio microbiológico .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Artigo .....</b>	<b>31</b>
<b>3 Patente .....</b>	<b>53</b>
<b>4 Considerações finais .....</b>	<b>78</b>
<b>Referências.....</b>	<b>80</b>

## **1 Introdução**

### **Propriedades de um cimento cirúrgico**

O cimento cirúrgico foi primeiramente apresentado por Ward (1923) para recobrimento de feridas pós-cirúrgicas. O cimento cirúrgico deve apresentar as seguintes propriedades: facilitar e orientar a cicatrização evitar a formação excessiva de tecido de granulação; controlar o sangramento pós-operatório; imobilizar temporariamente os dentes; manter o retalho gengival em posição após ter sido suturado e ajudar imobilizar um enxerto gengival, dissipando a tração da mucosa vestibular e do lábio; diminuir a possibilidade de infecção da ferida; proteger a ferida do trauma superficial mastigatório e da ação irritante de alimentos; proporcionar conforto e controle da dor pós-operatória (TOLEDO; ABIRACHED, 1972).

Os cimentos cirúrgicos devem possuir as seguintes qualidades: facilidade de manipulação e inserção; apresentar boa adaptação ao tecido; resistir aos traumas superficiais; ser confortável e estético, sendo esta uma qualidade cada vez mais buscada e valorizada nos dias atuais; promover hemostasia; ser bacteriostático ou bactericida; ter uma ação analgésica; não induzir reações alérgicas; não provocar irritação dos tecidos vizinhos; não apresentar odor ou gosto desagradável. Além disso, o tempo de presa do cimento cirúrgico ideal deve ser compatível com o tempo necessário que seja perfeitamente moldado sobre a ferida cirúrgica, áreas interdentais e sua superfície deve lisa permitindo uma fácil higienização. (RUBINOFF et al., 1986).

Estudos concluem que a colocação do cimento após gengivectomia facilitava a cura devido ao fato de proporcionar uma superfície protetora no sítio cirúrgico (BERNIER; KAPLAN, 1947), proporcionava boa recuperação dos tecidos com aplicação de cimento cirúrgico de óxido de zinco e eugenol (LOE; SILNESS, 1961), além disso, a pressão exercida pelo cimento favorecia indiretamente a hemostasia (BAER, 1969), proporcionando maior conforto para o paciente e reparo mais rápido

e eficiente da ferida cirúrgica do que sem o cimento cirúrgico (MILANEZI; HOLLAND, 1972).

Entretanto, a barreira interface cimento/tecido pode resultar em acúmulo de placa e retardo na cura (LOE; SILNESS, 1961). Frisch & Bhaskar (1967), por exemplo, não encontraram diferenças significativas na cura das feridas com ou sem a aplicação de cimento devido a esse acúmulo de biofilme, logo, a adaptação do cimento à ferida após cirurgia é fundamental para uma melhor reparação dos tecidos (PERSSON; THILANDER, 1968).

Apenas um número limitado de estudos avaliou as propriedades físicas e mecânicas dos cimentos periodontais. Essas propriedades dependem da composição do cimento periodontal. Estudiosos (RUBINOFF; GREENER; ROBINSON, 1986), objetivaram padronizar a avaliação das propriedades físicas dos cimentos periodontais, mas até então, não existe uma técnica reprodutível exata e padronizada para avaliar essas propriedades. Além disso, no que diz respeito a novos cimentos periodontais, não há pesquisa suficiente disponível.

Um cimento periodontal experimental sem eugenol foi testado quanto a tempo de trabalho e presa, adesão ao esmalte e mudanças dimensionais lineares e mostrou propriedades físicas iguais ou superiores às dos cimentos comerciais testados (RUBINOFF; GREENER, 1985).

Quando testada a viscosidade de Coe-Pak, Peripac e Peripac Improved, nenhum dos cimentos exibiu propriedades de fluidez ideais durante a manipulação e adaptação, além disso foram avaliadas as propriedades adesivas para esmalte e os três materiais apresentaram propriedades adesivas fracas (WATTS; COMBE, 1982). Em outro estudo, Gjerdet & Haugen (1977), avaliaram as mudanças dimensionais de Coe-pak, Wondrpak e Peripac durante os primeiros minutos e mostraram contração após o tempo de presa.

Embora amplamente aceito, Coe-pak tem uma série de desvantagens, como, defeiciente estética, insuficiente tempo de presa e baixa fluidez durante a manipulação (CHESHIRE et al., 1996). No entanto, após estudo clínico, concluiu-se que Barricaid<sup>®</sup> é facilmente aplicado, possui boa retenção e supera as limitações do cimento convencional (com óxido de zinco e sem eugenol) (MADAN et al., 2013).

Os fenômenos de sorção e solubilidade podem ser precursores de uma variedade de processos químicos e físicos que acarretam em efeitos deletérios na

estrutura do material polimérico podendo comprometer seu desempenho clínico (FERRACANE, 2006). Realizou-se uma caracterização do material Barricaid®, fotoativado, que mostrou propriedades físicas superiores as dos materiais de presa química, em particular, sorção e solubilidade em água em diferentes temperaturas (VON FRAUNHOFER; ARGYTOPOULOS, 1992).

A sorção de água que é dispersa na matriz polimérica, atua como plastificante, causando inchamento do polímero. A quantidade de água absorvida depende assim do equilíbrio entre o volume disponível de espaços livres, afinidade físico-química de grupos de polímeros à água e à resistência das cadeias poliméricas à tensão de deformação (SIDERIDOU; TSERKI; PAPANASTASIOU, 2003). Esses fatores podem influenciar também, os valores da resistência à tração.

Sunzel (1997), afirmou que a combinação de colofonia e zinco na composição de cimentos periodontais podem causar efeitos citotóxicos. Kozan & Mantell (1978), concluíram que os cimentos periodontais contendo eugenol mostraram atraso na cura da ferida, mais reações alérgicas (BARKIN; BOYD; COHEN, 1984) e mais inibição da proliferação de fibroblastos (EBER et al., 1989).

Estudo em animais examinou histologicamente as respostas teciduais das áreas cirúrgicas cobertas por 7 dias com o cimento Barricaid® e o cimento com eugenol, Wondrpak®. Após 14 dias, não houveram diferenças entre os locais de teste e de os de controle. Do ponto de vista biológico, esses achados sugerem que não há contra-indicação para a aplicação destes cimentos após a cirurgia periodontal (SMEEKENS; MALTHA; RENGGLI, 1992).

### **Dos cimentos periodontais no mercado**

Os cimentos periodontais ou cirúrgicos podem ser classificados de acordo com a composição: contendo óxido de zinco e eugenol; óxido de zinco sem eugenol; sem óxido de zinco e sem eugenol (que incluem os fotoativados).

#### *Cimento cirúrgico contendo oxido de zinco e eugenol*

Produtos com eugenol podem causar reações alérgicas em pessoas suscetíveis e causar irritação à pele, mucosa bucal e olhos. O cimento Odahcam (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) é indicado para cirurgias periodontais,

ósseas e mucogengivais ou em vestibuloplastia. É apresentado em forma de 50g de pó (óxido de zinco, acetato de zinco, ácido tânico ao éter e celulose) e frasco com 20 ml (eugenol, óleo de oliva e corante). O modo de uso é a mistura numa proporção que se obtenha uma consistência semelhante a massa de vidraceiro. É necessário isolar as mãos e dedos com o pó do cimento fazendo um rolete no tamanho suficiente para recobrimento da área operada até a superfícies dos dentes onde ficará aderido.

O Cimento cirúrgico TechNew (Technew, Rio de Janeiro, Brasil), indicado como revestimento periodontal para proteção das suturas oriundas de cirurgias periodontais. O cimento é produzido por mistura do pó (acetato de zinco, ácido tânico, breu, óxido de zinco e celulose) e líquido (eugenol, óleo de oliva e corante vermelho DC Red 17) até obter consistência de massa de vidraceiro. Por conter eugenol pode causar reação alérgica. Recomenda-se ao paciente após procedimento cirúrgico mastigar do lado oposto ao operado, assim como utilizar enxaguatórios capazes de controlar o biofilme.

O cimento cirúrgico Lysanda é destinado a proteger áreas operadas em cirurgias bucais. O kit é composto por dois frascos, sendo um em pó (50 g), à base de óxido de zinco, e outro líquido (20 ml), à base de eugenol.

#### *Cimento cirúrgico contendo óxido de zinco sem eugenol*

Peripac (GC America Inc., Chicago, Estados Unidos), apresenta-se em forma de uma pasta, composta por sulfato de cálcio, sulfato de zinco, óxido de zinco, polimetilmetacrilato, dimetoxitetra-etilenoglicol, ácido ascórbico, pigmento de óxido de ferro e aroma. A cura deste material começa quando em contato com a água e após 20 minutos é finalizada. Sua aplicação não pode exceder 2-3 minutos e o material mantém-se por 8-10 dias. Indicado para adicionar-se medicação em pó, liofilizada, atuando em tecidos necróticos.

Vocopac (Voco, Cuxhaven, Alemanha) é fornecido na forma de duas pastas, base e catalizador, com cura química. Material permanece elástico em boca sem se quebradiço. Vocopac contém colofônio purificado, óxido de zinco, acetato de zinco, óxido de magnésio, ácidos graxos, resina natural, óleos naturais e corante e127, sendo contraindicado em pacientes alérgicos aos ingredientes e o contato com o osso deve ser evitado. Pode ocorrer descoloramento.

SeptoPack (Sepdont, saint-maur-des-fosses, cedex, França), é fornecido em frasco de 60 g contendo acetato de amilo, ftalato de dibutilo, polimetacrilato de metilo, óxido de zinco e sulfato de zinco. Seu tempo de trabalho deve ser de 2-3 minutos, e o tempo de presa é em torno de 30 minutos. Devido ao ftalato de dibutilo ser tóxico, pode danificar os olhos do feto e há risco de prejudicar a fertilidade. Logo é mister o uso de equipamentos de segurança para sua manipulação.

Periocarea (Voco, cuxhaven, Alemanha) é fornecido em dois tubos (pasta e gel). Quantidades iguais devem ser misturadas até que a cor esteja uniforme. O tempo de presa é de 45-60 segundos e o tempo de trabalho é de 4-5 minutos.

Coe-Pak (De Trey/Denstply, Konstanz, Alemanha) tem como base a reação entre óxido metálico e ácidos graxos, apresenta-se em forma de duas pastas.

O Cimento cirúrgico Perio Bond (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil), apresenta-se em forma de pasta base (90 g, ácidos graxos, resina sintética, hidrocarboneto saturado, timol, cera natural e essência de menta) e pasta aceleradora (90g, óleo natural, óxido de zinco, hidrocarboneto saturado, timol, pigmento, óxido de magnésio, BHT e essência de menta). É indicado para uso em cirurgias periodontais, permitindo seu uso em áreas mais sensíveis da mucosa por não ter eugenol. Possui sabor e aroma agradáveis. Contém Timol, que causar reações adesivas em pessoas susceptíveis. Se existir alergia a óleos essenciais fenólicos, descontinuar o uso. Modo de usar é dispensar comprimentos iguais das pastas base e acelerador, misturar com uma espátula por 30 a 45 segundos, até obter pasta de coloração rósea uniforme. Pode-se adicionar óxido de zinco para uma massa mais consistente. Após a mistura das pastas aguardar 2-3 minutos e confeccionar um rolete com a massa. Para evitar aderência nos dedos, lubrifica-los com vaselina líquida.

Pericem (Technew, Rio de Janeiro, Brasil) possui mesma indicação do anterior. Sua composição: pasta base (ácidos graxos, resina natural, resina sintética, óleo mineral, timol, cera natural e aroma de menta); pasta aceleradora (óleo mineral, óleo vegetal, óxido de zinco, óxido de magnésio, pigmento de óxido de ferro, timol, BHT e aroma de menta). Não deve ser utilizado em pessoas alérgicas ao timol. Dispensar comprimentos iguais das duas pastas, misturar por 30-35 segundos, podendo adicionar óxido de zinco para massa mais consistente, aguardar 2-3

minutos e confeccionar um rolete com a massa. Para evitar a aderência da massa, lubrificar os dedos com vaselina líquida.

#### *Cimentos sem óxido de zinco sem eugenol*

Reso-pac (Hager & Werken Gm bH & Co. KG, Post fach, Alemanha) é disponibilizado como uma pasta hidrofílica, não necessita de mistura e permanece no local por até 30 horas, até mesmo em feridas com sangramento. Reso-pac incha até adquirir consistência de gel em até 3 minutos.

Mucotect (Hager & Werken Gm bH & Co. KG, Alemanha) possui um tubo com carboximetil cellulose, acetato de polivinilo, álcool etílico, vaselina e resina de óxido de polietileno. Mucotect é uma pasta hidrofílica que adere por mais de 30 horas em até mesmo áreas úmidas ou com sangramento.

#### *Cimento cirúrgico fotoativado*

Barricaid® (L.D. Caulk, Milford, Delaware, Estado Unidos da América), um cimento cirúrgico fotopolimerizável, lançado em 1989, é um compósito de baixa viscosidade e pegajosidade, de composição básica de resina de dimetacrilato poliéter uretana, sílica silanizada como carga inorgânica, fotoiniciador, aceleradores de polimerização, estabilizante e corante. Este material se apresenta em forma de seringa opaca para aplicação direta. Após a fotoativação apresenta consistência borrachóide e baixa solubilidade (PETELIN et al., 2004). Apresenta vantagem no controle do seu tempo de presa, melhor manipulação e inserção; que são uma das principais dificuldades na utilização dos cimentos cirúrgicos convencionais; além de possuir melhor resultado estético mimetizando a mucosa oral e sabor atenuado.

A reação de compatibilidade biológica do Barricaid® tem sido estudado comparando com o cimento à base de óxido de zinco e eugenol e demonstra ser mais biocompatível (SMEEKENS; MALTHA; RENGGLI, 1992). No entanto, ainda no Brasil não há um cimento cirúrgico fotoativado para o uso profissional.

Contudo, apesar das vantagens apresentadas por compósitos temporários para recobrimento gengival uma das principais preocupações acerca desses novos materiais diz respeito à biocompatibilidade que estas composições poliméricas sobre o tecido conjuntivo. Estudos *in vitro* evidenciam a liberação de monômeros na

cavidade oral em formulações semelhantes de materiais resinosos utilizados nos materiais restauradores (HANKS, 1988) e dos sistemas de união. A liberação de monômeros tem sido reportada como principal fator responsável pela citotoxicidade e sensibilidade pós-operatória.

### **Potencial farmacológico do fitomedicamento incluído no cimento cirúrgico**

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Portanto, o alfa-humuleno é considerado um fitomedicamento, sendo um componente presente em plantas medicinais como lúpulo (*Humulus lupulus L.*), erva baleeira (*Cordia verbenácea*), arnica mineira (*Lychnophora pinaster*), entre outras plantas.

Na indústria de alimentos, quase que exclusivamente consumido pela indústria cervejeira o lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é atribuído aos seus metabólitos secundários, importantes para o amargor, aroma e conservantes. Os componentes considerados são alfa-ácidos, beta-ácidos e xanthohumol, que são componentes exclusivos de lúpulo, e  $\alpha$ -humuleno e beta-cariofileno, sesquiterpenos (STEENACKERS et al., 2015).

*Cordia verbenacea* é uma planta medicinal tradicional que cresce amplamente ao longo da costa sudeste do Brasil, pertencente à família Boraginaceae, que tem sido amplamente utilizada na medicina popular, na forma de extrato alcoólico, ou cozimento e infusões para suas propriedades antiúlcera, antimicrobianas, antiinflamatória, antirreumáticos, analgésicos e estimulante. O óleo essencial de *C. verbenacea* é composto principalmente de mono e sesquiterpenos e os seus principais componentes são  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno e alloaromadendrene. Outros componentes incluem  $\alpha$ -humuleno, espatulenol, b-cariofileno epóxigurjuneno (DE CARVALHO et al., 2004).

O uso da terapia à base de plantas medicinais constitui uma abordagem atrativa para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios. O fitomedicamento,  $\alpha$ -humuleno, de forma molecular  $C_{15}H_{24}$ , é um sesquiterpeno e um isômero do beta-

cariofileno, que é conhecido pelo seu potencial antiinflamatório (CALIXTO et al., 2004).

Resultados mostraram que a administração por via oral do óleo essencial de *Cordia verbenácea* em ratos, obteve inibição do edema na pata de ratos, além de diminuir significativamente o fator de necrose tumoral TNF-. Estas propriedades antiinflamatórias foram atribuídas a dois compostos, um sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno (PASSOS et al., 2007).

Medeiros (2007), investigou em modelo de inflamação aguda em pata de rato, induzido por LPS e caracterizada por edema da pata que tanto  $\alpha$ -humuleno quanto trans-cariofileno inibiram a indução de LPS, a ativação de NF-kappaB e a migração de neutrófilos, embora apenas  $\alpha$ -humuleno teve a capacidade de impedir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1beta (FERNANDES, 2007).

Chaves (2008), concluiu que o  $\alpha$ -humuleno exibiu um aparecimento rápido e relativamente uma boa absorção após a administração oral e tópica. Tomados em conjunto, estes resultados contribuem ainda mais para uma explicação sobre as propriedades antiinflamatória e antinociceptiva tópicos e sistêmicos previamente relatados para o óleo essencial de  $\alpha$ -humuleno obtido a partir de *Cordia verbenácea*.

Michieli et al. (2009), testaram a atividade antimicrobiana dos extratos de *C. verbenacea*, submetido a rastreio contra quatro cepas de bactérias pelo método de diluição em ágar e concluíram que a atividade inibidora dos extratos sobre as bactérias gram-positivas foi significativamente mais elevada do que em bactérias gram-negativas. Sendo os componentes mais importantes identificados no extrato artemetina,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, entre outros.

Portanto, contribuir com suas qualidades de ação bacteriostática ou bactericida, de ação analgésica, não alergênico, não irritante, de odor ou gosto desagradável o fitoterápico alfa-humuleno será acrescentado em diferentes concentrações na formulação do cimento cirúrgico em desenvolvimento.

## 1.1 Justificativa

Não existe ainda no mercado brasileiro um cimento cirúrgico fotoativado, o qual supriria algumas das deficiências dos cimentos cirúrgicos convencionais tanto

em relação ao conforto do paciente (odor, gosto, estética), quanto relacionado ao profissional (manipulação do material, tempo de presa controlado pelo operador a fim de alcançar o perfeito molde do cimento cirúrgico em boca). Além disso, propriedades farmacológicas como de analgesia, efeito antiinflamatório e ação bacteriostática ou bactericida não se reúnem ainda em um único cimento cirúrgico. Ultimamente tem se estudado um fitomedicamento, o qual geraria todas essas propriedades farmacológicas e é baseado em estudos prévios que iremos testar esse fitomedicamento incorporado em uma nova formulação de cimento cirúrgico para investigar a continuidade ou não da ação desse fitomedicamento.

## **1.2 Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um compósito fotoativado biocompatível com comportamento elastomérico e contendo um fitomedicamento, alfa-humuleno, para utilização como cimento cirúrgico.

### **1.2.1 Objetivos específicos**

- I. Desenvolver a formulação de um cimento cirúrgico baseado nos novos elastômeros Exothane™ com a adição do agente natural, alfa-humuleno.
- II. Avaliar as propriedades físico-químicas dos cimentos testados.
- III. Avaliar a proliferação celular dos cimentos testados.
- IV. Avaliar a atividade antimicrobiana dos cimentos testados

## **1.3 Hipótese**

A hipótese nula a ser testada é que o material experimental não apresentará diferenças significantes em relação ao material de referência comercial (Barricaid®, L.D. Caulk, Milford, Delaware, EUA) em relação à resistência à coesiva, sorção e solubilidade.

A hipótese do estudo é que o cimento experimental com adição de alfa-humuleno apresentará diferenças significantes em relação aos referenciais comerciais quanto à citotoxicidade e ao ensaio antimicrobiano.

#### 1.4 Metodologia

Os ensaios mecânicos deste estudo, *in vitro*, foram realizados no Laboratório Centro de Desenvolvimento e Controle em Biomateriais (CDC-Bio). Os ensaios biológicos, no Laboratório de Microbiologia Oral e no Núcleo de Biologia Celular e Tecidual (NCTBIO-I) da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Para as análises estatísticas foi utilizado o software SigmaStat® (Versão 3.5, Systat Software Inc., Port Richmond, CA, USA) e considerado estatisticamente significativo o valor  $p < 0,05$ .

#### Referências comerciais utilizadas

Neste estudo foram utilizados como referência comercial os cimentos cirúrgicos Barricaid® e Periobond®, tabela 1.

Tabela 1. Materiais comerciais utilizados como referência comercial.

<b>Materiais</b>	<b>Composição</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Lote</b>
Barricaid®	Resina, poliéter, uretano dimetacrilato, sílica silanizada, fotoiniciador, acelerador, estabilizador e corante.	Dentsply, Milford, Delaware, EUA.	160624
Periobond®	Pasta base: breu/colofônia, celulose, espessante e ceras naturais, ácido graxo coco, clorotimol (antibacteriano), acetato de zinco, álcool desnaturado, metanol, petrolatum, lorothidol (antifúngico); Acelerador: óxido de zinco, óleo vegetal, óleo mineral, clorotimol, sílica, óxido de magnésio, resina sintética, cumarina	Dentsply, Petrópolis, RJ BR.	132214H

## Formulação do cimento experimental

Os reagentes analíticos empregados no presente estudo estavam disponíveis no CDC-BIO, da Faculdade de Odontologia da UFPel. A proporção em massa dos produtos experimentais foi realizada, isotermicamente a  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 70%, em balança analítica de precisão (AW220D; Shimadzu, Japão). Para a manipulação do compósito foram utilizados os componentes listados na tabela 2.

Tabela 2. Materiais utilizados na formulação do compósito experimental.

<b>Monômeros</b>	<b>Fotoiniciador</b>	<b>Cargas</b>	<b>Outros</b>	<b>Fitomedicamento</b>
Exothane 32 (Esstech Inc., Essington, PA, USA).	Canforoquinona (Esstech Inc).	Partículas de sílica não silanizada (7nm, Aerosil 380, Degussa, GER).	DDM, PGMM, DHEPT, EDAB (Esstech Inc).	Alfa-humulleno (lote BCBN2536V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

DDM, Dodecanodiol dimethacrylate; PGMM, polipropileno glicol monometacrilato; DHEPT, dihidroxietil-p-Toluidina; EDAB, etil 4-dimetil-aminobenzoato.

## Delineamento experimental

Após a obtenção das blendas dos cimentos experimentais foi acrescentado o fitomedicamento nas diferentes concentrações por peso de 1%, 2%, 5% e 10%. O fitomedicamento foi obtido pela Sigma-Aldrich.

Os grupos foram divididos em formulação A e formulação B. Sendo para formulação A: Cimento cirúrgico experimental A sem óleo (Ea); Cimento cirúrgico experimental A com 1% de alfa-humuleno (Ea<sub>Hum1%</sub>); Cimento cirúrgico experimental A com 5% de alfa-humuleno (Ea<sub>Hum5%</sub>); Cimento cirúrgico experimental A com 10% de alfa-humuleno (Ea<sub>Hum10%</sub>); Cimento cirúrgico experimental A com 20% de alfa-humuleno (Ea<sub>Hum20%</sub>). E para a formulação B: Cimento cirúrgico experimental B sem óleo (Eb); Cimento cirúrgico experimental B com 1% de alfa-humuleno (Eb<sub>Hum1%</sub>); Cimento cirúrgico experimental B com 5% de alfa-humuleno (Eb<sub>Hum5%</sub>); Cimento cirúrgico experimental B com 10% de alfa-humuleno (Eb<sub>Hum10%</sub>); Cimento cirúrgico

experimental B com 20% de alfa-humuleno (Eb<sub>Hum20%</sub>); Cimento cirúrgico Periobond<sup>®</sup> (PB); e Cimento cirúrgico Barricaid<sup>®</sup> (BC).

#### 1.4.1 Preparo dos corpos de prova

Para todos os ensaios, exceto resistência à tração, os corpos de prova (CP) de cada produto foram confeccionados em matriz metálica circular com 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro (Fig. 1). Para o preparo dos CP dos cimentos experimentais e do Barricaid<sup>®</sup>, foi posicionada sob e sobre o material uma tira de poliéster e fotopolimerizado por uma unidade de LED (Radii Cal SDI, SP, Brasil) sob uma irradiância 690 mW/cm<sup>2</sup>, com tempo de exposição de 30 segundos de cada lado. A distância entre a fonte de luz e a matriz foi padronizada em 0,5 cm. Para o cimento Periobond<sup>®</sup> de presa química, foram dispensadas partes iguais da pasta base e catalisadora e misturadas para obtenção de uma pasta homogênea, de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida incluída na matriz metálica, para confecção de cada CP. Todos os corpos de prova para os testes biológicos e microbiológicos foram esterilizados por luz ultravioleta em capela de fluxo laminar por 20 min de cada lado no NCTBIO-I. Para retirar as imperfeições foi utilizada lixa de granulação #600 e depois #1200.



Figura 1. Matriz metálica utilizada para a confecção dos corpos de prova.

Para o ensaio de resistência à tração os CP foram confeccionados utilizando uma matriz metálica de com uma área de constricção de 1,0 mm<sup>2</sup> e fotopolimerizados por 30 segundos em cada lado.

#### 1.4.2 Ensaios físico-químicos

##### Resistência coesiva

Para este teste, apenas foram utilizadas amostras do cimento experimental e do Barricaid<sup>®</sup>, devido à impossibilidade de confecção de CP deste tipo com o

cimento de presa química Periobond. Antes de realizar o ensaio, os corpos foram imersos em água deionizada e armazenados em uma estufa a 37°C por 24 horas (n = 4).

O dispositivo metálico específico para este teste (Fig. 2 e 3) foi acoplado a uma máquina de ensaio mecânico EMIC DL-500 (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com adaptação de célula de carga de 100 Newtons. As amostras foram medidas através de paquímetro digital com precisão de 0,01mm, na área de constrição de 1,0 ( $\pm 0,2$ ) mm<sup>2</sup>, em altura e largura e fixadas no dispositivo de tração por intermédio de adesivo a base de cianocrilato (Superbond Gel, Loctite, SP, Brasil), de modo a posicionar a constrição do corpo de prova paralela ao longo eixo de carregamento de tração.

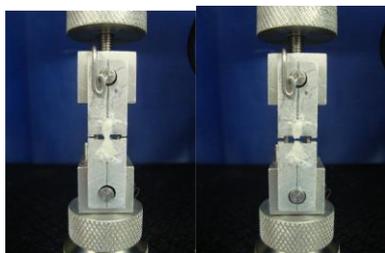


Figura 2 e 3. Montagem de corpo de prova em dispositivo de tração em pequena escala para registro da resistência coesiva máxima à tração (MPa).

Em seguida o dispositivo foi acoplado à máquina de ensaios universal e feito o carregamento de tração com velocidade de 0,5 mm/minuto, até a fratura da amostra. No momento da fratura os dados foram coletados para posterior análise. Os valores finais de resistência à tração foram calculados dividindo-se os valores de resistência de ruptura pela área das secções transversais das amostras, determinando a resistência máxima (MPa) (NAYIF et al., 2007).

Análise estatística foi realizada pelas comparações entre os grupos através da análise de variância de uma via seguido do teste de SNK ( $p < 0,05$ ), e para comparar os experimentais com comerciais foi aplicado o teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

### **Sorção e solubilidade**

Dez espécimes foram confeccionados (Malacame et al., 2006) (explicados em 1.4.1), e os ensaios foram baseados na ISO 4940:2009 (International Standards Organization). Os espécimes foram mantidos em um “dessecador” contendo sílica e cloreto de cálcio e armazenados em estufa a 37°C. Após 24 horas, a massa de

todos os espécimes foi mensurada e com auxílio de um paquímetro digital foram medidos o diâmetro e a espessura para obtenção do volume de cada espécime. Depois disso, as massas de todos os CP foram mensuradas até a sua estabilização. Essa massa foi denominada de  $m_1$ , pois representará a massa seca do espécime antes da ocorrência dos fenômenos de sorção e solubilidade.

Após a definição da  $m_1$ , todos os espécimes foram colocados em ependorfs identificados contendo água destilada, no volume de 2 ml para cada CP. Os ependorfs foram armazenados dentro de uma estufa a 37°C e, após uma semana, a massa de todos os espécimes foi mensurada, desta vez sendo denominada de  $m_2$ , pois representa a massa úmida do espécime após este ter sorvido água do meio em que foi armazenado.

Em seguida, os corpos de prova foram armazenados no “dessecador” com sílica e cloreto de cálcio em estufa a 37°C, a fim de adquirir uma terceira massa ( $m_3$ ). Após a estabilização desta, a  $m_3$  representa a massa final do espécime após o fenômeno de solubilidade lixiviar componentes do mesmo.

A Sorção de água (WS) e a Solubilidade (SL) foram calculadas a partir das seguintes fórmulas:  $WS = (m_2 - m_3) / V$ ;  $SL = (m_1 - m_3) / V$ , onde V representa o volume dos espécimes, que foi obtido da seguinte maneira:  $V = \pi R^2 h$ , onde  $\pi$  representa o valor constante de 3,14; R o raio do espécime; e h a altura do mesmo. O raio foi obtido através da média entre dois diâmetros perpendiculares de cada espécime; e a altura foi obtida pela média entre cinco alturas diferentes para cada um dos espécimes.

Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via seguido do teste de SNK ( $p < 0,05$ ). Para comparar os grupos experimentais contra comerciais utilizou-se o teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

### **Grau de conversão**

O grau de conversão dos cimentos foi avaliado por meio de aparelho (figura 4) espectrofotômetro infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR Shimadzu Prestige21 Spectrometer, Shimadzu, Tóquio Japão) equipado a um suporte acoplado para a fixação da unidade foto-ativadora LED (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália) ao espectrofotômetro, permitindo uma distância uniforme de 5 mm entre a extremidade da ponteira de fibra ótica e a amostra. A

irradiância foi mensurada por intermédio de radiômetro portátil (model 100, Kerr, Estados Unidos da América).

Uma pequena quantidade do material (~5 µl) foi depositada diretamente no cristal de diamante em pequenas quantidades e fotoativada por 30 segundos (n=3). Para o monitoramento de varredura foi utilizado o software IRSolution, em uma faixa espectral entre 1750 e 1550 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e velocidade de deslocamento de espelho de 2,8 mm/s.



Figura 4. Imagem do aparelho de Espectroscopia FTIR.

### 1.4.3 Ensaio Biológico

#### Ensaio de biocompatibilidade

Os materiais testados (n = 4) foram tanto os experimentais quanto os comerciais. Cada eludato dos materiais foi diluído em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), em concentrações de 0,001 a 10 mM.

#### Cultivo celular

Para os ensaios de citotoxicidade dos diferentes materiais estudados, foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos de ratos L929. Os fibroblastos de ratos de uma linhagem imortalizada L929 provenientes do Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas (NCT-BIO/FOUFPel), foram utilizados para os experimentos.

O tubo de criogenia graduado de 4,5 ml (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) contendo a linhagem celular L929 foi levado à temperatura de 37°C através da parcial imersão em banho-Maria (Biopar, Mod BM 03, Brasil) por 5 minutos e a seguir, dentro de capela de fluxo laminar vertical, o conteúdo foi adicionado a uma garrafa de cultivo celular de área de superfície 25 cm<sup>2</sup> (Techno Plastic Products), a qual tinha 5 ml de DMEM completo à temperatura de 37°C.

A garrafa de cultivo foi colocada em estufa de 5% CO<sub>2</sub> à 37°C e permaneceu por um período de 3 horas para promover a adesão celular no fundo da mesma. Após este período, o meio de cultura contendo DMSO (protetor criogênico) foi removido da garrafa com pipeta Pauster estéril acoplada à bomba a vácuo (AspiraMax Indústria de Aparelhos Médicos Ltda. Brasil). A pipeta foi apoiada no fundo da garrafa na parede oposta a área de cultivo para a sucção do meio. Por fim, novo meio de cultura (DMEM, completo) foi adicionado à linhagem celular e esta permaneceu em atmosfera úmida, à 37°C, até que se obteve a confluência de aproximadamente 70% da superfície cultivável da garrafa.

### **Contagem Celular**

Antes da realização dos experimentos de citotoxicidade, foi determinado o número de células existentes nos frascos de cultivo. A finalidade dessa contagem foi conhecer o número de células para uma divisão igualitária de células por grupo. O número de células semeadas em cada poço, para as L929, será de  $2 \times 10^4$  para a citotoxicidade.

Para a determinação do número (contagem celular), as células foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas do seu substrato utilizando 3 ml de solução de tripsina-EDTA (Gibco/Invitrogen) para as garrafas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, por 5 minutos. Para neutralizar a ação da tripsina foram adicionados no mínimo a mesma quantidade de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% antibiótico.

Após, o conteúdo total da garrafa utilizada no experimento foi removido e colocado em um Falcon de 15 ml. O volume de células foi ressuspensas com uma pipeta volumétrica de 10 ml para homogeneização das células no sobrenadante. De cada suspensão celular, 20 µl foram dispensados em um tubo de criogenia.

Uma gota dessa mistura foi colocada em um hematocítômetro (Labor Optik, Friedrichsdorf, Germany), e levado ao microscópio de fase invertido (modelo AAKER) para a realização da contagem. As células com aspecto brilhante e formato arredondado foram consideradas viáveis, enquanto as células escurecidas com formato distorcido foram consideradas mortas, não sendo contabilizadas na contagem dos 4 quadrantes das extremidades. O cálculo foi realizado com base na fórmula onde o número total de células viáveis contadas nos 4 quadrantes externos foi multiplicado por  $10^4$  (fator de correção do hematocítômetro). Esse valor foi

dividido pelo número de quadrados contados (nesse caso 4) e multiplicado pelo fator de diluição que foi a quantia do meio de cultura adicionado. A partir dessa fórmula, obtivemos a quantidade aproximada de células presentes em cada garrafa.

O número total de células (NT) presentes no frasco foi obtido através da equação abaixo, onde FD é o fator de diluição.

$$\text{NTcélis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total céls viáveis} \times \text{FD} \times 10^4}{4 \text{ (n}^\circ \text{ quadrados contados)}}$$

De acordo com a quantidade de células viáveis existentes, foi calculado o número de células necessárias para o plaqueamento celular para a realização dos ensaios de citotoxicidade.

A suspensão de células foi diluída de acordo com o número de poços usados. Na citotoxicidade, foram utilizadas placas de cultivo celular (ELISA, Techno Plastic Products) de 96 poços (96 x 200 µl). Através desta regra de três, foi obtida a quantidade da suspensão celular necessária para diluição em meio de cultivo para obtenção do volume necessário para o experimento.

### **Ensaio de viabilidade celular**

As condições de tratamento, incluindo cultura e tempo de exposições, foram baseadas nas especificações da ISO 10993:2009 (International Standards Organization).

Os eludatos dos materiais testados foram utilizados em diferentes concentrações (puro  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ), e todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar.

A suspensão das células foi plaqueada em uma concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço e distribuídas em placas de cultivo celular (ELISA, Techno Plastic Products) de 96 poços. Cada poço receberá 200µl de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% antibiótico. As placas foram incubadas à 37°C com 5% CO<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation) por 24 horas (L929) para promover a adesão celular.

Passado o tempo detalhado acima, foram retirados com 200 µl do meio de cultura de cada poço e adicionados 200 µl/poço das diferentes concentrações testadas (0,001 a 10mM) de cada material (FERNANDEZ, 2010). Nos poços

controles, foram adicionados 200 µl de DMEM com a mesma quantidade de células e seu meio de cultura, trocado após as primeiras 24 horas (L929). Poços preenchidos somente com DMEM foram usados como “brancos”.

Após 24 horas, foi realizada a remoção dos meios com os materiais-testes e adicionados 20 µl de MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo) (Sigma/Aldrich) diluídos em 180 µl de DMEM em cada poço (5 mg/ml MTT). As placas foram incubadas em ambiente sem luminosidade por 4 horas à 37°C em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation). Após este período, a solução contendo MTT diluído em DMEM foi aspirada e solubilizada com 200 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil), que foi adicionado a cada poço.

As placas foram levadas a uma mesa agitadora (Biomixer, TS-2000A UDRL Shaker) a uma velocidade de 150 rpm por 10 minutos para a solubilização dos cristais de formazan produzidos pela redução do MTT pela desidrogenase succínica da respiração celular. Subsequentemente, a absorbância foi medida usando um espectrofotômetro (Thermoplate, TP-Reader) em um comprimento de onda de 540 nm.

A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi verificada através da análise de variância de duas vias seguido do teste de SNK ( $p < 0,05$ ). E para comparar os cimentos experimentais com os comerciais foi utilizado o teste de Dunnet ( $p < 0,05$ )

#### **1.4.4 Ensaio microbiológico**

O efeito antimicrobiano dos materiais foi verificado pelo teste de contato direto modificado (TCDM) contra cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19095. As cepas armazenadas no laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas foram doações do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), coleção registrada no World Federation for Culture Collections (WFCC) sob o número WDCM-575.

### **Reativação das cepas**

As cepas armazenadas a -80 °C foram reativadas, sendo transferidos 100 µl do inóculo bacteriano para um tubo estéril contendo 9 ml de UTYB (meio ultra purificado de tryptic soy broth) + 1 ml de glicose, e incubados por 18 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Após este período, 10 µL da mistura foram transferidos para uma placa contendo ágar soja tripticaseína (TSB, Biosystems) e se realizou um *streak* do caldo no ágar. A placa foi incubada por toda a noite em estufa a 37°C e a partir do crescimento registrado na placa, foram coletadas colônias isoladas. Estas foram transferidas para um tubo estéril com 9 ml de UTYB + 1 ml de glicose (*starter*) e incubadas por 18 horas em estufa.

A suspensão microbiana foi ajustada por espectrofotometria (espectrofotômetro, Químia, Brasil), a  $1 \times 10^8$  para absorvância. Utilizar-se-á 20 µL de suspensão bacteriana em cada poço a avaliado.

### **Teste por contato direto modificado**

O teste por contato direto modificado consiste na mensuração do crescimento cinemático microbiano pelo íntimo contato entre o microrganismo testado e o material (WEISS, 1996), utilizando microplacas de cultura de células de 96 poços. Foram utilizados três corpos de prova por grupo testado.

As amostras de cada um dos materiais foram dispensadas em um poço. Foi realizado, ainda, o controle negativo (material com meio de cultura sem suspensão microbiana), e o controle positivo (suspensão microbiana com meio de cultura sem material). Os materiais foram colocados nos poços da microplaca com auxílio de uma pinça estéril e sobre o material foi inoculado 20 µl da suspensão microbiana (BHI + bactéria). Seguidamente as placas foram incubadas a 37°C durante 1 e 24 horas por placa.

Após os respectivos tempos, foram retiradas da estufa e acrescentado em cada poço 180 µl de meio de cultura TSB mais 10% de sacarose, levadas ao Shaker (Guangzhou Mekan Trading Co., Ltd., China), por 10 minutos. Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas e plaqueamento em placas petri descartáveis divididas em oito partes, contendo meio TSA. Cada parte receberá duas gotas de 20 µl de cada diluição. Foi incubado em estufa a 37°C por 24 horas. Transcorrido o

período de incubação, foram contadas as Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/ml) (ZHANG et al., 2009).

Os resultados dos cimentos experimentais foram submetidos à análise de variância em duas vias seguido do teste de Student-Newman-Keuls, logo após comparada com os cimentos comerciais por meio do método de Dunnet ( $p < 0,05$ ).



## 2 Artigo

### **Light-cured periodontal dressings containing alpha-humulene: development and properties evaluation<sup>§</sup>**

Tharsis Christini de Almeida Rossato\*, Adriana Fernandes da Silva\*, Cesar Henrique Zanchi\*, Rafael Guerra Lund\*

\*Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author: Rafael Guerra Lund, School of Dentistry, Gonçalves Chaves St.,457/503, Zip Code 96015560, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, rafael.lund@gmail.com.

Running title: Periodontal dressing with  $\alpha$ -humulene.

Key words: alpha-humulene; light-cured; exothane; cell viability; antimicrobial effect; cohesive strength; sorption and solubility; periodontal dressing, surgical dressing.

<sup>§</sup>Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Clinical Periodontology.

### **Conflict of Interest and Source of Funding**

Authors reported absence of conflicts of interest.

### **Clinical Relevance**

The light-cured periodontal dressing containing alpha-humulene provides greater cellular proliferation than conventional dressings and has similar properties to Barricaid. Application of a periodontal dressing containing alpha-humulene may help the gingival wound healing by the presence of this anti-inflammatory and antimicrobial substance.

## Abstract

**Aim:** To formulate an experimental light-cured periodontal dressing containing alpha-humulene and compare the antimicrobial, cytotoxicity and physical properties of with a commercial references (Barricaid® and Periobond®).

**Materials and methods:** Two formulations were developed: five with Ea formulation and five others with Eb formulation, containing alpha-humulene 1w%, 5w%, 10w% and 20w%. Cytotoxicity was verified by the cell viability assay using the L929 fibroblasts (24 hours) and antimicrobial assay by the modified direct contact test against *E. faecalis* and *S. aureus* (1 and 24 hours). Material characterization were performed by degree of conversion, cohesive strength, sorption and solubility.

**Results:** Periodontal dressings Ea with alpha-humulene 1w% and Eb with alpha-humulene 1w% and 5w% showed cell viability statistically similar to Barricaid®. All experimental dressings showed antimicrobial activity against both bacteria tested. Regarding the degree of conversion, solubility and sorption were no statistical difference between Eb materials and Barricaid® ( $p < 0.05$ ). In general, cohesive strength values of the materials were dependent according to the alpha-humulene amount.

**Conclusion:** Eb formulations containing alpha-humulene showed similar behavior to the commercial reference. Thus, the experimental material containing alpha-humulene demonstrates to be usable as periodontal dressing; however, more studies are needed for pre-clinical and clinical knowledge.

## INTRODUCTION

Periodontal dressings were presented by Ward in 1929 (Ward, 1929), traditionally periodontal dressings were based on zinc oxide and eugenol system, however, after several side effects of eugenol, newer cements are formulated with a new components. The function of periodontal cement is wound protection against trauma, hemorrhage, contamination, food stagnation, and consequently relieve pain and facilitate repair (Fraunhofer & Argyropoulos, 1990). In non-surgical procedures, use of periodontal dressing can be helpful in aggressive periodontitis patients (Sigusch *et al.*, 2005). Few of the existing materials for post-surgical used have these properties mentioned.

So, a new light-cured periodontal dressing was developed using a biocompatible methacrylate monomer, which have low viscosity, elastomeric characteristic, low shrinkage while at the same time demonstrating high conversion rates (Esstech, 2011). Moreover, alternative medicine was applied as an attractive alternative for the relief of post-surgery adverse effects such as inflammation, infection and pain, using the incorporation of alpha-humulene oil into new periodontal dressing compositions. This essential oil is one of the major compounds found in plants such as *Cordia verbenacea* (de Carvalho Jr *et al.*, 2004), as *Santiria trimera* (Bikanga *et al.*, 2010), as *Solanum macranthum* (Essien *et al.*, 2011), among others. Antimicrobial (Passos *et al.*, 2007), analgesic (Sertié *et al.*, 2005), and anti-inflammatory (Passos *et al.*, 2007; Quispe-condori *et al.*, 2008) therapeutic properties are attributed to alpha-humulene. One of the novelties of this oil is due to the absence of gastric inflammation that most synthetic anti-inflammatories have (Sertié *et al.*, 1991).

Hence, the aim of this study was to formulate and compare antimicrobial activity, cell viability and physical-chemical properties of a periodontal wound dressing based on photoactivated monomers containing alpha-humulene against commercial references (Barricaid® and Periobond®).

The hypothesis to be tested is that the experimental material would not present significant differences to the commercial reference (Barricaid®) for the physical properties and significant differences to the biological and microbiological properties.

## MATERIALS AND METHODS

Ten experimental composites were formulated to this study, see Table 1. All components were mixed by SpeedMixer® and ultrasonicated for 60 minutes.

As well as commercial reference was used Barricaid® (Lot 160624, SybronEndo, CA, USA) and Periobond® (Lot 132214H, Denstply, RJ, BR). The Barricaid® has a syringe system and the recommendation is to photoactivated for 30 seconds. A LED (Radii® Curing Light, SDI, Victoria, Australia) was used to photoactivate the specimens. The Periobond® has two pastes, and the recommendation is to mix these at the same length.

### *Antimicrobial Assay*

An antimicrobial assay was performed by the modified contact direct test against *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 (n = 3) and *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 (n = 3). To *E. faecalis* and *E. aureus* was cultured overnight at 37°C in tryptic soy agar (TSA) and brain heart infusion agar (BHI) plates, respectively, in an aerobic atmosphere. Strain was inoculated in tryptic soy broth (TSB) and BHI broth, and the bacterial turbidity was adjusted to an optical density of 0.5 at 600 nm to each strain. Three specimens (6 x 1 mm), from each sealers were prepared and those needed were photoactivated for 30 seconds on each side. Subsequently, 20 µL of bacterial suspension was placed above the surface of the materials that were tested. Strain suspensions (20 µL) placed in wells without specimens served as non-exposed controls (+Control, positive control). Materials incubated without bacteria served as negative controls. All samples were incubated aerobically for 1 and 24 hours at 37°C in >95% humidity; then, 180 mL of TSB or BHI broth respectively were added and gently mixed with a pipette for 1 minute. Serial dilutions were prepared in saline, plated onto TSA or BHI agar and incubated in an aerobic environment for 24 hours at 37°C. Colony forming units (CFU) were counted and CFU/mL was calculated (Zhang *et al.*, 2009).

### *Cell viability assay*

Cell viability was performed using mouse fibroblasts (L929; 20x10<sup>3</sup> well<sup>-1</sup>) according to ISO 10993 (2009). Discs of each material (n = 4) were photoactivated for 30 seconds and stored in 300 µl of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

for 24 hours. Cytotoxicity was assessed after 24 hours using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, United States of America). The formazan content of each well was computed as a percentage of the control group (untreated cells). The cytotoxic response were rated as severe (30%), moderate (30%–60%), slight (60%–90%), or noncytotoxic (>90%) (Dahl *et al.*, 2006).

### *Materials Characterization*

#### *Degree of conversion*

The carbon (C) double bond length, such as m-dash C conversion of the periodontal dressing (n = 3) was determined using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (Prestige 21 spectrometer Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipped with an attenuated total reflectance attachment incorporating a horizontal diamond crystal with a 45° mirror angle (PIKE Technologies, Madison, USA). The LED curing unit was rigidly held in position, enabling standardization of the distance between the fiber tip and the top of the sample at 5 mm. Infrared analysis was performed at a controlled room temperature of 23°C (±2°C) and 60% (±5%) relative humidity. Approximately 5 µl of each sample was dispensed directly onto the diamond crystal to evaluate the degree of conversion. The spectra of uncured and cured material were obtained after 30 seconds of photoactivation. Periodontal dressing was acquired between 1.690–1.575 cm<sup>-1</sup>, averaging 12 scans at the 4 cm<sup>-1</sup> resolution transmission mode to provide a single spectrum. Spectra of each unpolymerized periodontal dressings were also captured. Descriptive analysis was performed to evaluate the periodontal dressing polymerization (Noronha *et al.*, 2010).

#### *Cohesive Strength*

Five specimens were made with metal matrix with 1 mm<sup>2</sup> constriction and photoactivated for 30 seconds on each side. For this test, Periobond® samples were not used due to their chemical prey. After the preparation, the specimens were immersed in distilled water for 24 hours at 37°C. The samples were measured radically in the constriction in height and width and fixed in the metallic device by cyanoacrylate adhesive based (Superbond, Gel, Locitite, São Paulo, Brazil), positioning the constriction parallel to the traction loading axis. The specific metallic

device coupled in universal mechanical testing machine (DL-500, Emic, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) at a crosshead speed of 0.5 mm/min until fracture. The cohesive tensile strength value was calculated by division of rupture strength value per value of the cross sections area, determining the maximum strength (MPa) (Nayif *et al.*, 2007).

#### *Water Sorption and Solubility*

Ten disk specimens (6 x 1 mm) were prepared and photoactivated with the LED unit for 30 seconds in each side. Then, specimens were disposed in a desiccator containing freshly dried silica gel and calcium chloride and stored at 37°C for 24 hours, their thickness and diameter were randomly measured to calculate the specimen volume. Then, their weight were measured on a precision balance with 0.01 mg accuracy (AUW 220D, Shimadzu; Kyoto, Japan) until a constant mass ( $m_1$ ). This cycle was repeated until a constant mass ( $m_1$ ) was obtained. The specimens were immersed in distilled water and stored at 37°C. After 7 days, specimens were removed from water, dried, delicately, with a paper towel and weighed ( $m_2$ ). Then, dry specimens returned to desiccator at 37°C and measured the mass until its stabilization (Malacarne *et al.*, 2006).

#### *Statistical analyses*

For analyze modified contact direct test and degree conversion, statistical analyses were performed using two-way ANOVA followed by Student Newman Keuls (SNK) test. For cohesive strength, water sorption, solubility and cell viability, statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by SNK' method. Dunnet's Method was used to analyze commercial references in relation to the experimental groups. All analyses were performed using SigmaPlot 12.0® (Systat Software, Inc., Point Richmond, California, United States of America), considering  $p < 0.05$  to be statistically significant.

## RESULTS

### *Microbiological effect*

Results of modified contact direct test are described in Table 2 and Table 3. To *S. aureus* (Table 2), the Eb<sub>Hum20%</sub> (after 1 hour) and Eb<sub>Hum10%</sub> (after 24 hours) showed higher antimicrobial activity than positive control, both were significantly different than commercial references ( $p < 0.05$ ).

Additionally, to *E. faecalis* (Table 3), Ea<sub>Hum20%</sub> showed greater antimicrobial activity than others materials and no significantly different than Barricaid® and Periobond® after 1 hour. Eb<sub>Hum20%</sub> showed higher antimicrobial effect and statistically different than Barricaid® and Periobond® after 24 hour. The commercial references did not showed antimicrobial activity since they were statistical similar to the positive control ( $p < 0.05$ ).

### *Cell viability assay*

Viability data are summarized in Figure 1. The cell viability was evaluated by 24 hours. Experimental groups were statistically similar between them ( $p < 0.05$ ). About commercial references, Periobond® showed severe cytotoxicity and it was statistical difference of Eb, Eb<sub>Hum1%</sub> ( $p < 0.05$ ), while Barricaid® showed low cytotoxicity as well as statistical similarity with Ea, Eb, Ea<sub>Hum1%</sub>, Eb<sub>Hum1%</sub> and Eb<sub>Hum5%</sub> ( $p < 0.05$ ).

### *Characterization assays*

Table 4 shows the results of physical properties of periodontal dressing tested. The degree of conversion presented a statistical difference between the experimental periodontal dressing types (Ea and Eb) from the addition of 5% of alpha-humulene. Barricaid® showed no significant difference among groups with Eb regardless the percentage of humulene in the experimental periodontal dressing. For cohesive strength, there was no significant difference among Ea, Eb and Eb<sub>Hum1%</sub> ( $p < 0.05$ ), but only Ea and Eb demonstrated statistical similarity with Barricaid® ( $p < 0.05$ ). Regarding water sorption and solubility, experimental materials based on Eb formulation showed statistical similarity with Barricaid® ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Periodontal dressings should protect the surgical wound against mechanical injuries during mastication and against bacterial invasion, should be soft and should not have cytotoxic or allergic effects to the underlying tissues. It also aims to decrease pain, aid hemostasis and facilitate healing. For this, the cement must be adhered to the surface of the wound, avoiding biofilm formation. The sequelae of periodontal surgery are usually pain, edema, inflammation, and bleeding.

Alpha-humulene is a sesquiterpene and has anti-inflammatory, analgesic, and antimicrobial therapeutic activity for some bacteria or fungi. The mechanism of action of this oil is similar to the mechanism of action of diclofenac, but without the side effects. It acts by inhibiting the enzymatic activity cyclooxygenase 2 (COX-2) which is responsible for the production of prostaglandins (responsible for the inflammatory reaction and its symptoms) (Refsio *et al.*, 2005).

The experimental periodontal dressings Ea, Eb, Eb<sub>Hum1%</sub>, Eb<sub>Hum5%</sub>, had cell viability statistically similar to Barricaid. The alpha-humulene incorporated in dressings from 5 wt% in the formulation Ea and 10 wt% in the Eb formulation were severely cytotoxic and statistically similar to Periobond<sup>®</sup>, which was different from Barricaid. Legault *et al.* (2003) assessed humulene effect and suggests that humulene induced a dose and time-dependent decrease in the cellular content of glutathione and an increase in the production of reactive oxygen species, which may be implicated in humulene cytotoxicity (Zheng *et al.*, 1992). However, cytotoxicity was significantly lower against normal human fibroblasts than against the tumor cell line (Legault *et al.*, 2003).

Kozam & Mantell (1978) concluded that periodontal cements containing eugenol showed delayed healing, more allergic reaction (Barkin *et al.*, 1984) and more inhibition of fibroblast proliferation (Eber *et al.*, 1989). In our study, we followed ISO 10993 (2009) for cytotoxicity evaluation against L929 mouse fibroblast cells (Hildebrand & Derenzis, 1974), where completely light-cured Barricaid<sup>®</sup> demonstrated high cell viability after 24 hours (Figure 1). Petelin *et al.* (2004) and Alpar *et al.* (1999) also found no cytotoxic changes in fibroblasts and HeLa cells with fully cured Barricaid<sup>®</sup>.

Antimicrobial assay was tested per modified direct contact test against *E. faecalis* and *S. aureus* (Zhang *et al.*, 2009) in 1 and 24 hours. At first, to *E. faecalis*,

all experimental cements containing or not humulene showed significantly less microbial growth than positive control over time tested. After 1 hour, Ea<sub>Hum1%</sub>, Ea<sub>Hum20%</sub>, Eb<sub>Hum20%</sub> were similar to both commercial references. After 24 hours, both commercial references no demonstrated antimicrobial effect being statistically similar to the positive control. In addition, Ea, Ea<sub>Hum1%</sub>, Ea<sub>Hum5%</sub>, Ea<sub>Hum10%</sub>, Eb<sub>Hum5%</sub>, Eb<sub>Hum10%</sub> showed lower microbial growth and were statistically different than Barricaid®. *Santiria trimera* oil (humulene 34.6% composing) was evaluated by disc diffusion methods on agar and broth microdilution and leaf essential oil demonstrated less sensitive to gram-negative bacteria, but was effective against *Bacillus cereus* and *E. faecalis* (Bikanga *et al.*, 2010).

To *S. aureus*, generally, groups tested showed a reduction on microbial growth over time, except for Ea<sub>Hum1%</sub>, Ea<sub>Hum10%</sub>, Ea<sub>Hum20%</sub> and the highest antimicrobial effects were seen in the Eb formulation with humulene 10% and 20%. However, most of the experimental dressings were statistically similar to commercial references. Antimicrobial effect of *Cordia verbenacea* essential oil was evaluated by agar diffusion method and de Carvalho Jr. *et al.* (2004) observed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus* ATCC 5051), fungi (eight species of *Candida*, one of them *C. Albicans*), but against only one Gram-negative genus (*Protium mirabilis* and *P. vulgaris*).

Michellan (2009) observed that the inhibitory activity of *Cordia verbenacea* extracts against Gram-positive bacteria was significantly higher than Gram-negative; among the most important components identified in that extract one of them was alpha-humulene. Others studies have tested essential oils from plants containing alpha-humulene and concluded, in general, that volatile oils were more active against Gram-positive bacteria (Demuner *et al.*, 2011) and had antifungal activity (Su & Ho, 2016). In evaluation of healing process, periodontal dressings tested (Coe-pak, Cross-Pak, Peripac, Septo-Pak, ZOE) had no antibacterial property and ZOE had a minimal antifungal property (O'niel, 1975).

Only a limited number of studies have evaluated physical and mechanical properties of periodontal dressings. These properties is material composition depended. In order to evaluate periodontal dressing properties, there is no exact, standardized and reproducible technique to evaluate these properties (Rubinoff *et al.*, 1986). In addition, there is not enough research available for new periodontal

cements. Therefore, based on the following information, periodontal dressing must have: adequate working time for manipulation and to create a smooth surface that does not cause irritation; be flexible enough to resist distortion and displacement; be adhesive without being voluminous and must have dimensional stability to prevent contamination and accumulation of plaque (Haugen *et al.*, 1979).

When the viscosity of Coe-Pak, Peripac and Peripac Improved were tested, none of these materials exhibited ideal flow properties during manipulation and adaptation. Furthermore, these materials exhibited poor adhesive properties (Watts & Combe, 1982). Gjerdet and Haugen (1977) evaluated the dimensional changes of Coe-pak, Wondrpak and Peripac during the first minutes and showed contraction after setting time. The property tested in our study was the maximum cohesive strength under material tensile force (Nayif *et al.*, 2007). For us, the experimental dressings Ea and Eb were significantly similar to Barricaid<sup>®</sup> and the increase oil decreased the cohesive resistance strength ( $p < 0.05$ ). Periobond<sup>®</sup> was not used in this assay due to its chemical prey making it difficult to obtain the specimens. Results suggest that removal of Barricaid<sup>®</sup> form dental nests is easy to perform without injuring adjacent healing tissues.

In sequence to analyze resin-based materials used in dentistry, the reaction of the carbon-carbon double bonds (C=C) at the functional methacrylate groups of the monomers is important for the mechanical and physical properties of the resultant polymer. Among the experimental materials, there was a statistical difference in the presence or absence of plasticizers, which reduced the monomers conversion when added humulene. In addition, experimental dressings with Eb formulation even humulene presence showed highest degree of conversion and these were statistically similar to Barricaid<sup>®</sup>. However, plasticizer influenced negatively on degree of conversion in our estudy, as showed in results of Ea formulations with or without oil. Although this hypothesis was rejected by Cornelio *et al.* (2012) based on differences of degree of conversion values found to composites resin-based were mainly due to the irradiation time used to cure the samples and to the content of the monomer mixture of the composites too. Whereas, according to studies, the base monomer (exothane) of experimental dressings used has a high degree of conversion and biocompatibility. Study of Noronha *et al.* (2010) demonstrates that materials with degree of conversion above 50% were acceptable.

The water sorption and solubility phenomena may be precursors to a variety of chemical and physical processes that lead to deleterious effects on the polymer material structure and may compromise its clinical performance (Ferracane, 2006). The sorption of water dispersed in the polymer matrix acts as a plasticizer, causing polymer expansion. The amount of water absorbed thus depends on the equilibrium between the available volume of free spaces, physicochemical affinity of polymers groups to water and the polymer chains resistance to the deformation strain (Sideridou *et al.*, 2003). These factors may also influence the resistance strength values.

The sorption and solubility values of Barricaid were taken as the acceptable standard because it is a light-curing material and commercial surgical dressing. We also based on the ideal sorption and solubility values established for restorative materials from ISO 4049 (2009), less than or equal to  $40 \mu\text{g}/\text{mm}^3$  and  $7.5 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ , respectively. The water sorption of  $E_{\text{aHum}1\%}$  and  $E_{\text{aHum}5\%}$  were statistically similar to Barricaid<sup>®</sup>, and for solubility all materials with Ea formulation were statistically different to Barricaid<sup>®</sup>. However, about water sorption and solubility, all formulations with Eb showed statistically similar to Barricaid<sup>®</sup> and similar to Periobond<sup>®</sup> only to solubility ( $p < 0.05$ ). According to these results, just Eb materials with or without oil are in an acceptable standard.

Regarding the properties evaluated, we concluded that the Eb formulation presented better laboratory performance, among these experimental dressings with alpha-humulene were more favorable to the clinical use  $E_{\text{bHum}1\%}$  and  $E_{\text{bHum}5\%}$ , because its biocompatibility and cohesive strength. These experimental dressings are easily clinically usable due to the differential in viscosity, working time and setting time. In addition, further assay should be performed to evaluate physical-mechanical properties such as dimensional alteration, adhesion in dental structures, adhesion in soft tissues, alpha-humulene liberation from the resinous material and to evaluate anti-inflammatory property by *in vitro* or *in vivo* assays.

## REFERENCES

- Alpar, B., Gunay, H., Geurtsen, W., Leyhausen, G. (1999). Cytocompatibility of periodontal dressing materials in fibroblast and primary human osteoblast-like cultures. *Clinical Oral Investigations*, 3, 41-48. doi:[10.1007/s007840050077](https://doi.org/10.1007/s007840050077)
- Barkin, M. E., Boyd, J. P., Cohen, S. (1984). Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 57, 441-442. doi:[10.1016/0030-4220\(84\)90166-X](https://doi.org/10.1016/0030-4220(84)90166-X)
- Bikanga, R., Makani, T., Agnani, H., Obame, I. C., Abdoul, I. F. M., Lebibi, J., Menut, C. (2010). Chemical composition and biological activities of *Santiria trimera* (Burseraceae) essential oils from Gabon. *Natural Product Communications*, 5, 961-964. doi:[10.1080/10412905.2013.840809](https://doi.org/10.1080/10412905.2013.840809)
- Cornelio, R. B., Kopperud, H. M., Haasum, J., Gedde, U. W., Örtengren, U. (2012). Influence of different mould materials on the degree of conversion of dental composite resins. *Brazilian Journal Oral Science*, 11, 469-474. doi:[10.1590/S1677-32252012000400008](https://doi.org/10.1590/S1677-32252012000400008)
- Dahl, J. E., Frangou-Polyzois, M. J., Polyzois, G. L. (2006) *In vitro* biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*, 23, 17-22. doi:[10.1111/j.1741-2358.2006.00103.x](https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2006.00103.x)
- de Carvalho Jr, P. M., Rodrigues, R. F., Sawaya, A. C., Marques, M. O. , Shimizu, M. T. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 297–301. doi:[10.1016/j.jep.2004.07.028](https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.07.028)
- Demuner, A. J., Barbosa, I. C., Magalhaes, C. G., da Silva, C. J., Maltha, C. R., Pinheiro A. L. (2011). Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. *Molecules*, 16, 1181-1191. doi:[10.3390/molecules16021181](https://doi.org/10.3390/molecules16021181)
- Eber, R. M., Shuler, C. F., Buchanan, W., Beck, F. M., Horton, J. E. (1989) Effect of periodontal dressings on human gingiva fibroblasts *in vitro*. *Journal of Periodontology*, 60, 429-434. doi:[10.1902/jop.1989.60.8.429](https://doi.org/10.1902/jop.1989.60.8.429)
- Essien, E. E., Ogunwande, I. A., Setzer, W. N., Ekundayo, O. (2011). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxicity studies on *S. erianthum* and *S. macranthum* essential oils. *Pharmaceutical Biology*, 50, 474-480. doi:[10.3109/13880209.2011.614623](https://doi.org/10.3109/13880209.2011.614623)
- Esstech, inc. Available em: <<http://www.esstechinc.com>> accessed augusts 15, 2017.
- Ferracane, J. L. (2006). Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials*, 22, 211-222. doi:[10.1016/j.dental.2005.05.005](https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.05.005)
- Fraunhofer, J. A., Argyropoulos, D. C. (1990). Properties of periodontal dressings. *Dental Materials*, 6, 51–55. doi:[10.1016/0109-5641\(90\)90045-G](https://doi.org/10.1016/0109-5641(90)90045-G)

- Gjerdet, N. R., Haugen, E. (1977). Dimensional changes of periodontal dressings. *Journal of Dental Research*, 56, 1507-1510. doi:[10.1177/00220345770560121701](https://doi.org/10.1177/00220345770560121701)
- Haugen, E., Espevik, S., Mjör, I. A. (1979). Methods for evaluation of working and setting times of periodontal dressings. *Acta Odontologica Scandinavica*, 37, 309-315. doi:[10.3109/00016357909004701](https://doi.org/10.3109/00016357909004701)
- Hildebrand, C. N., Derenzis, F. A. (1974). Effect of periodontal dressings on fibroblasts *in vitro*. *Journal of Periodontal Research*, 9, 114-120. doi:[10.1111/j.1600-0765.1974.tb00662.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1974.tb00662.x)
- ISO 4049. (2009). Polymer-based restorative materials. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switz.
- ISO 10993-1. (2009). Biological evaluation of medical devices. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switz.
- Kozam, G., Mantell, G. M. (1978). The effect of eugenol on oral mucous membranes. *Journal of Dental Research*, 57, 954-957. doi:[10.1177/00220345780570110901](https://doi.org/10.1177/00220345780570110901)
- Legault, J., Dhal W., Debiton E., Pichette, A., Madelmont J. C. (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*, 69, 402-407. doi:[10.1055/s-2003-39695](https://doi.org/10.1055/s-2003-39695)
- Malacarne J., Carvalho R. M., de Goes, M. F., Svizero, N., Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C. K., Carrilho, M. R. (2006). Water sorption/ solubility of dental adhesives resins. *Dental Materials*, 22, 973-980. doi:[10.1016/j.dental.2005.11.020](https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.11.020)
- Michielin, E. M., Salvador, A. A., Riehl, C. A., Smânia, A. Jr., Smânia E. F., Ferreira, S. R. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresource Technology*, 100, 6615-6623. doi:[10.1016/j.biortech.2009.07.061](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.061)
- Nayif, M. M., Nakajima, M., Foxton, R. M., Tagami, J. (2007). Effect of light irradiation time on the mechanical properties of two flowable composites with different initiation systems in bonded and unbonded cavities. *Dental Materials Journal*, 26, 687-693.
- Noronha Filho, J. D., Brandão, N. L., Poskus, L.T., Guimarães, J. G., Silva, E. M. (2010). A critical analysis of the degree of conversion of resin-based luting cements. *Journal of Applied Oral Science: revista FOB*, 18, 442-446. doi:[10.1590/S1678-77572010000500003](https://doi.org/10.1590/S1678-77572010000500003)
- O'neil, T. C. (1975). Antibacterial properties of periodontal dressings. *Journal of Periodontology*, 46, 469. doi:[10.1902/jop.1975.46.8.469](https://doi.org/10.1902/jop.1975.46.8.469)
- Passos, G. F., Fernandes, E. S., Cunha, F. M., Ferreira, J., Pianowski, L. F., Campos, M. M., Calixto, J. B. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 323-333. doi:[10.1016/j.jep.2006.09.032](https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032)

- Petelin, M., Pavlica, Z., Batista, U., Stiblar-Martincic, D., Skaleric, U. (2004). Effects of periodontal dressings on fibroblasts and gingival wound healing in dogs. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52, 33-46. doi:[10.1556/AVet.52.2004.1.4](https://doi.org/10.1556/AVet.52.2004.1.4)
- Quispe-Condori, S., Foglio, M. A., Rosa, P. T. V., Meireles, M. A. A. (2008). Obtaining caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46, 27-32. doi:[10.1016/j.supflu.2008.02.015](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.02.015)
- Refsio, C., Brandão, D. C., Brandão, G. C., Korukian, M., Garcia, R. J., Bonfiglioli, R., Nery, C. A. S., Gamba, R. (2005). Clinical assessment of efficacy and safety from *Cordia verbenacea* standardized extract in tendinitis and chronic facial pain patients. *Revista Brasileira de Medicina*, 62, 40-46.
- Rubinoff, C. H., Greener, E. H., Robinson, P. J. (1986). Physical properties of periodontal dressing materials. *Journal of Oral Rehabilitation*, 13, 575-586. doi:[10.1111/j.1365-2842.1986.tb00681.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1986.tb00681.x)
- Sertié, J. A. A., Basile, A. C., Panazzi, S., Oshiro, T. T., Azzolini, C. P., Penna, S. C. (1991). Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: oral and topical anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 239-247. doi:[10.1016/0378-8741\(91\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90008-2)
- Sertié, J. A. A., Woisky, R. G., Wiezel, G., Rodrigues, M. (2005). Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 12, 338-344. doi:[10.1016/j.phymed.2003.09.013](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.013)
- Sideridou, I., Tserki, V., Papanastasiou, G. (2003). Study of water sorption, Solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*, 24, 655-665. doi:[10.1016/S0142-9612\(02\)00380-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00380-0)
- Sigusch, B. W., Pfitzner, A., Nietzsche, T., Glockmann, E. (2005). Periodontal dressing (Vocopac) influences outcomes in a two-step treatment procedure. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 401-405. doi:[10.1111/j.1600-051X.2005.00686.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00686.x)
- Su, Y. C., Ho, C. L. (2016). Composition of the Leaf essential Oil of *Phoebe formosana* from Taiwan and its *in vitro* Cytotoxic, Antibacterial, and Antifungal activities. *Natural Product Communications*, 11, 845-848.
- Ward, A. W. (1929). Postoperative care in the treatment of Pyorrhea. *Journal of American Dental Association*, 16, 635-640. doi:[10.14219/jada.archive.1929.0083](https://doi.org/10.14219/jada.archive.1929.0083)
- Watts, T. L., Combe, E. C. (1982). Rheological aspects of non-eugenol periodontal dressing materials. *Journal of Oral Rehabilitation*, 9, 291-300. doi:[10.1111/j.1365-2842.1982.tb01018.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1982.tb01018.x)

Zhang, H., Shen, Y., Ruse, N. D., Haapasalo, M. (2009). Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, 35, 1051-1055. doi:[10.1016/j.joen.2009.04.022](https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.022)

Zheng, G. Q., Kenney, P. M., Lam, L. K. (1992). Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of natural Products*, 55, 999-1003. doi:[10.1021/np50085a029](https://doi.org/10.1021/np50085a029)

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Cell viability (%) of periodontal dressings tested against L929 rat cells. Lowercase letters represent statistical difference between groups. †Statistically different from Barricaid®; ● Statistically different from Periobond®. One-way ANOVA followed by SNK' test to compare experimental dressings and Dunnet's test to compare against commercial references ( $p < 0.05$ ).

## TABLES

Table 1. Design of experimental dressings and their composition by weight.

<b>Group</b>	<b>Composition (wt%)</b>
<b>Ea</b>	EXO (60); PPGM (25); DDM (15); CQ (0.4); EDAB (0.8); DHEPT (1); Silica (15).
<b>Ea<sub>Hum1%</sub></b>	Ea (100); Hum (1).
<b>Ea<sub>Hum5%</sub></b>	Ea (100); Hum (5).
<b>Ea<sub>Hum10%</sub></b>	Ea (100); Hum (10).
<b>Ea<sub>Hum20%</sub></b>	Ea (100); Hum (20).
<b>Eb</b>	EXO (100); CQ (0.4); EDAB (0.8); DHEPT (1); Silica (15).
<b>Eb<sub>Hum1%</sub></b>	Eb (100); Hum (1).
<b>Eb<sub>Hum5%</sub></b>	Eb (100); Hum (5).
<b>Eb<sub>Hum10%</sub></b>	Eb (100); Hum (10).
<b>Eb<sub>Hum20%</sub></b>	Eb (100); Hum (20).

Exothane 32 (EXO), Polypropylene glycol monomethacrylate (PPGM), Dodecanodiol dimethacrylate (DDM), Camphorquinone (CQ), N,N-Dihydroxyethyl-p-Toluidine (DHEPT), by Esstech Inc, Essington, Pennsylvania, USA. Ethyl 4-dimethyl-aminebenzoate (EDAB, Fluka, Wisconsin, USA); Silica (7nm, Aerosil 380, Degussa, GER);  $\alpha$ -humulene (Hum, Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Table 2. Modified direct contact test against *S. aureus* at 1 and 24 hours. Median (Standard Deviation) values.

Groups	<i>S. aureus</i> (CFU/ml)	
	1h	24h
<b>Ea</b>	A 7.1 (0.1) d <sup>•</sup>	B 5,5 (0,1) g <sup>•†</sup>
<b>EaHum1%</b>	A 7.1 (0.1) d <sup>•</sup>	A 7.1 (0.2) c
<b>EaHum5%</b>	A 7.1 (0.1) d <sup>•</sup>	B 6.1 (0.9) f <sup>•</sup>
<b>EaHum10%</b>	A 7.3 (0.3) c	A 7.3 (0.4) b
<b>EaHum20%</b>	A 6.8 (0.3) e <sup>•</sup>	A 6.6 (0.5) d
<b>Eb</b>	A 7.5 (0.2) b	B 5.9 (0.3) f <sup>•</sup>
<b>EbHum1%</b>	A 7.3 (0.04) c	B 5.9 (0.1) f <sup>•</sup>
<b>EbHum5%</b>	A 7.7 (0.3) a	B 6.3 (0.2) d
<b>EbHum10%</b>	A 7.0 (0.1) e <sup>•</sup>	B 4.7 (0.1) h <sup>•†</sup>
<b>EbHum20%</b>	A 6.7 (0.1) f <sup>•†</sup>	B 6.2 (0.1) e <sup>•</sup>
<b>+Control</b>	A 7.8 (0.1) a <sup>†</sup>	A 7.9 (0.2) a
<b>Periobond<sup>®</sup></b>	A 8.1 (0.3) <sup>†</sup>	B 7.2 (0.4)
<b>Barricaid<sup>®</sup></b>	A 7.2 (0.2) <sup>•</sup>	B 6.8 (0.3)

Capital letters represent statistical differences in a group at different times. Lowercase letters represent statistical differences between groups at the same time. †Statistically different from Barricaid<sup>®</sup>. •Statistically different from Periobond<sup>®</sup>. Two-way ANOVA followed by SNK'test (p < 0.05).

Table 3. Modified direct contact test against *E. faecalis* at 1 and 24 hours. Median (Standard Deviation) values.

Groups	<i>E. faecalis</i> (CFU/ml)	
	1h	24h
<b>Ea</b>	B 5.8 (0.1) b•†	A 6.5 (0.4) e•†
<b>EaHum1%</b>	B 5.8 (0.1) e•	A 6.6 (0.3) e•†
<b>EaHum5%</b>	B 5.7 (0.04) e	A 6.2 (0.3) e•†
<b>EaHum10%</b>	B 5.8 (0.1) d•†	A 6.4 (0.4) e†
<b>EaHum20%</b>	B 5.6 (0.1) f	A 7.0 (0.2) d
<b>Eb</b>	B 5.9 (0.1) c•†	A 7.4 (0.2) b
<b>EbHum1%</b>	B 5.9 (0.1) b•†	A 7.2 (0.2) c
<b>EbHum5%</b>	B 6.0 (0.1) c•†	A 6.9 (0.2) d†
<b>EbHum10%</b>	B 5.8 (0.2) b•†	A 6.6 (0.5) e†
<b>EbHum20%</b>	B 5.7 (0.1) e	A 6.3 (0.2) f•†
<b>+Control</b>	B 6.3 (0.1) a•†	A 7.8 (0.1) a
<b>Periobond®</b>	B 5.1 (0,1)	A 7.2 (0.1)
<b>Barricaid®</b>	B 4.8 (0.5)	A 7.4 (0.3)

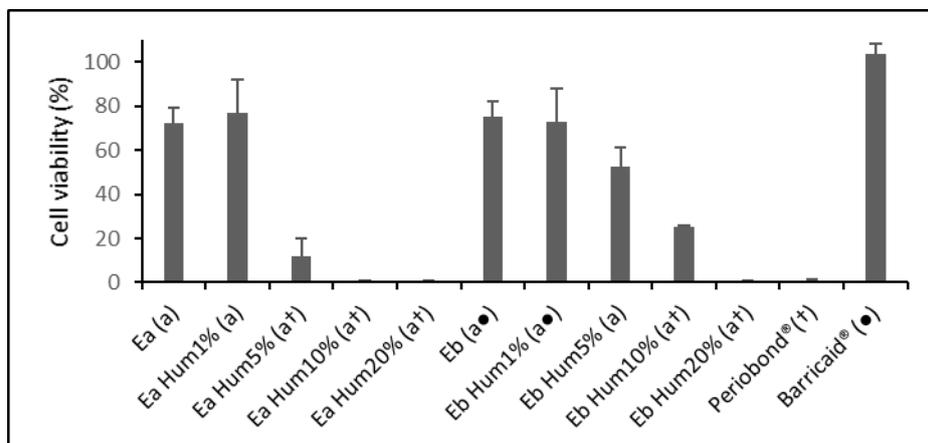
Capital letters represent statistical differences in a group at different times. Lowercase letters represent statistical differences between groups at the same time. †Statistically different from Barricaid®. •Statistically different from Periobond®. Two-way ANOVA followed by SNK'test ( $p < 0.05$ ).

Table 4. Degree of Conversion (DC), Cohesive Strength (CS), Water Sorption (WS) e Solubility (SL) of Periodontal Dressing tested. Mean (Standard Deviation) values.

<b>Groups</b>	<b>DC*</b> (%)	<b>CS**</b> (MPa)	<b>WS**</b> ( $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ )	<b>SL**</b> ( $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ )
<b>Ea</b>	52 (2) Ba <sup>†</sup>	2.7 (0.3) a	61.4 (29.9) c <sup>•†</sup>	56.6 (31.7) b <sup>†</sup>
<b>Ea Hum1%</b>	52 (2) Ba <sup>†</sup>	2.1(0.4) b <sup>†</sup>	63.4 (7.3)c <sup>•</sup>	59.3 (5.3) b <sup>†</sup>
<b>Ea Hum5%</b>	46 (2) Bb <sup>†</sup>	1.8 (0.2) c <sup>†</sup>	78.2 (57.9)c	105.0 (14.2) a <sup>•†</sup>
<b>Ea Hum10%</b>	40 (2) Bc <sup>†</sup>	1.2 (0.2) d <sup>†</sup>	153.5 (112.8)a <sup>†</sup>	108.9 (15.1) a <sup>•†</sup>
<b>Ea Hum20%</b>	36 (2) Bc <sup>†</sup>	0.5 (0.2) e <sup>†</sup>	100.6 (32.7)b <sup>†</sup>	133.8 (47.0) a <sup>•†</sup>
<b>Eb</b>	94 (2) Aa	2.6 (0.3) a	47.8 (8.5)d <sup>•</sup>	1.4 (4.0) f
<b>Eb Hum1%</b>	96 (1) Aa	2.5 (0.4) a <sup>†</sup>	51.3 (6.5)d <sup>•</sup>	4.2 (5.3) f
<b>Eb Hum5%</b>	95 (2) Aa	1.7 (0.2) c <sup>†</sup>	66.3 (8.7)c	13.4 (5.7) e
<b>Eb Hum10%</b>	96 (2) Aa	1.5 (0.3) c <sup>†</sup>	64.2 (6.2)c <sup>•</sup>	24.3 (22.5) c
<b>Eb Hum20%</b>	96 (4) Aa	0.6 (0.1) e <sup>†</sup>	46.9 (8.1)d <sup>•</sup>	20.7 (7.7) d
<b>Barricaid®</b>	95 (4)	3 (0.5)	51.4 (14.4) <sup>•</sup>	3.5 (7.3)
<b>Periobond®</b>	-	-	110.3 (22.0) <sup>†</sup>	7.6 (214.8)

Ea, formulations A of the experimental dressing; EaHum1% - 20%, refers to experimental dressings A containing respectively alpha-humulic 1%, 5%, 10% and 20%. Eb, formulations B of the experimental dressing; EbHum1% - 20%, refers to experimental dressings B containing respectively alpha-humulic 1%, 5%, 10% and 20%. Capital letters represent statistical differences between different formulations (Ea and Eb) to the same oil concentrations. Lowercase letters represent statistical difference between groups tested. <sup>†</sup>Statistically different from Barricaid®; <sup>•</sup>Statistically different from Periobond®. \*Two-way ANOVA and \*\*One-way ANOVA followed by SNK' test; Dunnett's test compared the commercial references (p < 0.05).

## FIGURES



### **3 Carta Patente**

#### **Composição fotopolimerizável de característica elastomérica, baixa contração, biocompatível contendo fitomedicamento para uso odontológico**

Tharsis Christini de Almeida Rossato\*, Adriana Fernandes da Silva\*, Cesar Henrique Zanchi\*, Rafael Guerra Lund\*

\*Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Inventor correspondente: Rafael Guerra Lund, Faculdade de Odontologia, Rua Gonçalves Chaves nº 457, sala 503, CEP 96015560, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, rafael.lund@gmail.com.

§Patente formatada segundo as normas do Intituto Nacional de Propriedade Intelectual.

## Resumo

Patente de Invenção: **“COMPOSIÇÃO FOTOPOLIMERIZÁVEL DE CARACTERÍSTICA ELASTOMÉRICA, BAIXA CONTRAÇÃO, BIOCOMPATÍVEL CONTENDO FITOMEDICAMENTO PARA USO ODONTOLÓGICO”**

As composições odontológicas da presente invenção são indicadas para aplicação como material temporário pós-cirúrgico, em tratamentos não cirúrgicos periodontais, para auxílio na manutenção da homeostasia, também como material restaurador temporário. Preferencialmente, o material é apresentado na forma de pasta única, apresenta consistência menos viscosa e menos pegajosa, proporcionando ao profissional melhor adaptação do material. Suas composições baseiam-se em monômeros biocompatíveis e de comportamento elastomérico. Para dar início a cura do material é necessária uma unidade fotoativadora. Após fotoativado, o material apresenta baixo módulo de elasticidade, sendo, portanto, suficientemente flexível, proporcionando conforto ao paciente. Corroborando com o diferencial da invenção, a partir da utilização da medicina alternativa como atrativo para a abordagem do tratamento da inflamação, infecção e da dor foi introduzido na pasta resinosa o extrato oleoso (fitomedicamento, alfa-humuleno). Nas composições odontológicas têm-se a presença fundamentalmente da substância resinosa e a substância oleosa, corroborando para o efeito antimicrobiano, analgésico e atribuindo capacidade antiinflamatória, antialérgica e antitumoral. Essa substância irá auxiliar no controle da infecção, inflamação e edema que em geral são sequelas de uma cirurgia em tecido mole ou dental.

## **“COMPOSIÇÃO FOTOPOLIMERIZÁVEL DE CARACTERÍSTICA ELASTOMÉRICA, BAIXA CONTRAÇÃO, BIOCAMPATÍVEL CONTENDO FITOMEDICAMENTO PARA USO ODONTOLÓGICO”**

### CAMPO DA INVENÇÃO:

A presente invenção refere-se a composições fotopolimerizáveis, úteis em aplicações odontológicas, e mais particularmente a composições odontológicas para aplicação em feridas cirúrgicas, afim de proteger, auxiliar no conforto e cicatrização desta, também é utilizável em restaurações temporárias e para tratamento periodontal não cirúrgico. Além disso, refere-se também a essas composições a adição de um extrato natural que agrega ação antiinflamatória, antimicrobiana e analgésica, tendo propriedade antialérgica, gosto e odor agradáveis.

O material apresenta-se em forma de única pasta, em seringa opaca, protegido de luz, onde será aplicada a partir da própria seringa ou com auxílio de uma espátula para material resinoso diretamente no local e arredores da ferida cirúrgica, tendo contato com dentes para auxiliar na retenção do material e em seguida fotopolimerizada.

Em particular, a presente invenção refere-se a composições com características mais biocompatíveis, formulações diferenciadas (baseadas em novos monômeros disponíveis no mercado), e de aplicação temporária, capaz de prover adequada resistência física e bioatividade em relação ao tecido ou mucosa em contato. A presente invenção refere-se ao uso de monômeros metacrilatos de cadeia longa e flexível, monômeros metacrilatos anfífilicos, monômeros biocompatíveis e elastoméricos que auxiliam na adaptação e flexibilidade do material, além do sistema de polimerização fotoativada.

Corroborando com diferencial da invenção, a partir da utilização da medicina alternativa como atrativo para a abordagem do tratamento da inflamação, infecção e da dor foi introduzido na pasta resinosa o extrato natural com diversas fontes disponíveis no Brasil que possui as capacidades antimicrobiana e antiinflamatória comprovada por diversos estudos no Brasil. A presente invenção refere-se também ao uso do sesquiterpeno alfa-humuleno incorporado na composição de materiais fotopolimerizáveis, membranas reabsorvíveis, material de recobrimento e soluções odontológicas.

## **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO:**

### **Do tratamento cirúrgico**

O cimento cirúrgico tem como recomendações ser colocado sobre a gengiva imediatamente após uma cirurgia odontológica. É empregado para imobilizar o tecido, mantendo os retalhos gengivais em posição após a sutura; na imobilização do enxerto gengival dissipando a tração da mucosa vestibular e do lábio; para diminuir infecção da área operada devido a barreira física; na proteção da ferida do trauma superficial mastigatório e da ação irritante dos alimentos contribuindo para a manutenção do conforto do paciente e alívio da dor; e também é empregado na prevenção da hemorragia pela pressão exercida por meio do cimento, favorecendo indiretamente a hemostasia. Entretanto, a infiltração na interface cimento/tecido pode resultar em acúmulo de placa e retardo na cura. Em cirurgias como exodontia, retirada de toros palatino, e outras, o cimento é aplicado como agente controlador de edema, protetor superficial, conforto e controlador de hemorragia.

### **Do tratamento periodontal**

Durante o tratamento periodontal o cimento é utilizado também como suporte para imobilização temporária dos dentes.

### **Do tratamento restaurador temporário**

Para a confecção de restaurações indiretas ou devido ao tempo clínico é importante que o dente preparado para receber a restauração seja protegido até elaboração da restauração definitiva. Uma das formas de fornecer um revestimento para proteção dental, é a utilização de cimentos em pequenas cavidades até materiais capazes de recobri-lo totalmente. Por isso, estabelecem-se alguns requisitos básicos do material provisório, como: fácil manipulação e inserção na cavidade dental, tempo de presa rápido, não sofrer solubilidade e nem se desintegrar no meio bucal, não sofrer alteração dimensional e promover selamento marginal. As restaurações provisórias também devem atender aos seguintes critérios: proteção pulpar, resistência ao desgaste, lisura superficial, margens bem delimitadas, retenção e estética.

### **Das complicações hemorrágicas**

Em pacientes com coagulopatias, existem diversos métodos auxiliares na hemostasia da cavidade bucal como ácido tricloroacético 10%, antifibrinolíticos, gelo, selante de fibrina e o cimento cirúrgico. Os procedimentos cirúrgicos e tratamentos periodontais em pacientes portadores de coagulopatias devem ser considerados como procedimentos com elevado risco de sangramento. Portanto, o preparo prévio do paciente é necessário, com indicação da reposição dos fatores de coagulação e da associação dos antifibrinolíticos. Nesses casos, a utilização de meios hemostáticos locais, como cimento cirúrgico, deve ser indicada para a proteção da região. Em casos de sangramento pós-operatório, as primeiras medidas são a limpeza, identificação da área sangrante e remoção do coágulo formado. Além disso algumas medidas podem ser adotadas, como aplicação de meios hemostáticos (antifibrinolíticos), remoção de sutura com curetagem alveolar e posterior sutura, proteção da região com cimento cirúrgico, utilização de gelo no local, sempre informando e consultando o hematologista.

### **Das exodontias e processos inflamatórios alvéolo dentários**

O uso do cimento é indicado também quando o fechamento da ferida é inadequado e existem exposições de tecido conjuntivo ou ósseo, pois nestes casos, a cobertura da área é vantajosa. Existe uma complicação chamada alveolite, uma das mais comuns após exodontia. A alveolite se estabelece durante o processo de reparo alveolar onde pós a cirurgia ocorreu uma degradação do coágulo sanguíneo, não demonstra manifestação radiográfica, mas em alguns casos pode haver áreas de sequestros ósseos. Dentre as principais causas podemos destacar o suprimento sanguíneo insuficiente do alvéolo; infecção prévia à extração; traumatismo do osso alveolar; tabagismo; aumento da atividade fibrinolítica; utilização de contraceptivos.

A alveolite pode ser classificada em seca e úmida. Na alveolite úmida ocorre a desintegração do coágulo sanguíneo entre o segundo e terceiro dia pós cirúrgico. É caracterizada pela dor intensa, pulsátil, irradiada, sem resposta a terapia medicamentosa, gosto e odor intrabucal desagradáveis, sinais e sintomas usuais de infecção. O coágulo presente apresenta a cor castanho-escuro ou um tecido de granulação infectado. Na alveolite seca, o alvéolo apresenta-se vazio devido à

ausência de formação ou perda do coágulo, com exposição das superfícies ósseas, áreas com necrose e falta de recobrimento epitelial.

### **Dos cimentos cirúrgicos no mercado**

Os requisitos ideais de uma barreira pós-cirúrgica são os seguintes: facilidade de manipulação e inserção; apresentar boa adaptação ao tecido; resistir aos traumas superficiais; ser confortável e estético, sendo esta uma qualidade cada vez mais buscada e valorizada nos dias atuais; promover hemostasia; ser bacteriostático ou bactericida; ter uma ação analgésica; não induzir reações alérgicas; não provocar irritação dos tecidos vizinhos; não apresentar odor ou gosto desagradável. Além disso, o tempo de presa ideal deve ser compatível com o tempo necessário que seja perfeitamente moldado sobre a ferida cirúrgica e as áreas interdentais. Ademais, sua superfície deve ser lisa permitindo uma fácil higienização.

#### *Cimento cirúrgico contendo óxido de zinco e eugenol*

Produtos com eugenol podem causar reações alérgicas em pessoas suscetíveis e causar irritação à pele, mucosa bucal e olhos. O cimento Odahcam (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) é indicado para cirurgias periodontais, osseas e mucogengivais ou em vestibuloplastia. É apresentado em forma de 50g de pó (óxido de zinco, acetato de zinco, ácido tânico ao éter e celulose) e frasco com 20 ml (eugenol, óleo de oliva e corante). O modo de uso é a mistura numa proporção que obtenha-se uma consistência semelhante a massa de vidraceiro. É necessário isolar as mãos e dedos com o pó do cimento fazendo um rolete no tamanho suficiente para recobrimento da área operada até a superfícies dos dentes onde ficará aderido.

O Cimento cirúrgico TechNew (Technew, Rio de Janeiro, Brasil), indicado como revestimento periodontal para proteção das suturas oriundas de cirurgias periodontais. O cimento é produzido por mistura do pó (acetato de zinco, ácido tânico, breu, óxido de zinco e celulose) e líquido (eugenol, óleo de oliva e corante vermelho DC Red 17) até obter consistência de massa de vidraceiro. Por conter eugenol pode causar reação alérgica. Recomenda o paciente comer do lado oposto a cirurgia e fazer uso de enxaguatórios que manterão a área mais limpa.

O cimento cirúrgico Lysandra é destinado a proteger áreas operadas em cirurgias bucais. O kit é composto por dois frascos, sendo um em pó (50 g), à base de óxido de zinco, e outro líquido (20 ml), à base de eugenol.

*Cimento cirúrgico contendo óxido de zinco sem eugenol*

A base para o Coe-Pak (De Trey/Denstply, Konstanz, Alemanha) é reação entre óxido metálico e ácidos graxos, apresenta-se em forma de duas pastas.

Peripac (GC America Inc., Chicago, Estados Unidos), apresenta-se em forma de uma pasta, composta por sulfato de cálcio, sulfato de zinco, óxido de zinco, polimetilmetacrilato, dimetoxitetra-etilenoglicol, ácido ascórbico, pigmento de óxido de ferro e aroma. A cura deste material começa quando em contato com a água e após 20 minutos é finalizada. Sua aplicação não pode exceder 2-3 minutos e o material mantém-se por 8-10 dias. Indicado para adicionar-se medicação em pó, liofilizada, atuando em tecidos necróticos.

Vocopac (Voco, Cuxhaven, Alemanha) é fornecido na forma de duas pastas, base e catalizador, com cura química. Material permanece elástico em boca sem se quebradiço. Vocopac contém colofônio purificado, óxido de zinco, acetato de zinco, óxido de magnésio, ácidos graxos, resina natural, óleos naturais e corante e127, sendo contraindicado em pacientes alérgicos aos ingredientes e o contato com o osso deve ser evitado. Pode ocorrer descoloramento.

SeptoPack (Sepdont, saint-maur-des-fosses, cedex, France), é fornecido em frasco de 60g contendo acetato de amilo, ftalato de dibutilo, polimetacrilato de metilo, óxido de zinco e sulfato de zinco. Seu tempo de trabalho deve ser de 2-3 minutos, e o tempo de presa é em torno de 30 min. Devido ao ftalato de dibutilo ser tóxico, pode danificar os olhos do feto e há risco de prejudicar a fertilidade. Logo é mister o uso de equipamentos de segurança para sua manipulação.

Periocarea (Voco, Cuxhaven, Alemanha) é fornecido em dois tubos (pasta e gel). Quantidades iguais devem ser misturadas até que a cor esteja uniforme. O tempo de presa é de 45-60 segundos e o tempo de trabalho é de 4-5 minutos.

O Cimento cirúrgico Perio Bond (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil), apresenta-se em forma de pasta base (90 g, ácidos graxos, resina sintética, hidrocarboneto saturado, timol, cera natural e essência de menta) e pasta aceleradora (90g, óleo natural, óxido de zinco, hidrocarboneto saturado, timol,

pigmento, óxido de magnésio, BHT e essência de menta). É indicado para uso em cirurgias periodontais, permitindo seu uso em áreas mais sensíveis da mucosa por não ter eugenol. Possui sabor e aroma agradáveis. Contém Timol, que causar reações advesas em pessoas susceptíveis. Se existir alergia a óleos essenciais fenólicos, descontinuar o uso. Modo de usar é dispensar comprimentos iguais das pastas base e acelerador, misturar com uma espátula por 30 a 45 segundos, até obter pasta de coloração rósea uniforme. Pode-se adicionar óxido de zinco para uma massa mais consistente. Após a mistura das pastas aguardar 2-3 minutos e confeccionar um rolete com a massa. Para evitar aderência nos dedos, lubrificá-los com vaselina líquida.

Pericem (Technew, Rio de Janeiro, Brasil) possui mesma indicação do anterior. Sua composição é bem semelhante ao Perio bond, pasta base (ácidos graxos, resina natural, resina sintética, óleo mineral, timol, cera natural e aroma de menta) e pasta aceleradora (óleo mineral, óleo vegetal, óxido de zinco, óxido de magnésio, pigmento de óxido de ferro, timol, BHT e aroma de menta). Não utilizar em pessoas alérgicas ao timol. Dispensar comprimentos iguais das duas pastas, misturar por 30-35 segundos, podendo adicionar óxido de zinco para massa mais consistente, aguardar 2-3 minutos e confeccionar um rolete com a massa. Para evitar a aderência da massa, lubrificar os dedos com vaselina líquida.

#### *Cimentos sem óxido de zinco sem eugenol*

Reso-pac (Hager & Werken Gm bH & Co. KG, Post fach, Alemanha) é disponibilizado como uma pasta hidrofílica, não necessita de mistura e permanece no local por até 30 horas, até mesmo em feridas com sangramento. Reso-pac incha até adquirir consistência de gel em até 3 minutos.

Mucotect (Hager & Werken Gm bH & Co. KG, Alemanha) possui um tubo com carboximetil cellulose, acetato de polivinilo, álcool etílico, vaselina e resina de óxido de polietileno. Mucotect é uma pasta hidrofílica que adere por mais de 30 horas em até mesmo áreas úmidas ou com sangramento.

#### *Cimento Fotopolimerizável*

No mercado internacional Barricaid (Pupdent, watertown, Estados Unidos) é conhecido como um compósito fotopolimerizável de baixa viscosidade e

pegajosidade, de composição básica de resina de dimetacrilato poliéter uretana, sílica silanizada como carga inorgânica, fotoiniciador, aceleradores de polimerização, estabilizante e corante. Esse material se apresenta em forma de seringa opaca para aplicação direta, podendo ser aplicado indiretamente. Uma unidade de fotopolimerização é necessária para a presa desse material. Esse produto é rosa translúcido favorecendo a estética. Após a fotoativação apresenta consistência borrachóide e baixa solubilidade. Apresenta vantagem no controle do seu tempo de presa, melhor manipulação e inserção; que são uma das principais dificuldades na utilização dos cimentos cirúrgicos convencionais.

### **Dos tipos e derivados do óleo essencial**

Em função de suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, cicatrizante e analgésica a ação de espécies de plantas contendo humuleno tem sido estudada em processos de natureza odontológica e médica. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Portanto, o alfa-humuleno é considerado um fitomedicamento, sendo um componente presente em plantas medicinais como lúpulo (*Humulus lupulus L.*), erva baleeira (*Cordia verbenácea*), arnica mineira (*Lychnophora pinaster*), entre outras plantas.

Na indústria de alimentos, quase que exclusivamente consumido pela indústria cervejeira o lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é atribuído aos seus metabólitos secundários, importantes para o amargor, aroma e conservantes. Os componentes considerados são alfa-ácidos, beta-ácidos e xanthohumol, que são componentes exclusivos de lúpulo, e  $\alpha$ -humuleno e beta-cariofileno, sesquiterpenos (STEENACKERS et al., 2015).

*Cordia verbenacea* é uma planta medicinal tradicional que cresce amplamente ao longo da costa sudeste do Brasil, pertencente à família Boraginaceae, que tem sido amplamente utilizada na medicina popular, na forma de extrato alcoólico, ou cozimento e infusões para suas propriedades antiúlcera, antimicrobianas, antiinflamatória, antirreumáticos, analgésicos e estimulante. O óleo essencial de *C.*

*verbenacea* é composto principalmente de mono e sesquiterpenos e os seus principais componentes são  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno e alloaromadendrene. Outros componentes incluem  $\alpha$ -humuleno, espatulenol,  $\beta$ -cariofileno e epóxigurjuneno (CARVALHO et al., 2004).

### **Do efeito biológico do extrato natural**

O uso da terapia à base de plantas medicinais constitui uma abordagem atrativa para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios. O fitomedicamento,  $\alpha$ -humuleno, de forma molecular  $C_{15}H_{24}$ , é um sesquiterpeno e um isômero do  $\beta$ -cariofileno, que é conhecido pelo seu potencial anti-inflamatório (CALIXTO et al., 2004). Resultados mostraram que a administração por via oral do óleo essencial de *Cordia verbenácea* em ratos, obteve inibição do edema na pata de ratos, além de diminuir significativamente o fator de necrose tumoral TNF-. A Erva baleeira é indicada nos casos de artrite, artrose, tendinite, dores miofaciais, LER (lesão por esforço repetitivo) e outros processos inflamatórios dolorosos. Estas propriedades anti-inflamatórias foram atribuídas a dois compostos, um sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno (PASSOS et al., 2007).

A inflamação é uma reação do organismo frente a uma agressão ou a uma lesão. Envolve diversas reações bioquímicas cuja missão é conter e isolar a lesão, destruir microrganismos invasores, inativar toxinas e conseguir o reparo e a cura. No entanto, este processo é nocivo, e pode causar lesão progressiva do órgão e perda de sua função. Segundo as pesquisas, o princípio ativo desta planta *Cordea verbenácea* responsável por sua ação terapêutica como anti-inflamatório é encontrado no seu óleo essencial. Ele é tão eficaz quanto o diclofenaco no tratamento da inflamação e dor musculares, porém com a vantagem de não existirem efeitos colaterais relacionado ao seu uso tópico. Atua impedindo a atividade enzimática da cicloxigenase 2 (COX-2), responsável pela produção das prostaglandinas (substâncias que produzem reações inflamatórias e seus sintomas).

Atividade antimicrobiana Carvalho Jr. e equipe (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das partes aéreas e folhas da espécie *Cordia verbenacea* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelo método de difusão em ágar. Foram observadas atividades positivas contra *Staphylococcus*, ATCC 5051; e duas de *Bacillus*) e contra fungos (oito espécies de *Candida*, uma

delas *C. albicans*, várias cepas, e uma de *Cryptococcus*), mas contra apenas um gênero de Gram-negativas (*Protium mirabilis* e *P. vulgaris*). MICHIELI et al. (2009), testou a atividade antimicrobiana dos extratos de *C. verbenacea*, submetido a rastreio contra quatro cepas de bactérias pelo método de diluição em ágar e obteve ação antimicrobiana significativamente maior em gram-positivas que em gram-negativas. Sendo os componentes mais importantes identificados no extrato artemetina,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, entre outros.

MEDEIROS et al. (2007), investigou em modelo de inflamação aguda em pata de rato, induzido por LPS e caracterizada por edema da pata que e o  $\alpha$ -humuleno inibiu a indução de LPS, a ativação de NF-kappaB e a migração de neutrófilos, e impediu a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1beta. CHAVES et al. (2008), concluiu que o  $\alpha$ -humuleno exibiu um aparecimento rápido e relativamente uma boa absorção após a administração oral e tópica.

Portanto, contribuir com suas qualidades de ação bacteriostática ou bactericida, de ação analgésica, não alergênico, não irritante, de odor ou gosto desagradável o fitoterápico alfa-humuleno será acrescentado na formulação da barreira cirúrgica em desenvolvida. No entanto, estudos utilizando a incorporação do óleo de humuleno em materiais odontológicos, especialmente os resinosos, ainda são restritos e escassos.

### **OBJETIVOS DA INVENÇÃO:**

Um cimento polimerizável temporário, de natureza resinosa, utilizando a incorporação do óleo em questão para materiais odontológicos. Indicado para cirurgias periodontais, ósseas e mucogengicais ou em vestibuloplastia, revestimento periodontal para proteção das suturas oriundas de cirurgias periodontais. Proporciona ao clínico uma redução do tempo clínico, visto que o manuseio é fácil e prático. Além disso, a limpeza do material que entra em contato com o cimento experimental é de fácil limpeza. O referido cimento quando em excesso pode ser removido de forma fácil com algum objeto metálico, plástico, ou até mesmo com uma gaze.

Não há dificuldade para a aplicação do cimento no interior da cavidade bucal, uma vez que pode ser aplicado diretamente da seringa onde o material é armazenado. O tempo de trabalho é plenamente controlado pelo profissional uma

vez que necessita de ser fotopolimerizado por meio de um fotopolimerizador de LED ou analógico.

A viabilidade deste material se justifica pela utilização de monômeros de característica anfifílica (compatibilidade com a dentina úmida e com materiais resinosos de natureza hidrófoba), e pelo comportamento elastomérico da matriz resinosa à base de monômeros metacrilatos e do componente oleoso atuar como uma plastificante.

Além disso, o compósito desenvolvido contará com a presença de extratos de origem natural, como o óleo extraído de diversas plantas medicinais como *Humulus lupulus* L., *Lychnophora pinaster*, *Cordea Verbanacea*, *Ageratum fastigiatum*, *Amsonia illustris* Woods, *Cajanus cajan* L., *Callicarpa integerrima*, *Comptonia peregrina*, *Croton flavens*, *Cupressus atlântica*, *Eugenia caryophyllus*, *Eupatorium betonicaeforme*, *Euphorbia caracasana*, *Gnaphlium affine*, *Juniperus communis*, *Leptospermum madidum* *Lindera obtusiloba*, *Litsea linii*, *Litsea mushaensis*, *Litsea nakaii*, *Mentha spicata*, *Murraya exótica*, *nepeta catarina*, *Peperomia serpens*, *Peucedanum ostruthium*, *Peucedanum tauricum*, *Pinus peuce*, *Piper aduncum*, *Piper gaudichaudianum*, *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus incanus*, *Plectranthus rugosus*, *Protium giganteum*, *Retama raetam*, *Rhododendron anthopogon*, *Salvia chionantha* Boiss, *Salvia officinalis*, *Sanitria trimera*, *Seseli bocconi* Guss, *Solanum erianthum*, *Stachys cretica*, *Syzygium aromaticum*, *Teucrium quadrifarium*, *Teucrium royleanum*, *Thuja orientalis*, *Ugni myricoides*, *Zingiber nimmonii*, *Zingiber-zerumbet*, *Ageratum conizoides*, *Aloysia virgata*, *Alpinia zerumbet*, *Ambrosia artemisiaefolia*, *Artemisia vulgaris*, *Azadirachta indica*, *Centratherum punctatum*, *Croton zehntneri*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Cyperus esculentus*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus tereticoris*, *Eugenia inuflora*, *Hyptis suaveolens*, *Ipomoea batatas*, *Lantana camara*, *Lippia alba*, *Lippia sidoides* Cham, *Lippia thymoides*, *Mentha pulegium*, *Mentha X piperita*, *Mentha X piperita* var., *Mentha X villosa* Huds., *Ocimum americanum*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum micranthum*, *Ocimum selloi*, *Persea americana*, *Plectranthus grandis*, *Plectranthus ornatos*, *Psidium guajava*. Em especial o princípio ativo humuleno extraído desses extratos naturais, ao qual é atribuído as propriedades farmacológicas: antiinflamatória, antitumoral, analgésica, antimicrobiana, o que pode auxiliar na prevenção da contaminação por microrganismos na ferida cirúrgica.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO:**

Preferencialmente, o material é apresentado na forma de pasta única, deve ser aplicado de forma leve e conforme indicação. Logo após sua completa adaptação, é necessária uma unidade fotopolimerizadora para dar início a cura do material. Após fotopolimerizado, o material apresenta alto módulo de elasticidade, sendo, portanto, suficientemente flexível, proporcionando conforto ao paciente. A composição apresenta consistência menos viscosa e menos pegajosa proporcionando ao clínico melhor adaptação do material na área de escolha e facilidade de limpeza tanto das áreas intrabucais quanto à limpeza dos instrumentais que entrarem em contato o cimento desenvolvido. Além disso, é importante ressaltar que não é necessário fazer uso de calor nem pressão para adaptar o material.

Os monômeros acrilatos podem ser usados na forma de monômeros, oligômeros ou pré-polímeros que contenham um ou mais grupos funcionais acrilato ou metacrilato. Opções comerciais, os de oligômeros de uretano metacrilato (Exothane<sup>®</sup>, Esstech Inc) representam uma excelente alternativa, porém, não se restringindo a estes. Os monômeros metacrilatos conferem alto módulo de elasticidade ao material após a presa, enquanto os co-monômeros diluentes controlam a viscosidade e contribuem para as propriedades físicas da composição. Já os monômeros surfactantes (características hidrófobas e hidrófilas na mesma molécula) contribuem para a compatibilidade do material tanto com os materiais resinosos, quanto com o substrato dentinário úmido.

Partículas inorgânicas são utilizadas para promover o ajuste das propriedades mecânicas do material, provendo também a viscosidade adequada. No cimento tem-se a presença fundamentalmente da substância resinosa e a substância oleosa corroborando para o efeito antimicrobiano, analgésico e atribuindo capacidade antiinflamatória, antialérgica e antitumoral. Também, um ou mais agentes antimicrobianos e/ou bioativos podem ser inclusos na composição para corroborar com as propriedades do cimento, além de outros materiais para corroborar com as características físico, química e mecânica do material. A presente invenção refere-se também ao uso do alfa-humuleno incorporado na composição de materiais de uso odontológico, restaurador temporário, capeador pulpar, membranas reabsorvíveis, material de recobrimento, e soluções odontológicas. As substâncias antiinflamatória e antimicrobianas irão auxiliar no controle da infecção.

Desse modo, as composições odontológicas da presente invenção são indicadas para aplicação como material temporário pós-cirúrgico, para aplicação em tratamentos cirúrgicos periodontais, cirurgias odontológicas em geral onde há área cruenta exposta ou dificuldade de manutenção da homeostasia, como material restaurador temporário.

### **Do uso de composição polimérica flexível**

Apesar das vantagens apresentadas por compósitos temporários para recobrimento gengival uma das principais preocupações acerca desses novos materiais diz respeito à biocompatibilidade que estas composições poliméricas sobre o tecido conjuntivo. Estudos *in vitro* evidenciam a liberação de monômeros na cavidade oral em formulações semelhantes de materiais resinosos utilizados nos materiais restauradores (HANKS et al., 1988) e dos sistemas de união. A liberação de monômeros tem sido reportada como principal fator responsável pela citotoxicidade e sensibilidade pós-operatória.

Testes prévios, divulgados pelo fabricante, revelaram que esses monômeros mostraram propriedades mecânicas superiores no que se refere à tenacidade, dureza, cor, resistência à tração e alongamento. Testes adicionais confirmaram sua baixa contração volumétrica, baixa tensão de contração e alta taxa de conversão. Esses elastômeros apresentam conversão de mais de 90% minimizando o estresse de contração de polimerização. Os padrões utilizados em comparação não conseguiram alcançar 75% de grau de conversão e teve cinco vezes mais estresse de contração de polimerização. O grau de conversão foi consistentemente mais elevado do que o UDMA e BisGMA: TEGDMA. Tanto a contração volumétrica como a tensão de contração também foram mais baixos do que os dos padrões.

### **EXEMPLOS:**

Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos, são agora apresentados como exemplos os resultados dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

Estes exemplos são apresentados a título meramente ilustrativo e não devem ser de forma alguma considerados como limitativos do âmbito e do alcance da presente invenção. Nos exemplos a seguir, foram utilizados os seguintes materiais:

Tabela 1. Materiais utilizados na formulação dos compósitos experimentais.

<b>Monômero</b>	<b>Fotoiniciador</b>	<b>Cargas</b>	<b>Outros</b>	<b>Fitomedicamento</b>
Exotano 32 (Esstech Inc., Essington, PA, EUA).	Canforoquinona (Esstech Inc).	Partículas de sílica não silanizada (7nm, Aerosil 380, Degussa, ALE).	DDM, PGMM, DHEPT, EDAB (EsstechInc)	Alfa-humulleno (Lote BCBN2536V, Sigma-Altrich, St. Louis, MO, EUA).

DDM, Dodecanodiol dimetacrilato, PGMM, polipropileno glicol monometacrilato; DHEPT, dihidroxietil-p-Toluidina; EDAB, etil 4-dimetil-aminobenzoato.

Após a obtenção das blendas dos cimentos experimentais será acrescentado o fitomedicamento nas diferentes concentrações por peso.

Os grupos estão divididos em: Cimento cirúrgico experimental A ( $E_a$ ); Cimento cirúrgico experimental com diferentes porcentagens do fitomedicamento, sendo denominados Cimento cirúrgico experimental com 0-1% do fitomedicamento ( $E_{aHum1}$ ); Cimento cirúrgico experimental com 1-5% do fitomedicamento ( $E_{aHum2}$ ); Cimento cirúrgico experimental com 5-15% do fitomedicamento ( $E_{aHum3}$ ); Cimento cirúrgico experimental com 15-25% do fitomedicamento ( $E_{bHum4}$ ); Cimento cirúrgico experimental B ( $E_b$ ); Cimento cirúrgico experimental com 0-1% do fitomedicamento ( $E_{bHum1}$ ); Cimento cirúrgico experimental com 1-5% do fitomedicamento ( $E_{bHum2}$ ); Cimento cirúrgico experimental com 5-15% do fitomedicamento ( $E_{bHum3}$ ); Cimento cirúrgico experimental com 15-25% do fitomedicamento ( $E_{bHum4}$ ); Cimento cirúrgico Periobond® (PB, Dentsply, RJ BR, lote 132214H); e Cimento cirúrgico Barricaid® (BC, Dentsply, MO, EUA, lote 160624).

### **EXEMPLO 1 – Formulação da pasta.**

De acordo com as potenciais aplicações da presente invenção e de forma somente ilustrativa, sem a intenção de limitar em qualquer circunstância a abrangência da presente invenção, é descrita a seguir uma das possíveis formulações:

### Componente Percentual em massa (%)

#### Formulação A

Exotano 32	25 – 90%
PGMM	5 – 45%
Dodecanodiol	5 – 55%

Após a obtenção da matriz orgânica, foram incorporados (percentual em massa): 0,5 - 35% de extrato natural; 0,01 – 5% de fotoiniciador CQ e 0,1 - 5% de agente redutor DHEPT. E, por fim, foi adicionada carga inorgânica do tipo sílica coloidal não-sinalizada, na proporção de 2 - 35%.

### Componente Percentual em massa (%)

#### Formulação B

Exotano 32	60 – 95%
------------	----------

Após a obtenção da matriz orgânica, foram incorporados (percentual em massa): 0,5 - 35% de extrato natural; 0,01 – 5% de fotoiniciador CQ e 0,1 - 5% de agente redutor DHEPT. E, por fim, foi adicionada carga inorgânica do tipo sílica coloidal não-sinalizada, na proporção de 2 - 35%.

### EXEMPLO 2 – Desempenho do material: Sorção e Solubilidade.

Dez espécimes de 6 mm de diâmetro e 1 mm de espessura foram confeccionados (Malacame *et al.*, 2006). Os espécimes foram colocados em um “dessecador” contendo sílica e cloreto de cálcio e armazenados em estufa a 37°C. Após 24 h, a massa de todos os espécimes foi mensurada e com auxílio de um paquímetro digital foram medidos o diâmetro e a espessura para obtenção do volume de cada espécime. Depois disso, as massas de todos os CP foram mensuradas até a sua estabilização. Essa massa foi denominada de  $m_1$ , pois representa a massa seca do espécime antes da ocorrência dos fenômenos de sorção e solubilidade.

Após a definição da  $m_1$ , todos os espécimes foram colocados em ependorfs identificados contendo água destilada, no volume de 2 ml para cada CP. Os ependorfs foram armazenados dentro de uma estufa a 37°C e, após uma semana, a massa de todos os espécimes foi mensurada, desta vez sendo denominada de  $m_2$ ,

pois representa a massa úmida do espécime após este ter sorvido água do meio em que foi armazenado.

Em seguida, os corpos de prova foram armazenados no “dessecador” com sílica e cloreto de cálcio em estufa a 37°C (fig. 4), a fim de adquirir uma terceira massa ( $m_3$ ). Após a estabilização desta, a  $m_3$  representa a massa final do espécime após o fenômeno de solubilidade lixiviar componentes do mesmo.

A Sorção de água (WS) e a Solubilidade (SL) foram calculadas a partir das seguintes fórmulas:  $WS = (m_2 - m_3) / V$ ;  $SL = (m_1 - m_3) / V$ , onde V representará o Volume dos espécimes, que foi obtido da seguinte maneira:  $V = \pi R^2 h$ , onde  $\pi$  representa o valor constante de 3,14; R o raio do espécime; e h a altura do mesmo. O raio foi obtido através da média entre dois diâmetros perpendiculares de cada espécime; e a altura foi obtida pela média entre cinco alturas diferentes para cada um dos espécimes.

### Resultado da análise de Sorção e Solubilidade

Tabela 2. Sorção (WS) e Solubilidade (SL) em água dos grupos testados. Média e Desvio Padrão ( $p < 0,05$ ).

Grupo	WS ( $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ )	SL ( $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ )
E <sub>a</sub>	61,4 (29,9) •†	56,6 (31,7) †
E <sub>a</sub> Hum1	63,4 (7,3)•	59,3 (5,3) †
E <sub>a</sub> Hum2	78,2 (57,9)	105,0 (14,2) •†
E <sub>a</sub> Hum3	153,5 (112,8)†	108,9 (15,1) •†
E <sub>a</sub> Hum4	100,6 (32,7)†	133,8 (47,0) •†
Barricaid®	51,4 (14,4)•	3,5 (7,3)
Periobond®	110,3 (22,0)†	7,6 (214,8)

Tabela 3. Sorção (WS) e Solubilidade (SL) em água dos grupos testados. Média e Desvio Padrão ( $p < 0,05$ ).

<b>Grupo</b>	<b>WS (<math>\mu\text{g}/\text{mm}^3</math>)</b>	<b>SL (<math>\mu\text{g}/\text{mm}^3</math>)</b>
<b>E<sub>b</sub></b>	47,8 (8,5)•	1,4 (4,0)
<b>E<sub>b</sub> Hum1</b>	51,3 (6,5)•	4,2 (5,3)
<b>E<sub>b</sub> Hum2</b>	66,3 (8,7)	13,4 (5,7)
<b>E<sub>b</sub> Hum3</b>	64,2 (6,2)•	24,3 (22,5)
<b>E<sub>b</sub> Hum4</b>	46,9 (8,1)•	20,7 (7,7)
<b>Barricaid®</b>	51,4 (14,4)•	3,5 (7,3)
<b>Periobond®</b>	110,3 (22,0)†	7,6 (214,8)

### **EXEMPLO 3 – Desempenho do material: Grau de conversão por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).**

O grau de conversão (GC) representa o perfil de conversão dos monômeros em polímero e está diretamente associado às propriedades físicas e mecânicas do material.

O GC dos cimentos foram avaliados por meio de aparelho espectrofotômetro infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR Shimadzu Prestige21 Spectrometer, Shimadzu, Tóquio Japão) equipado a um suporte acoplado para a fixação da unidade foto-ativadora LED (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália) ao espectrofotômetro, permitindo uma distância uniforme de 5 mm entre a extremidade da ponteira de fibra ótica e a amostra. A irradiância foi mensurada por intermédio de radiômetro portátil (model 100, Kerr, EUA).

Uma pequena quantidade do material (~3  $\mu\text{l}$ ) foi depositada diretamente no cristal de diamante em pequenas quantidades e fotoativada por 30 s ( $n=3$ ). Para o monitoramento de varredura foi utilizado o software IRSolution, em uma faixa espectral entre 1750 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e velocidade de deslocamento de espelho de 2,8 mm/s.

## Resultado do Grau de Conversão

Tabela 4. Grau de conversão (GC) dos grupos testados. Média e Desvio Padrão ( $p < 0,05$ ).

<b>Grupo</b>	<b>GC (%)</b>
<b>E<sub>a</sub></b>	52 (2) b
<b>E<sub>a</sub> Hum1</b>	52 (2) b
<b>E<sub>a</sub> Hum2</b>	4(2) 6 c
<b>E<sub>a</sub> Hum3</b>	40 (2) d
<b>E<sub>a</sub> Hum4</b>	36 (2) d
<b>Barricaid®</b>	95 (4) a

Tabela 5. Grau de conversão (GC) dos grupos testados. Média e Desvio Padrão ( $p < 0,05$ ).

<b>Grupo</b>	<b>GC (%)</b>
<b>E<sub>b</sub></b>	94 (2) a
<b>E<sub>b</sub> Hum1</b>	96 (1) a
<b>E<sub>b</sub> Hum2</b>	95 (2) a
<b>E<sub>b</sub> Hum3</b>	96 (2) a
<b>E<sub>b</sub> Hum4</b>	96 (4) a
<b>Barricaid®</b>	95 (4) a

### EXEMPLO 4 – Desempenho do material: Resistência coesiva à tração

Para este teste, apenas foram utilizadas amostras do cimento experimental e do Barricaid®, devido à impossibilidade de confecção de corpos de prova deste tipo com o cimento de presa química Periobond. Antes de realizar o ensaio, os corpos foram imersos em água deionizada e armazenados em uma estufa a 37°C por 24h.

O dispositivo metálico específico para este teste foi utilizado, acoplado a uma máquina de ensaio mecânico EMIC DL-500 (EMIC, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) com adaptação de célula de carga de 100 Newtons. As amostras foram medidas através de paquímetro digital com precisão de 0,01 mm, na área de constrição de 1,0 ( $\pm 0,2$ ) mm<sup>2</sup>, em altura e largura e fixadas no dispositivo de tração por intermédio de adesivo a base de cianocrilato (Superbond Gel, Loctite, São Paulo, Brasil), de modo a posicionar a constrição do corpo de prova paralela ao longo eixo de carregamento de tração.

Em seguida o dispositivo foi acoplado à máquina de ensaios universal e feito o carregamento de tração com velocidade de 0,5 mm/minuto, até a fratura da amostra. No momento da fratura os dados foram coletados para posterior análise. Os valores finais de resistência à tração foram calculados dividindo-se os valores de resistência de ruptura pela área das secções transversais das amostras, determinando a resistência máxima (MPa).

### Resultado da Resistência coesiva à tração

Tabela 6. Resistência coesiva à tração (RC) dos grupos testados. Média e Desvio Padrão ( $p < 0,05$ ).

<b>Grupo</b>	<b>RC (Mpa)</b>
<b>E<sub>a</sub></b>	2,7(0,3) a
<b>E<sub>a</sub> Hum1</b>	2,1 (0,4) b
<b>E<sub>a</sub> Hum2</b>	1,8 (0,2) bc
<b>E<sub>a</sub> Hum3</b>	1,2 (0,2) cd
<b>E<sub>a</sub> Hum4</b>	1,2 (0,2) d
<b>Barricaid®</b>	3,0 (0,5) a

Tabela 7. Resistência coesiva à tração (RC) dos grupos testados. Média e Desvio Padrão ( $p < 0,05$ ).

<b>Grupo</b>	<b>RT (Mpa)</b>
<b>E<sub>b</sub></b>	2,6 (0,3) a
<b>E<sub>b</sub> Hum1</b>	2,5 (0,4) a
<b>E<sub>b</sub> Hum2</b>	1,7 (0,2) b
<b>E<sub>b</sub> Hum3</b>	1,5 (0,3) b
<b>E<sub>b</sub> Hum4</b>	0,6 (0,1) c
<b>Barricaid®</b>	3,0 (0,5) a

### EXEMPLO 5 – Desempenho do material: Efeito Antimicrobiano

Avaliou-se o efeito antimicrobiano dos cimentos cirúrgicos pelo teste de contato direto modificado (TCDM) contra cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095.

Para a reativação das cepas armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram transferidos  $100\mu\text{l}$  do inóculo bacteriano para um tubo estéril contendo 9 ml de UTYB (meio ultra purificado de tryptic soy broth) + 1ml de glicose, e incubados por 18 h em estufa de  $\text{CO}_2$ . Após este período,  $10\mu\text{L}$  da mistura foram transferidos para uma placa contendo ágar soja tripticaseína (TSB, Biosystems) e realizou-se um *streak* do caldo no ágar. A placa foi incubada por toda a noite em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e a partir do crescimento registrado na placa, foram coletadas colônias isoladas. Estas foram transferidas para um tubo estéril com 9 ml de UTYB + 1ml de glicose (*starter*) e incubadas por 18h em estufa.

A suspensão microbiana foi ajustada por espectrofotometria (espectrofotômetro, Químia, Brasil), a  $1 \times 10^8$  para absorvância. Utilizou-se  $20\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana em cada poço avaliado.

O teste por contato direto modificado consiste na mensuração do crescimento cinemático microbiano pelo íntimo contato entre o microrganismo testado e o material (WEISS et al., 1996), utilizando microplacas de cultura de células de 96 poços. Foram utilizados quatro corpos de prova por grupo testado. As amostras de cada um dos materiais foram dispensadas em um poço. Realizou-se, ainda, o controle negativo (material com meio de cultura sem suspensão microbiana), e o controle positivo (suspensão microbiana com meio de cultura sem material). Os materiais foram colocados nos poços da microplaca com auxílio de uma pinça estéril e sobre o material foi inoculado  $20\ \mu\text{l}$  da suspensão microbiana (BHI + bactéria). Seguidamente as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 e 24 h por placa.

Após os respectivos tempos, foram retiradas da estufa e acrescentado em cada poço  $180\mu\text{l}$  de meio de cultura TSB mais 10% de sacarose, levadas ao Shaker (Guangzhou Mekan Trading Co., Ltd., China), por 10 min. Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas e plaqueamento em placas petri descartáveis divididas em oito partes, contendo meio TSA. Cada parte recebeu duas gotas de  $20\mu\text{l}$  de cada diluição. Foi incubado em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h. Transcorrido o período de incubação, foram contadas as Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/ml) (ZHANG et al., 2009). Os resultados dos cimentos experimentais foram submetidos à análise de variância em duas vias, logo após comparada com os cimentos comerciais ( $p < 0,05$ ).

## Resultado do teste de contato direto modificado

Tabela 8. Teste de contato direto modificado contra *S. aureus* e *E. faecalis* em 1 h e 24 h. Unidades expressas em  $\log_n$  (Média  $\pm$  Desvio Padrão) ( $p < 0,05$ ).

	<i>S. aureus</i>	
	1h	24h
<b>Ea</b>	A 7,1 $\pm$ 0,1 b	B 5,5 $\pm$ 0,1 b
<b>Ea Hum1</b>	A 7,1 $\pm$ 0,05 b	A 7,06 $\pm$ 0,2 b
<b>Ea Hum2</b>	A 7,1 $\pm$ 0,1 b	B 6,14 $\pm$ 0,9 b
<b>Ea Hum3</b>	A 7,3 $\pm$ 0,3 ab	A 7,33 $\pm$ 0,4 ab
<b>Ea Hum4</b>	A 6,8 $\pm$ 0,3 b	A 6,61 $\pm$ 0,5 b
<b>Barricaid®</b>	A 7,2 $\pm$ 0,2 ab	B 6,8 $\pm$ 0,3 ab
<b>Periobond®</b>	A 8,1 $\pm$ 0,3 a	B 7,24 $\pm$ 0,4 a
<b>Controle +</b>	A 7,8 $\pm$ 0,1 a	A 7,9 $\pm$ 0,2 a

	<i>E. faecalis</i>	
	1h	24h
<b>Ea</b>	B 5,8 $\pm$ 0,1 ab	A 6,5 $\pm$ 0,4 b
<b>Ea Hum1</b>	B 5,8 $\pm$ 0,1 ac	A 6,6 $\pm$ 0,3 b
<b>Ea Hum2</b>	B 5,7 $\pm$ 0,04 bcd	A 6,2 $\pm$ 0,3 bc
<b>Ea Hum3</b>	B 5,8 $\pm$ 0,1 ac	A 6,4 $\pm$ 0,4 bc
<b>Ea Hum4</b>	B 5,6 $\pm$ 0,1 bcd	A 7,0 $\pm$ 0,2 ab
<b>Barricaid®</b>	B 4,8 $\pm$ 0,5 cd	A 7,4 $\pm$ 0,3 a
<b>Periobond®</b>	B 5,1 $\pm$ 0,1 d	A 7,2 $\pm$ 0,1 ac
<b>Controle +</b>	B 6,3 $\pm$ 0,1 a	A 7,8 $\pm$ 0,1 a

Tabela 9. Teste de contato direto modificado contra *S. aureus* e *E. faecalis* em 1 h e 24 h. Unidades expressas em  $\log_n$  (Média  $\pm$  Desvio Padrão) ( $p < 0,05$ ).

	<i>S. aureus</i>	
	1h	24h
<b>E<sub>b</sub></b>	A 7,5 $\pm$ 0,2 bc	B 5,9 $\pm$ 0,3 cd
<b>E<sub>b</sub> Hum1</b>	A 7,3 $\pm$ 0,04 d	B 5,9 $\pm$ 0,1 d
<b>E<sub>b</sub> Hum2</b>	A 7,7 $\pm$ 0,3 bc	B 6,3 $\pm$ 0,2 ad
<b>E<sub>b</sub> Hum3</b>	A 7,0 $\pm$ 0,05 ef	B 4,7 $\pm$ 0,1 d
<b>E<sub>b</sub> Hum4</b>	A 6,7 $\pm$ 0,1 e	B 6,2 $\pm$ 0,1 bcd
<b>Barricaid<sup>®</sup></b>	A 7,2 $\pm$ 0,2 df	B 7 $\pm$ 0,3 ac
<b>Periobond<sup>®</sup></b>	A 8,1 $\pm$ 0,3 ab	B 7 $\pm$ 0,4 ab
<b>Controle+</b>	A 7,8 $\pm$ 0,1 a	A 7,9 $\pm$ 0,2 a

	<i>E. faecalis</i>	
	1h	24h
<b>E<sub>b</sub></b>	B 5,9 $\pm$ 0,1 ab	A 7,4 $\pm$ 0,2 ac
<b>E<sub>b</sub> Hum1</b>	B 5,9 $\pm$ 0,1 abc	A 7,2 $\pm$ 0,2 ac
<b>E<sub>b</sub> Hum2</b>	B 6,0 $\pm$ 0,1 ab	A 6,9 $\pm$ 0,2 c
<b>E<sub>b</sub> Hum3</b>	B 5,8 $\pm$ 0,2 abc	A 6,6 $\pm$ 0,5 c
<b>E<sub>b</sub> Hum4</b>	B 5,7 $\pm$ 0,1 bc	A 6,3 $\pm$ 0,2 c
<b>Barricaid<sup>®</sup></b>	B 5,1 $\pm$ 0,5 c	A 7,5 $\pm$ 0,3 ab
<b>Periobond<sup>®</sup></b>	B 5,1 $\pm$ 0,1 c	A 7,2 $\pm$ 0,1 bc
<b>Controle+</b>	B 6,3 $\pm$ 0,03 a	A 7,8 $\pm$ 0,1 a

#### EXEMPLO 6 – Desempenho do material: Viabilidade celular

Para os ensaios de viabilidade celular dos diferentes materiais estudados, foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos de camundongos 3T3/NIH. Os fibroblastos de camundongos de uma linhagem imortalizada 3T3/NIH provenientes do Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas (NCT-BIO/FO-UFPel), foram utilizados para os experimentos. As condições de tratamento, incluindo cultura e tempo de exposições, foram baseadas nas especificações da ISO 10993:2009 (International Standards Organization). A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais será verificada através da análise de variância ( $p < 0,05$ ).

## Resultado do ensaio de viabilidade celular

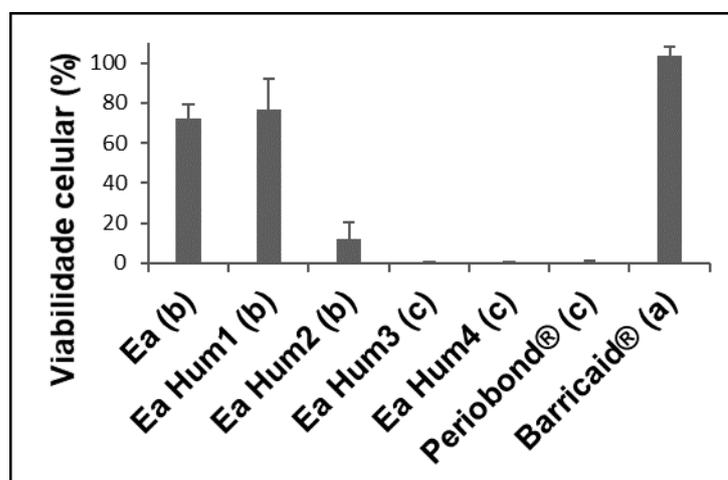


Figura 1. Viabilidade celular dos cimentos experimentais ( $E_a$ ) e com adição de diferentes porcentagens do fitomedicamento e dos cimentos comerciais. As diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via seguido do teste complementar SNK ( $p < 0,05$ ).

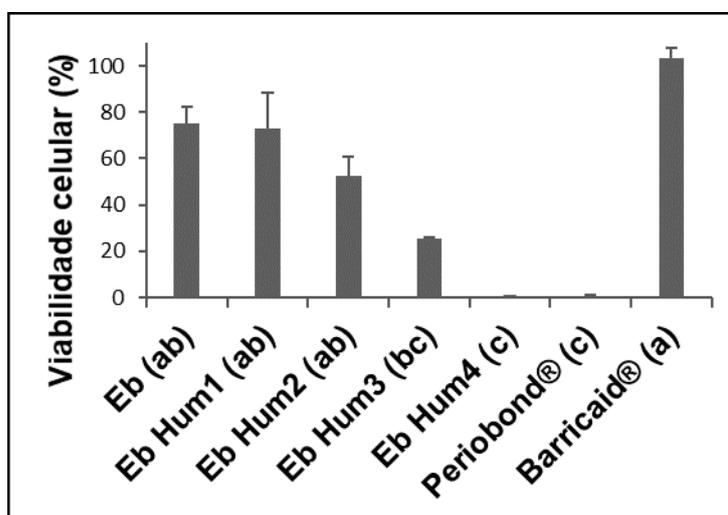


Figura 2. Viabilidade celular dos cimentos experimentais ( $E_b$ ) e com adição de diferentes porcentagens do fitomedicamento e dos cimentos comerciais. As diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via seguido do teste complementar SNK ( $p < 0,05$ ).

Tratou-se no presente relatório descritivo, de uma invenção dotada de novidade, atividade inventiva, aplicação industrial e suficiência descritiva, preenchendo os requisitos determinados pela lei da propriedade industrial para obter a concessão da patente de invenção pleiteada.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição fotopolimerizável temporária para uso médico e odontológico caracterizada por possuir monômeros biocompatíveis como os uretanos metacrilatos, plastificantes e alfa-humuleno.
2. Composição fotopolimerizável temporária para uso médico e odontológico caracterizada por conter monômeros biocompatíveis e alfa-humuleno.
3. O componente alfa-humuleno pode estar associado a componentes bioativos ou artificiais, de acordo com a reivindicação 1 e 2.
4. Composições que contenham alfa-humuleno como agente anti-inflamatório e antimicrobiano.
5. A composição que contenha um ou mais tipos de monômeros, de acordo com a reivindicação 1 e 2.
6. A composição que contenha um ou mais tipos de plastificantes, de acordo com a reivindicação 1.
7. Outros materiais podem ser incluídos na manipulação ou na formulação para corroborar com as características físicas, químicas ou mecânicas do material.
8. Composições odontológicas ou médicas que se refiram ao uso do alfa-humuleno incorporado a restaurador temporário, ao capeador pulpar, a soluções endodônticas; a soluções de bochecho, a membranas reabsorvíveis, a materiais de revestimento de superfícies (metálica, plástica, tecidual, dental).
9. Composições odontológica ou médica que compreendam de 0,01% a 99,9% em peso, preferencialmente de 0,1% a 20% em peso.
10. Composições odontológicas de acordo com a reivindicação 9, que compreendam qualquer unidade de medida para utilização do alfa-humuleno.



#### **4 Considerações finais**

1. Desenvolveu-se duas formulações bases, Ea e Eb, onde foram aplicadas o alfa-humuleno em quantidade por peso de 1%, 5%, 10% e 20%. Totalizando dez cimentos experimentais a serem avaliados.
2. A porcentagem máxima de óleo para formulação foi definida de acordo com a viscosidade do material durante sua manipulação, afim de ser apto para a aplicação como cimento periodontal ou cirúrgico.
3. O tempo de trabalho dos materiais é determinado pelo clínico, visto que é um material fotoativado, onde, seu tempo de fotoativação é de 30 segundos.
4. Os materiais experimentais Ea (sem óleo), Eb (sem óleo), Ea com 1%, Eb com 1% e Eb com 5% de alfa-humuleno obtiverem viabilidade celular estatisticamente similar ao Barricaid®.
5. Em relação à análise microbiológica todos os cimentos contendo ou não alfa-humuleno apresentaram efeito antimicrobiano em relação ao controle positivo, variando de acordo com o tempo de exposição, o tipo de formulação (Ea ou Eb) e a concentração de alfa-humuleno nos cimentos experimentais.
6. Em relação ao grau de conversão os materiais estatisticamente semelhantes ao Barricaid® foram Eb sem óleo e em todas as concentrações de alfa-humuleno.
7. Para a propriedade de resistência coesiva os materiais Ea, Eb, Eb com 1% mostraram comportamento semelhante ao Barricaid®, pressupondo bom comportamento clínico em relação a essa propriedade.
8. Os cimentos experimentais formulados com Eb, com ou sem alfa-humuleno, demonstraram sorção em água e solubilidade semelhantes estatisticamente ao Barricaid®.

Em relação as propriedades testadas, conclui-se que os materiais experimentais contendo alfa-humuleno possuem grande potencial comercial para utilização como cimento periodontal ou cirúrgico. Além disso, mais ensaios devem ser realizados para avaliar propriedades como alteração dimensional, adesão nas estruturas dentais, liberação do óleo do material resinoso, potencial anti-inflamatório. Avançando, assim, para os ensaios clínicos.



## Referências

ALPAR, B., GUNAY, H., GEURTSSEN, W., LEYHAUSEN, G. Cytocompatibility of periodontal dressing materials in fibroblast and primary human osteoblast-like cultures. **Clinical Oral Investigations**, v.3, n.1, p.41-48, 1999.

BARKIN, M. E., BOYD, J. P., COHEN, S. Acute allergic reaction to eugenol. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 57, n. 4, p. 441-442, 1984.

BERNIER, J. L., KAPLAN, H. The repair of gingival tissue after surgical intervention. **Journal of America Dental Association**, v.35, n.10, p.697-705, 1947.

BIKANGA, R., MAKANI, T., AGNANIET, H., OBAME, L. C., ABDOUL, L. F. M., LEBIBI, J., MENUT, C. Chemical composition and biological activities of *Santiria trimera* (Burseraceae) essential oils from Gabon. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 6, p. 961-964, 2010.

CALIXTO, J. B., MEDEIROS, R., FERNANDES, E.S., FERREIRA, J., CABRINI, D. A., CAMPOS, M. M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 7, p. 803-818, 2004.

CHAVES, J.S., LEAL, P.C., PIANOWISKY, L., CALIXTO, J.B. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of the Sesquiterpene alpha-humulene in mice. **Planta Médica**, v, 74, n. 14, p. 1678-1683, 2008.

CHESHIRE, P. D., GRIFFITHS, G. S., GRIFFITHS, B. M., NEWMAN, H. N. Evaluation of the healing response following placement of Coe-pak and an experimental pack after periodontal flap surgery. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 23, n. 3 Pt 1, p. 188-193, 1996.

CORNELIO, R. B., KOPPERUD, H. M., HAASUM, J., GEDDE, U. W., ÖRTENGREN, U. Influence of different mould materials on the degree of conversion of dental composite resins. **Brazilian Journal Oral Science**, v. 11, n. 4, p. 469-474, 2012.

DAHL, J. E., FRANGOU-POLYZOIS, M. J., POLYZOIS, G. L. *In vitro* biocompatibility of denture relining materials. **Gerodontology**, v. 23, n. 1, p. 17–22, 2006.

DE CARVALHO P. M. JR., RODRIGUES, R. F., SAWAYA, A. C., MARQUES, M. O., SHIMIZU, M. T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 297–301, 2004.

DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C., MAGALHAES, C. G., DA SILVA, C. J., MALTHA, C. R., PINHEIRO A. L. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1181-1191, 2011.

EBER, R. M., SHULER, C. F., BUCHANAN, W., BECK, F. M., HORTON, J. E. Effect of periodontal dressings on human gingiva fibroblasts *in vitro*. **Journal of Periodontology**, v. 60, n. 8, p. 429-434, 1989.

ESSIEN, E. E., OGUNWANDE, I. A., SETZER, W. N., EKUNDAYO, O. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxicity studies on *S. erianthum* and *S. macranthum* essential oils. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 4, p. 474-480, 2011.

ESSTECH, INC. Disponível em: <<http://www.esstechinc.com>> Acesso em: 15 ago. 2017.

FERNANDES, E. S.; PASSO, S. G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FERRACANE, J. L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dental Materials**, v. 22, n. 3, p. 211-222, 2006.

FRISCH, J.; BHASKAR, S.N. Tissue response to eugenol-containing periodontal dressings. **Journal of Periodontology**, v. 38, n. 5, p. 402-408, 1967.

GJERDET, N. R., HAUGEN, E. Dimensional changes of periodontal dressings. **Journal of Dental Research**, v. 56, n. 12, p. 1507-1510, 1977.

HANKS, C. T., CRAIG, R. G., DIEHL, M. L., PASHLEY, D. H. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. **Journal Oral Pathology**, v. 17, n. 8, p. 396-403, 1988.

HAUGEN, E., ESPEVIK, S., MJÖR, I. A. Methods for evaluation of working and setting times of periodontal dressings. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 37, n. 5, p. 309-315, 1979.

HILDEBRAND, C. N., DERENZIS, F. A. Effect of periodontal dressings on fibroblasts *in vitro*. **Journal of Periodontal Research**, v. 9, n. 2, p. 114-120, 1974.

International Standards Organization. Polymer-based restorative materials. Geneva: Switzerland, 4940, 2009.

International Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: Switzerland, 10993, 2009.

KOZAM, G., MANTELL, G. M. The effect of eugenol on oral mucous membranes. **Journal of Dental Research**, v. 57, n. 11-12, p. 954-957, 1978.

LEGAULT, J. , DHAL W. , DEBITON E. , PICHETTE, A. , MADELMONT J. C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 402-407, 2003.

LOE, H.; SILNESS, J. Tissue reaction to a new gingivectomy pack. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 14, n. 11, p. 1305-14, 1961

MADAN, E., BHARTI, V., CHAUBEY, K. K., ARORA, V. K. R., THAKUR, R. K., NIRWAL, A. Light-cured resin "Barricaid" – An aesthetic and biocompatible dressing: A step ahead. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 6, p. 753–756, 2013.

MALACARNE J., CARVALHO R. M., DE GOES, M. F., SVIZERO, N., PASHLEY, D. H., TAY, F. R., YIU, C. K., CARRILHO, M. R. Water sorption/ solubility of dental adhesives resins. **Dental Materials**, v. 22, n. 10, p. 973-980, 2006.

MEDEIROS, R., PASSOS, G. F., VITOR, C. E., KOEPP, J., MAZZUCO, T. L., PIANOWSKI, L. F., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal Pharmacology**, v. 151 n. 5, p. 618-27, 2007.

MICHIELIN, E. M., SALVADOR, A. A., RIEHL, C. A., SMÂNIA, A. JR., SMÂNIA E. F., FERREIRA, S. R. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6615-6623, 2009.

MILANEZI, L.A., HOLLAND, R. Processo de reparo dos tecidos periodontais após gengivectomia e proteção com diferentes tipos de cimentos cirúrgicos. **Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, v. 1, n. 1, p. 57-67, 1972.

NAYIF, M. M. , NAKAJIMA, M., FOXTON, R. M. , TAGAMI, J. Effect of light irradiation time on the mechanical properties of two flowable composites with different initiation systems in bonded and unbonded cavities. **Dental Materials Journal**, v. 26, n. 5, p. 687-693, 2007.

NORONHA FILHO, J. D., BRANDÃO, N. L., POSKUS, L.T., GUIMARÃES, J. G., SILVA, E. M. A critical analysis of the degree of conversion of resin-based luting cements. **Journal of Applied Oral Science: revista FOB**, v. 18, n. 5, p. 442-446, 2010.

O'NEIL, T. C. Antibacterial properties of periodontal dressings. **Journal of Periodontology**, v. 46, n. 8, p. 469, 1975.

PASSOS, G. F., FERNANDES, E. S., CUNHA, F. M., FERREIRA, J., PIANOWSKI, L. F., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PERSSON, G., THILANDER, H. Experimental studies of surgical packs. 2. Tissue reaction to various packs. **Odontologisk Tidskrift**, v.76, n.2, p.157-162, 1968.

PETELIN, M., PAVLICA, Z., BATISTA, U., STIBLAR-MARTINCIC, D., SKALERIC, U. Effects of periodontal dressings on fibroblasts and gingival wound healing in dogs. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 52, n. 1, p. 33-46, 2004.

QUISPE-CONDORI, S. , FOGLIO, M. A. , ROSA, P. T. V. , MEIRELES, M. A. A. Obtaining caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 27-32, 2008.

REFSIO, C., BRANDÃO, D. C., BRANDÃO, G. C., KORUKIAN, M., GARCIA, R. J., BONFIGLIOLI, R., NERY, C. A. S., GAMBA, R. Clinical assessment of efficacy and safety from *Cordia verbenacea* standardized extract in tendinitis and chronic facial pain patients. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, n. 1-2, p. 40-46, 2005.

RUBINOFF, C. H., GREENER, E. H. Physical properties of an experimental periodontal dressing material. **Dental Materials**, v. 1, n. 1, p. 3-6, 1985

RUBINOFF, C. H., GREENER, E. H., ROBINSON, P. J. Physical properties of periodontal dressing materials. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 13, n. 6, p. 575-586, 1986.

SERITÉ, J. A. A., BASILE, A. C., PANAZZI, S., OSHIRO, T. T., AZZOLINI, C. P., PENNA, S. C. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: oral and topical anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 239-247, 1991.

SERTIÉ, J. A. A., WOISKY, R. G., WIEZEL, G., RODRIGUES, M. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 338-344, 2005.

SIDERIDOU, I., TSERKI, V., PAPANASTASIOU, G. Study of water sorption, Solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. **Biomaterials**, v.24, n. 4, p. 655-665, 2003.

SIGUSCH, B. W., PFITZNER, A., NIETZSCH, T., GLOCKMANN, E. Periodontal dressing (Vocopac) influences outcomes in a two-step treatment procedure. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 4, p. 401-405, 2005.

SMEEKENS, J. P., MALTHA, J. C., RENGGLI, H. H. Histological evaluation of surgically treated oral tissues after application of a photocuring periodontal dressing material. An animal study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 9, p. 641-645, 1992.

STEENACKERS, B., DE COOMAN, L., DE VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 742-756, 2015.

SU, Y. C., HO, C. L. Composition of the Leaf essential Oil of *Phoebe formosana* from Taiwan and its *in vitro* Cytotoxic, Antibacterial, and Antifungal activities. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 6, p. 845-848, 2016.

SUNZEL, B., SÖDERBERG, T. A., JOHANSSON, A. , HALLMANS, G., GREF, R. The protective effect of zinc on rosin and resin acid toxicity in human polymorphonuclear leukocytes and human gingival fibroblasts *in vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 37, n. 1, p. 20-28, 1997.

TOLEDO, B.E.C., ABI RACHED, R.S.G. Cimento cirúrgico periodontal I: tipos e características. **Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, v. 38, n.2, p. 81-100, 1972.

VON FRAUNHOFER, J. A., ARGYROPOULOS, D. C. Physical properties of a periodontal dressing material. **Am J Dent**, v. 5, n. 5, p. 266-268, 1992.

WARD, A. W. Postoperative care in the treatment of Pyorrhea. **Journal of American dental association**, v. 16, n. 4, p. 635-640, 1929.

WATTS, T. L., COMBE, E. C. Rheological aspects of non-eugenol periodontal dressing materials. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 9, n. , p. 291-300, 1982.

ZHANG, H. , SHEN, Y. , RUSE, N. D. , HAAPASALO, M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontics**, v. 35, n. 7, p. 1051-1055, 2009.

ZHENG, G. Q., KENNEY, P. M., LAM, L. K. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural Products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.