



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**CURSO DE DOUTORADO**

**GÊISA AIANE DE MORAIS SAMPAIO**

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS, MECÂNICAS E**  
**BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS IONOMÉRICOS**  
**MODIFICADOS POR PRÓPOLIS VERMELHA**

**Campina Grande – PB**  
**2018**

**GÊISA AIANE DE MORAIS SAMPAIO**

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS, MECÂNICAS E  
BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS IONOMÉRICOS  
MODIFICADOS POR PRÓPOLIS VERMELHA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Clínica Odontológica.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Pollianna Muniz Alves

**Campina Grande – PB  
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S192p Sampaio, Géisa Aiane de Moraes.  
Propriedades antimicrobianas, mecânicas e  
biocompatibilidade de cimentos ionoméricos modificados por  
própolis vermelha [manuscrito] / Géisa Aiane de Moraes  
Sampaio. - 2018.  
85 p.  
Digitado.  
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual  
da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.  
"Orientação : Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves ,  
Departamento de Odontologia - CCBS."  
1. Atividade antimicrobiana. 2. Cimento de ionômero de  
vidro. 3. Biocompatibilidade. 4. Própolis. I. Título  
21. ed. CDD 617.695

**GÊISA AIANE DE MORAIS SAMPAIO**

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS, MECÂNICAS E BIOCOMPATIBILIDADE  
DE CIMENTOS IONOMÉRICOS MODIFICADOS POR PRÓPOLIS VERMELHA**

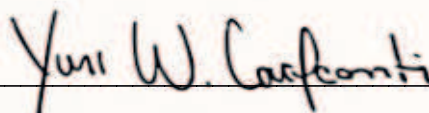
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Odontologia da Universidade Estadual da  
Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutor em Odontologia – Área de  
concentração em Clínica Odontológica.

Aprovada em 11/12/2018

Banca examinadora



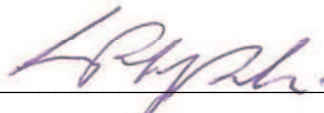
Prof Dr Rogério Lacerda dos Santos  
Examinador – UFJF



Prof Dr Yuri Wanderley Cavalcanti  
Examinador – UFPB



Prof Dr Gustavo Henrique Apolinário Vieira  
Examinador – UEPB



Prof Dr Cassiano Francisco Weege Nonaka  
Examinador – UEPB



Profª Drª Pollianna Muniz Alves  
Orientadora – UEPB



## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antônio e Lourdes, dedico esta e todas as minhas conquistas, pois sem o seu carinho, apoio e incentivo elas não seriam possíveis.

À minha avó Alaide Ramos de Moraes (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, meu senhor e melhor amigo, com quem divido todas as minhas alegrias, angústias e aflições, agradeço pelo dom da vida, pela minha família, por esta oportunidade, por ter abençoado meus caminhos e por me dá força e coragem para enfrentar os desafios cotidianos.

Aos meus pais, Antônio da Silva Sampaio e Maria Lourdes L. de Moraes Sampaio, por todo amor, carinho e dedicação, pela ótima educação que me deram, me ensinando a ser uma pessoa boa, íntegra e dedicada. Obrigado por sempre acreditarem em mim, por nunca terem medido esforços para que meus sonhos pudessem ser realizados, pelo incentivo e apoio nas horas de dificuldade.

Às minhas irmãs Geane e Gírlândia, meu sobrinho Anthony Gustavo, meus avós e toda a minha família, pelo amor, companheirismo, apoio incondicional e por estarem sempre torcendo por mim.

Ao meu marido Allan Charles, que esteve sempre ao meu lado, pelo seu amor, carinho, apoio, paciência e compreensão, por escutar os meus lamentos nos momentos difíceis, por estar sempre ao meu lado e pelo incentivo aos meus projetos profissionais.

À minha orientadora Pollianna Muniz, pela orientação deste e de outros trabalhos, por todo o conhecimento repassado, incentivo, paciência e dedicação. Pela confiança e por ter acreditado no meu potencial. Desejo que Deus continue abençoando você e sua família.

Agradeço a todos os professores que dividiram comigo os seus conhecimentos durante a minha jornada acadêmica, em especial aos professores e coordenação do PPGO-UEPB pela contribuição acadêmica, competência, e dedicação. Agradeço também aos professores componentes da banca examinadora, Cassiano Nonaka, Gustavo Vieira, Rogério Lacerda e Yuri Wanderley pela disponibilidade e contribuição neste trabalho.

Aos meus companheiros de turma, pelo apoio e companheirismo, assim como aos colegas do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, muito obrigada pelo apoio e amizade.

Às técnicas dos laboratórios, Ana Luzia, Denise e Rebeca, pela paciência, dedicação e contribuição neste trabalho.

Aos meus alunos que me proporcionam alegria em ser professora.

A todos os amigos, que compartilharam da minha caminhada e àqueles que mesmo distantes torcem por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa científica.

Finalmente, a todos que fizeram parte desta etapa de minha vida, os meus mais sinceros agradecimentos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> – Composição dos cimentos testados.....	24
<b>Quadro 2</b> - Distribuição das amostras dos testes antimicrobianos, liberação de flúor, resistência à tração diametral, resistência à compressão, resistência de união ao cisalhamento e microdureza de acordo com os cimentos avaliados .....	25
<b>Quadro 3</b> - Distribuição das amostras do estudo laboratorial <i>in vivo</i> de avaliação da biocompatibilidade de acordo com os materiais testados.....	26
<b>Quadro 4</b> - Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.....	31
<b>Figure 1</b> - Composition of the tested cements.....	65
<b>Figure 2</b> - Specificity, clone, manufacturer, dilution, antigen retrieval and incubation time of the primary antibody used in the study.....	65
<b>Figure 3</b> - A-D) Photomicrography, at the period of 7 days, of R25, M50, R50 and control groups, respectively (HE, 100x, scale: 200 µm). E-P) Immunostaining of CD68 at period of 7, 15 and 30 days, respectively (Advaced, 100x, scale 200 µm).....	66

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for cellular viability test with <i>S. mutans</i> (log <sub>10</sub> UFC/mL).....	47
Table 2 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for cellular viability test with <i>C. albicans</i> (log <sub>10</sub> UFC/mL).....	47
Table 3 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for Diametral Tensile Strength (Mpa).....	47
Table 4 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for Compression Strength (Mpa).....	48
Table 5 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for Vickers Microhardness (HV).....	48
Table 6 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between between groups for the Shear Bond Strength (Mpa).....	48
Table 7- ARI scores and mean values presented by groups.....	49
Table 8 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between group for fluoride release test (µg/ml) .....	49

### ARTIGO 2

Table 1 - Mean of the scores attributed to the cements for the morphological analysis, after the intervals of 7, 15 and 30 days.....	68
Table 2 - Immunohistochemical analysis of CD68, after the time intervals of 7, 15 and 30 days.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC** - American Type Culture Collection
- BHI** - Brain Heart Infusion
- C. albicans*** – *Candida albicans*
- CCS** – Centro de Ciências da Saúde
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- CIV** – Cimento de Ionômero de Vidro
- EEP** – Extrato Etanólico de Própolis
- EEPV** – Extrato Etanólico de Própolis Vermelha
- FCM** – Faculdade de Ciências Médicas
- IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1 beta
- IRA** – Índice de Remanescente Adesivo
- LABIO** – Laboratório de Biomateriais
- LSR** – Laboratório de Solidificação Rápida
- MO** – Microrganismo
- MCO** - Macrófagos
- PPGO** – Programa de Pós-Graduação em Odontologia
- S. mutans*** – *Streptococcus mutans*
- RC** – Resistência à Compressão
- RPMI** - Roswell Park Memorial Institute
- TD** – Resistência à Tração Diametral
- TISAB** – Tampão de Ajuste de Força Iônica Total
- TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alfa
- UEPB** – Universidade Estadual da Paraíba
- UFC** – Unidades Formadoras de Colônias
- UFPB** – Universidade Federal da Paraíba
- UNIFACISA** – Centro Universitário UNIFACISA

## RESUMO

**OBJETIVO:** Avaliar atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas, capacidade de liberação de flúor e biocompatibilidade de cimentos de ionômero de vidro (CIV) modificados com extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) em diferentes concentrações.

**METODOLOGIA:** Foram utilizados dois CIV ortodônticos com adição de EEPV em concentrações de 10%, 25% e 50%. Foram realizados testes de viabilidade celular contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, resistência à tração diametral (TD), resistência à compressão (RC), resistência de união ao cisalhamento, microdureza, liberação de flúor e análises morfológica e imunoistoquímica de biocompatibilidade em tecido subcutâneo de ratos. A análise estatística dos testes antimicrobianos, liberação de flúor, TD, RC e microdureza, foi realizada por meio de 2-way ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para o teste de resistência de união ao cisalhamento foi utilizada one-way ANOVA seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para os estudos morfológico e imunoistoquímico foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ). **RESULTADOS:** EEPV em concentrações de 25% e 50% se mostraram como agentes antimicrobianos promissores para adição em CIV contra *C. albicans* ( $P < 0,001$ ) e *S. mutans* ( $P < 0,001$ ). A capacidade de liberação de íons flúor não foi afetada e a adição de 25% de EEPV foi a concentração que menos afetou as propriedades mecânicas dos cimentos ( $P > 0,05$ ). Os cimentos também demonstraram serem biocompatíveis em tecido subcutâneo de ratos. **CONCLUSÃO:** Os cimentos com adição de EEPV 25% demonstraram aumento significativo da capacidade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans*, sem afetar as propriedades mecânicas, a capacidade de liberação de flúor e a biocompatibilidade dos cimentos.

**Palavras-chave:** Cimento de Ionômero de Vidro, Própolis, Antimicrobiano, Biocompatibilidade

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To evaluate the antimicrobial activity, mechanical properties, fluoride release capacity and biocompatibility of glass ionomer cements (GICs) modified to contain the ethanolic extract of red propolis (EERP) at different concentrations. **MATERIAL AND METHODS:** Two orthodontic GICs containing EERP at 10%, 25% and 50%, were used. The following assays were carried out: cell viability tests against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, diametral tensile strength (DTS), compressive strength (CS), shear bond strength, microhardness, fluoride release capacity, and morphological and immunohistochemical biocompatibility analysis in rat subcutaneous tissue. The statistical analysis of the antimicrobial tests, fluoride release, DTS, CS and microhardness was performed using Two-way ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The shear bond strength data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The morphological and immunohistochemical findings were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test ( $p < 0.05$ ). **RESULTS:** At the concentrations of 25% and 50%, EERP was shown to be a promising antimicrobial agent incorporated into GICs against *C. albicans* ( $P < 0.001$ ) and *S. mutans* ( $P < 0.001$ ). The fluoride ion release capacity of the GICs was not affected, and the EERP concentration of 25% was the one that least affected the mechanical properties of the cements ( $P > 0.05$ ). In addition, the experimental cements showed biocompatibility in rat subcutaneous tissue. **CONCLUSION:** The GICs containing EERP at 25% showed a significant increase in their antimicrobial activity against *S. mutans* and *C. albicans*, unaltered mechanical properties, fluoride release capacity and tissue biocompatibility.

**KEY WORDS:** Glass ionomer cement; Propolis; Antimicrobial, Biocompatibility



## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b>	13
1.1 Cimentação de bandas ortodônticas	13
1.2 Cimento de Ionômero de Vidro	13
1.3 Adição de agentes antimicrobianos ao CIV	15
1.4 Atividade Biológica da Própolis Vermelha	15
1.5 Análise das propriedades mecânicas	19
1.6 Testes de biocompatibilidade	20
1.6.1 Avaliação morfológica	20
1.6.2 Avaliação Imunoistoquímica	21
<b>2 OBJETIVOS</b>	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
<b>3 METODOLOGIA</b>	23
3.1 Caracterização do estudo	23
3.2 Considerações éticas	23
3.3 Local do estudo	23
3.4 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis Vermelha	24
3.5 Manipulação dos cimentos	24
3.6 Quantidade de amostras	25
3.7 Critérios de inclusão e exclusão	26
3.8 Análise de atividade antimicrobiana	26
3.9 Testes de resistência à tração diametral e de resistência à compressão	27
3.10 Análise da microdureza	28
3.11 Teste de resistência ao cisalhamento	28
3.12 Análise de liberação de íons flúor	29
3.13 Estudo laboratorial <i>in vivo</i> de avaliação da biocompatibilidade	29
3.14 Estudo morfológico	30
3.15 Estudo imunoistoquímico	30
3.15.1 Análise imunoistoquímica	32
3.16 Análise estatística	33

<b>4 ARTIGO 1</b>	34
Abstract	36
Introduction	37
Materials and Methods	38
Results	41
Discussion	42
Resumo	44
Reference	45
<b>5 ARTIGO 2</b>	51
Abstract	53
Introduction	54
Materials e Methods	55
Results	57
Discussion	58
Conclusion	61
Reference	62
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	70
<b>REFERÊNCIAS</b>	71
<b>ANEXO A – Instruções aos autores Brazilian Dental Journal</b>	79
<b>ANEXO B – Instruções aos autores The Journal Adhesive of Dentistry</b>	84

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1 Cimentação de bandas ortodônticas

Afim de se obter a movimentação dentária e a correção de diversas maloclusões, a terapia ortodôntica utiliza vários acessórios como bráquetes, anéis e fios, para a aplicação de forças sobre os dentes (FARRET *et al.* 2011). Dentre os principais componentes utilizados nessa terapia, as bandas ortodônticas constituem elementos de suporte ao aparelho fixo e desempenham um importante papel na terapia ortodôntica convencional (SFONDRINE *et al.* 2010).

As bandas ortodônticas são confeccionadas a partir de lâminas metálicas de espessura variável, adaptadas e cimentadas à coroa dental de molares e pré-molares. Nelas são soldados acessórios que recebem fios ortodônticos ou outros dispositivos, que, ao formarem um conjunto mecânico, são capazes de liberar forças armazenadas e promover a movimentação dentária (VELLINI-FERREIRA, 2013).

A cimentação de bandas ortodônticas inicialmente era realizada com cimento de fosfato de zinco, no entanto, este material apresentava somente união mecânica ao esmalte e ao metal e apresentava ainda alta solubilidade no meio bucal. Com o surgimento dos Cimentos de Ionômero de Vidro (CIV), eles passaram a ser empregados para a cimentação de peças protéticas, dispositivos e bandas ortodônticas, pois apresentavam várias características desejáveis, como união química ao esmalte e ao aço inoxidável, biocompatibilidade e liberação e absorção contínua de flúor (MILLETT *et al.* 2003; FARRET *et al.* 2011; PRABHAVATH *et al.* 2015).

Essas características são muito importantes para fornecer uma resistência de união adequada entre o dente e a banda e para reduzir a incidência de cárie e doenças periodontais em pacientes ortodônticos, uma vez que, muitos pacientes apresentam dificuldade de higienização devido à grande quantidade de dispositivos e de sítios de acúmulo de biofilme (SFONDRINE *et al.* 2010; FARRET *et al.* 2012; PRABHAVATH *et al.* 2015).

### 1.2 Cimento de ionômero de vidro

O CIV é composto de um pó de vidro íon lixiviável e um poliácido líquido que são misturados em uma proporção pré-determinada. O pó é preparado a partir de um vidro de alumínio e silicato e serve como fonte de íons para as reações do cimento (BAIG; FLEMING,

2015). O mesmo foi desenvolvido e patenteado no final da década de 1960 por Alan Wilson e colaboradores como uma alternativa para substituição dos cimentos de silicato (WILSON; BATCHELOR, 1967; WILSON; KENT, 1971). O ácido fosfórico foi então substituído por um ácido orgânico menos agressivo, o ácido poliacrílico, que também era utilizado nos cimentos de policarboxilato de zinco (ATKINSON; PEARSON, 1985).

A configuração destes cimentos envolve a neutralização do poliácido pelo vidro, com a formação de unidades de poliacrilato metálico. Esta reação essencial levou estes materiais a serem classificados como cimentos de reação ácido-base (NICHOLSON, 1998)

Embora os primeiros CIV tivessem propriedades físicas pobres, as suas propriedades de adesão à estrutura dental e liberação de íons fluoreto asseguraram a sua popularidade e incentivaram o desenvolvimento de CIV com propriedades físicas melhores (SHAHID *et al.* 2014). Uma grande variedade comercial de CIV estão disponíveis para o cirurgião dentista e devido a variações na proporção pó/líquido e na viscosidade do material, estes cimentos possuem várias aplicações clínicas, como agentes de cimentação, bases cavitárias, restauração de dentes anteriores e posteriores, entre outras (BAIG; FLEMING, 2015).

Algumas desvantagens dos CIV convencionais que podem comprometer seu desempenho mecânico, como a susceptibilidade à umidade durante a reação de presa inicial, motivaram o desenvolvimento dos CIV modificados por resina, que tem a reação de geleificação ácido-base complementada por uma reação física pela adição de monômeros resinosos, reduzindo o tempo do processo e consequentemente a exposição à umidade (FARRET *et al.* 2012).

Considera-se que as propriedades cariostáticas do CIV se devem principalmente à incorporação na estrutura dental do fluoreto libertado pelo cimento, a remineralização dentária, tornando-a mais resistente ao ataque ácido bacteriano (MOURA; SIMPLÍCIO; CURY, 2006; NAKAJO *et al.* 2009; ENAN; HAMMAD, 2013). A liberação de flúor a partir desses materiais durante a formação do biofilme permite que o cimento desempenhe um papel importante na diminuição da virulência de biofilmes cariogênicos (CHAU *et al.* 2015). As propriedades antimicrobianas dos CIV também são atribuídas ao efeito inibitório, em curto prazo, que esses cimentos possuem sobre a queda do pH e a taxa de produção de ácidos por *Streptococcus* orais (NAKAJO *et al.* 2009; BENGTON *et al.* 2013; KLAU *et al.* 2014; FÚCIO *et al.* 2016).

Outra propriedade importante dos CIV ortodônticos é a sua biocompatibilidade, pois a presença de materiais cimentantes irritantes pode causar reações inflamatórias no tecido gengival subjacente às bandas ortodônticas. Os CIV têm se mostrado biocompatíveis sobre fibroblastos gengivais humanos (RODRIGUEZ *et al.* 2013), fibroblastos L929 de

camundongos, uma linhagem de células frequentemente utilizada para avaliação de citotoxicidade de materiais odontológicos (DOS SANTOS *et al.* 2012) e em tecido subcutâneo de ratos, que é o método mais comumente utilizado para testes de avaliação de biocompatibilidade *in vivo* de biomateriais (SANTOS *et al.* 2014).

### 1.3 Adição de agentes antimicrobianos ao CIV

Com o objetivo de melhorar as propriedades antimicrobianas do CIV, agentes antimicrobianos têm sido adicionados a sua composição, uma vez que, a liberação contínua desses agentes contribui para a diminuição no número de bactérias próximas ao material, dificultando a formação de lesões cariosas (TURKUN *et al.* 2008; YESILYURT *et al.* 2009; AHLUWALIA; CHOPRA; THOMAS, 2012; CASTILHO *et al.* 2013; HOOK *et al.* 2014; MARTI *et al.* 2014; SAMPAIO 2015; HAFSHEJANI *et al.* 2017).

Vários tipos de materiais orgânicos e inorgânicos podem ser adicionados ao CIV para aumentar sua atividade antimicrobiana, no entanto, a adição do extrato etanólico de própolis (EEP) apresenta-se como uma estratégia inovadora de incorporação de agentes antimicrobianos de liberação controlada ao CIV (HAFSHEJANI *et al.* 2017). Estudos recentes avaliaram o efeito antibacteriano de CIV contendo EEP e verificaram que a adição da própolis aumentou de forma significativa o efeito antibacteriano do material (TOPCUOGLU *et al.* 2012; HATUNOGLU *et al.* 2014; ELGAMILY *et al.* 2018).

O *Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico, presente no biofilme da cárie dentária (KLAI *et al.* 2014). Por esse motivo, testes com *S. mutans* tem sido utilizados para mensuração do efeito antibacteriano de CIV contendo agentes antimicrobianos (FRENCKEN *et al.* 2007; FARRET *et al.* 2011; TUZUNER *et al.* 2011; LEWINSTEIN *et al.* 2012; TOPCUOGLU *et al.* 2012; HATUNOGLU *et al.* 2014; MARTI *et al.* 2014; DUQUE *et al.* 2017; MISHA; PANDEY; MANICKAM 2017; ELGAMILY *et al.* 2018). A *Candida albicans* é um agente fúngico muito comum na cavidade oral e também vem sendo utilizada para avaliação do efeito antimicrobiano destes cimentos (TURKUN *et al.*, 2008; DUQUE *et al.* 2017).

### 1.4 Atividade Biológica da Própolis Vermelha

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas, principalmente de folhas, flores e caules, de muitas espécies de árvores. Este material é transportado para a colmeia e

misturado com cera de abelha, produzindo uma substância fortemente adesiva. Esta resina é utilizada na proteção da colmeia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (DAS NEVES *et al.* 2016; BANKOVA, POPOVA & TRUSHEVA, 2016; ANDRADE *et al.* 2017).

Comprovações científicas relativas à prevenção de doenças têm exacerbado o interesse pelo uso terapêutico da própolis, devido as suas várias propriedades biológicas, tais como ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e cicatrizante (OLIVEIRA *et al.* 2006; DUAILIBE; GONCALVES; AHID, 2007; NUNES *et al.* 2009; BATISTA *et al.* 2012; HEGDE *et al.* 2013; GRENHO *et al.* 2015)

Embora a própolis seja considerada uma mistura complexa, as suas atividades biológicas são relatadas, principalmente, devido à presença de flavonóides, ácidos e éteres fenólicos na sua composição (MACHADO *et al.* 2016). No entanto, a sua composição química e atividade farmacológica podem variar amplamente de região para região (ALENCAR *et al.* 2007).

Park; Alencar; Aguiar (2002) classificaram amostras de própolis coletadas de diferentes regiões de todo o Brasil em 12 grupos, de acordo com a aparência e cor dos extratos. Entretanto, uma nova própolis foi encontrada em colmeias situadas ao longo da costa e mangues no Nordeste brasileiro, classificada como própolis do grupo 13. Esta própolis é chamada própolis vermelha, com origem botânica da *Dalbergia ecastophyllum* (DAUGSCH *et al.* 2008; DAS NEVES *et al.* 2016; MACHADO *et al.* 2016; ANDRADE *et al.* 2017). Apesar de ainda ser pouco explorada, a própolis vermelha apresenta bons resultados de atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (ALENCAR *et al.* 2007; DAUGSCH *et al.* 2008; NUNES *et al.* 2009; MACHADO *et al.* 2016; MARTINS *et al.* 2018).

Na última década, a composição química da própolis vermelha brasileira tem sido revelada e relacionada às suas propriedades bioativas. Os principais componentes químicos encontrados neste tipo de própolis são classificados em flavonoides, terpenos, ácidos aromáticos e ácidos graxos (ALENCAR *et al.* 2007; MENDONÇA *et al.* 2015; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016; RUFANO *et al.* 2017; DO NASCIMENTO *et al.* 2018; SENA-LOPES *et al.* 2018).

Os flavonóides representam o grupo fenólico mais comum e amplamente distribuído na própolis vermelha. Estes estão entre os compostos mais ativos nesta resina atuando em diferentes processos e executando várias funções, incluindo ação antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, além de efeitos inibitórios sobre células cancerosas (KOLE *et al.* 2011; RUFANO *et al.* 2017).

Os terpenos, também presentes na composição da própolis vermelha, são uma classe grande e diversificada de compostos voláteis que são usados na indústria de perfumaria, bem como em aditivos alimentares. Entretanto, eles também possuem uma ampla gama de atividade biológica, incluindo analgésica, anti-inflamatória, efeitos quimiopreventivos do câncer e atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antiparasitária (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JUNIOR, 2014; RUFANO *et al.* 2017).

O mecanismo de atividade antimicrobiana da própolis é complexo e pode ser atribuído à presença de vários compostos bioativos, particularmente os isoflavonoides (BISPO JUNIOR *et al.* 2012; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). A própolis vermelha tem demonstrado efeito antimicrobiano sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* (ALENCAR *et al.* 2007; BISPO JUNIOR *et al.* 2012; REGUEIRA NETO *et al.* 2017; SILVA *et al.* 2017; DO NASCIMENTO *et al.* 2018) e *Pseudomonas aeruginosa* (BISPO JUNIOR *et al.* 2012; REGUEIRA NETO *et al.* 2017; DO NASCIMENTO *et al.* 2018), porém algumas espécies bacterianas, como a *Escherichia coli*, mostram-se resistentes (BISPO JUNIOR *et al.* 2012; SILVA *et al.* 2017).

A própolis vermelha apresenta também boas perspectivas de eficácia anticárie para uso clínico (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016; MARTINS *et al.* 2018). Aplicações tópicas contendo neovestitol e vestitol, isolados da própolis vermelha, prejudicaram o acúmulo de biofilmes de *S. mutans* e mostram-se tão eficazes quanto o flúor na redução do desenvolvimento de lesões cariosas (BUENO-SILVA *et al.* 2013a). O EEPV também mostra-se eficaz na redução da colonização de *S. mutans*, diminuição da concentração de polissacarídeos extracelulares e na redução da desmineralização do esmalte dentário (MARTINS *et al.* 2018).

A atividade da própolis vermelha contra fungos também tem sido descrita em alguns estudos. Frações de própolis vermelha tem apresentado excelente atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (BISPO JUNIOR *et al.* 2012) e uma ação antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) foi observada sobre cepas de *C. albicans* e *Candida tropicalis* (DAS NEVES *et al.* 2016).

A *Candida parapsilosis* e a *Candida glabrata* não demonstraram capacidade de desenvolver resistência fenotípica frente a um benzofeno rico em frações de própolis vermelha. Também foi observado um sinergismo da própolis vermelha quando em combinação com o fluconazol, sugerindo que a mesma poderia ser uma possível estratégia terapêutica para o tratamento de infecções relacionadas a *Candida* spp resistentes ao fluconazol (PIPI *et al.* 2015). A isoflavona formononetina foi identificada como um dos principais componentes envolvidos na ação antifúngica da própolis vermelha (DAS NEVES *et al.* 2016).



As propriedades anti-inflamatórias da própolis e seus derivados estão sendo estudados em diferentes modelos de inflamação (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). A própolis vermelha tem apresentado efeitos anti-inflamatórios na atividade macrofágica, reduzindo os níveis de óxido nítrico e diminuindo a liberação de citocinas e a expressão de genes pró-inflamatórios (BUENO-SILVA *et al.* 2017a). O neovestitol, isolado da própolis vermelha, tem demonstrado ser um dos principais componentes responsáveis por essa atividade anti-inflamatória, tanto na inflamação aguda quanto na crônica (FRANCHIN *et al.* 2016; BUENO-SILVA *et al.* 2017b).

Observou-se também uma importante atividade de inibição contra a migração de neutrófilos causada pelo EEPV, neovestitol e vestitol em camundongos (BUENO-SILVA *et al.* 2013b). Objetivando elucidar as principais vias de ação da própolis vermelha brasileira na modulação da migração de neutrófilos durante o processo inflamatório, verificou-se que a própolis vermelha parece reduzir o rolamento e a adesão de leucócitos, a liberação TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1 / KC e CXCL2 / MIP-2, a quimiotaxia de neutrófilos induzida por CXCL2/MIP-2 e o influxo de cálcio (BUENO-SILVA *et al.* 2016).

Observou-se também que a própolis vermelha possui a capacidade de inibir múltiplas vias de sinalização em macrófagos envolvidos no processo inflamatório ativado por lipopolissacarídeos, indicando que a própolis vermelha é uma fonte de alimento notável para a descoberta de novos compostos bioativos e um potencial candidato a atenuar doenças inflamatórias exacerbadas (BUENO-SILVA *et al.* 2015).

Estudos tem relatado também uma capacidade de ação antioxidante da própolis vermelha (MENDONÇA *et al.* 2015; ANDRADE *et al.* 2017; SILVA *et al.* 2017; DO NASCIMENTO *et al.* 2018), uma vez que a mesma contém uma extensa gama de compostos antioxidantes que interagem com os radicais livres no organismo (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016; RUFANO *et al.* 2017). Suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória são as prováveis responsáveis também pela atividade fotoprotetora de formulações de aplicação tópica contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha observada em um modelo animal *in vivo* (BATISTA *et al.* 2018).

Um crescente número de publicações tem destacado também as propriedades antiproliferativas da própolis vermelha brasileira. Esses estudos são baseados em ensaios citotóxicos *in vitro* contra uma ampla gama de células tumorais, revelando o seu potencial no desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos (ALENCAR *et al.* 2007; FRANCHI *et al.* 2012; KAMIYA *et al.* 2012; BEGNINI *et al.* 2014; MENDONÇA *et al.* 2015; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016; NANI *et al.* 2017).



Em relação ao método de extração, a extração etanólica tem sido relatada como o método mais eficiente para a obtenção de extratos com o maior teor de compostos antioxidantes e atividade biológica (MACHADO *et al.* 2016).

### 1.5 Análise das propriedades mecânicas

Através da análise das propriedades mecânicas de diferentes materiais dentários, pode-se inferir que material está mais adequado para executar funções clínicas, resistindo às forças mastigatórias, desgaste e aplicação de forças ortodônticas. A análise da resistência à compressão, resistência à tração diametral e microdureza são essenciais para verificação e comparação das propriedades de diferentes materiais dentários. Além disso, sempre que possível, é interessante associar um teste, como resistência de união ao cisalhamento, para simular o tratamento ortodôntico e para verificar o desempenho de um material sob condições semelhantes ao ambiente bucal (FARRET *et al.* 2012).

Um agente antibacteriano, quando adicionado a um CIV, é considerado uma alternativa de sucesso quando as propriedades mecânicas e biológicas do cimento não são afetadas. Por esse motivo, são necessárias análises das propriedades mecânicas de cimentos contendo agentes antimicrobianos, para que não ocorra o comprometimento das suas principais características (TUZUNER *et al.* 2011; DEEPALAKSHMI *et al.* 2010; MARTI *et al.* 2014; BECCI *et al.* 2014).

Estudos verificaram que a adição de EEP verde alterou de forma negativa as propriedades de solubilidade, absorção de água, resistência à tração diametral e resistência à compressão de CIVs restauradores (TROCA *et al.* 2011; SUBRAMANIAM *et al.* 2016) porém, a adição de EEP amarela não afetou a resistência de união ao cisalhamento dos cimentos (PRABHAKAR; BALEHOSUR; BASSAPAR, 2016).

Observou-se também que a adição de EEP amarela a um CIV convencional, nas concentrações de 10%, 25% e 50%, aumentou a microdureza Vickers do material e não afetou a sua microinfiltração (ALTUNSOY *et al.* 2016). Além disso, a adição de EEP amarela mostrou-se capaz de aumentar a capacidade de liberação de flúor de CIVs restauradores (PRABHAKAR; BALEHOSUR; BASSAPAR 2016; ELGAMILY *et al.* 2018).

## 1.6 Testes de biocompatibilidade

A biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial de executar a sua função, no que diz respeito a uma terapia odontológica, sem provocar quaisquer efeitos indesejáveis, locais ou sistêmicos, ao paciente (GONÇALVES *et al.* 2014).

Estudos em tecido subcutâneo de ratos tem sido o método mais comumente utilizado para avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais *in vivo*. Esses animais são muito utilizados pelo fato de serem mamíferos de manuseio fácil e seguro, além de possuírem um metabolismo mais acelerado quando comparado a outros animais, o que permite obter resultados relevantes em um curto período de tempo (GARCIA *et al.* 2010; SANTOS *et al.* 2014). Embora essa metodologia não reproduza com fidelidade as condições bucais, ela fornece informações preliminares sobre as propriedades biológicas dos materiais (BOAVENTURA *et al.* 2012).

### 1.6.1 Avaliação morfológica

A inflamação é uma resposta fisiopatológica decorrente de fatores químicos, físicos ou biológicos; dentre estes, os biomateriais podem ser considerados agentes químicos capazes de desencadear reações inflamatórias e imunológicas nos tecidos circunjacentes (IBRAGUIMOV *et al.* 2012).

No momento em que o agente químico é detectado, neutrófilos migram para o tecido inflamado e através de quimiocinas inflamatórias liberadas, emitem sinais para o recrutamento de monócitos para os tecidos circundantes e em direção a superfície dos biomateriais (IBRAGUIMOV *et al.* 2012). Os monócitos, ao migrarem pela circulação e extravasarem para o tecido, se diferenciam em macrófagos (MCO) ou em células dendríticas, os quais são responsáveis por potencializar a resposta pró-inflamatória (MURRAY; WYNN, 2012). Os MCO atuam na apresentação de antígenos, fagocitose de restos celulares e recrutamento de outros tipos de células, tais como fibroblastos (IBRAGUIMOV *et al.* 2012).

A análise da resposta inflamatória nos testes de biocompatibilidade é comumente realizada por métodos histológicos, nos quais uma reação inflamatória mais intensa é observada na presença de materiais irritantes ou menos compatíveis (BOAVENTURA *et al.* 2012) e esta metodologia vem sendo comumente utilizada em análises da biocompatibilidade de materiais odontológicos (SANTOS *et al.* 2014; SAMPAIO, 2015; LACERDA-SANTOS *et al.* 2016a; LACERDA-SANTOS *et al.* 2016b; MESQUITA *et al.* 2017).

### 1.6.2 Avaliação Imunoistoquímica

A quantificação dos MCO recrutados é uma forma de avaliação da intensidade da resposta inflamatória decorrente da ação dos biomateriais, uma vez que essas reações são caracterizadas por um acúmulo substancial de fagócitos (ZHOU *et al.* 2011; IBRAGUIMOV *et al.* 2012). Porém, embora os elevados níveis de MO presentes na inflamação sejam tipicamente observados através de análises histológicas, critérios quantitativos precisos dificilmente podem ser definidos por esse método (MANOLEA *et al.* 2009; ZHOU *et al.* 2011).

A imunoistoquímica é um método que se destaca pela possibilidade de oferecer análises quantitativas de estruturas identificáveis (MANOLEA *et al.* 2009). Essa técnica é utilizada na busca de antígenos em células ou tecidos, que vão desde aminoácidos e proteínas até agentes infecciosos e populações específicas (MATOS *et al.* 2010). Esse método é uma ferramenta valiosa para a identificação e visualização de antígenos de tecidos na pesquisa biológica e diagnósticos clínicos, uma vez que ela pode caracterizar vários processos biológicos ou patológicos, tais como cicatrização de feridas, resposta imune, rejeição de tecidos e interações entre o tecido e o biomaterial (AIKAWA, 2011).

A imunoistoquímica abrange muitos métodos usados para determinar constituintes teciduais (os antígenos) com o emprego de anticorpos específicos. Os métodos que utilizam enzimas como substâncias propiciadoras da visualização do antígeno são os mais utilizados atualmente, pois permitem a visualização em microscópio ótico comum e possuem como principal vantagem a visualização da estrutura geral do tecido em simultâneo com a marcação imunoistoquímica (MATOS *et al.* 2010).

O antígeno CD68 é uma glicoproteína expressa principalmente como uma molécula intracitoplasmática associado com grânulos lisossomais, por isso o anticorpo anti-CD68 é considerado como um marcador seletivo para monócitos e macrófagos (MANOLEA *et al.* 2009). O anticorpo anti-CD68 pode, assim, ser considerado um importante indicador da intensidade da resposta inflamatória decorrente de biomateriais, uma vez que expressa fortemente os macrófagos presentes nesse tipo de reação (YAMANAKA *et al.* 2011).

Estudos tem utilizado o anticorpo anti-CD68 como marcador para análise da biocompatibilidade de CIVs utilizados para cimentação ortodôntica (ALMEIDA MESQUITA *et al.* 2017), bem como para avaliar a biocompatibilidade de cimentos ionoméricos ortodônticos contendo agentes antimicrobianos (SAMPAIO 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano, bem como, as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade de cimentos de ionômero de vidro ortodônticos contendo extrato etanólico de própolis vermelha, em diferentes concentrações.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano, contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, de CIVs convencionais e contendo EEPV nas concentrações de 10%, 25% e 50%, através de mensurações da viabilidade celular.

- Avaliar *in vitro* as propriedades mecânicas de resistência à tração diametral, resistência à compressão, resistência de união ao cisalhamento, microdureza e liberação de íons flúor de CIVs convencionais e contendo EEPV nas concentrações de 10%, 25% e 50%.

- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* de CIVs convencionais e contendo EEPV nas concentrações de 10%, 25% e 50%, através de uma análise morfológica das seguintes alterações teciduais: edema, necrose, resposta inflamatória, células gigantes multinucleadas, reação de granulação, fibroblastos e fibras colágenas, nos períodos de 7, 15 e 30 dias.

- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* de CIVs convencionais e contendo EEPV nas concentrações de 10%, 25% e 50%, através de uma análise imunoistoquímica, utilizando o anticorpo anti-CD68 para a quantificação de macrófagos, em três diferentes tempos (7, 15 e 30 dias).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Caracterização do estudo

Caracteriza-se como um estudo laboratorial, consistindo em uma avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano, das propriedades mecânicas e liberação de flúor, assim como uma avaliação *in vivo*, histopatológica e imunoistoquímica, em tecido subcutâneo de ratos, da biocompatibilidade de CIVs contendo EEPV, através de uma análise descritiva semiquantitativa e quantitativa, respectivamente, com comparação entre os grupos.

#### 3.2 Considerações éticas

O experimento animal foi encaminhado para o comitê de ética em pesquisa animal das Faculdades de Ciências Médicas do Centro Universitário UNIFACISA (FCM/UNIFACISA). A pesquisa foi iniciada somente após aprovação pelo Comitê de Ética (protocolo CEUA/082011), respeitando a lei 11.794/2008 que regulamenta pesquisas utilizando animais. O estudo também buscou a autorização das instituições envolvidas (UEPB, FCM/UNIFACISA, UFPB).

#### 3.3 Local do estudo

As análises do efeito antimicrobiano foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (PPGO/UEPB), Campina Grande – PB, e no Laboratório de Microbiologia Oral do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

As avaliações das propriedades mecânicas de resistência à tração diametral, resistência à compressão e resistência de união ao cisalhamento, foram realizadas no laboratório de Biomateriais (LABIO) do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (PPGO/UFPB), João Pessoa - PB, e de microdureza, no Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CT/UFPB), João Pessoa - PB. A análise de liberação de flúor foi realizada no Laboratório de Microbiologia Oral do CCS/UFPB, João Pessoa - PB.

A etapa laboratorial *in vivo* para avaliação da biocompatibilidade dos materiais foi realizada no biotério da FCM/UNIFACISA, Campina Grande-PB, onde foi realizada a seleção dos animais, a inserção dos materiais no tecido subcutâneo, o acompanhamento durante o

período previamente estabelecido, o sacrifício dos animais e a biópsia do tecido a ser avaliado. O estudo morfológico dos tecidos foi realizado no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB e a análise imunoistoquímica no Laboratório de Imunoistoquímica do PPGO/UEPB, Campina Grande – PB.

### 3.4 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis Vermelha

O presente estudo utilizou o EEPV, oriunda do litoral da Paraíba (João Pessoa, Paraíba, Brasil), obtido a partir da própolis vermelha bruta. Para cada 25 g de própolis, esta foi dissolvida em 250 mL de solução hidroalcoólica à 80% (vol/vol). O extrato foi então filtrado duas vezes em papel filtro para retirada do excesso de cera. Em seguida, o EEPV foi preparado nas concentrações de 10%, 25% e 50% em solução hidroalcoólica à 80%, e acondicionado em frasco de vidro âmbar, à temperatura ambiente (HATUNOGLU *et al.* 2014).

### 3.5 Manipulação dos cimentos

Para os grupos controle, os CIV utilizados neste estudo (Meron® e Riva®) foram manipulados segundo as instruções dos fabricantes (Quadro 1). Para os grupos testes, as soluções de EEPV nas concentrações de 10%, 25% e 50% foram incorporadas ao líquido dos cimentos durante a sua manipulação em uma proporção de uma gota do líquido (ácido tartárico) para uma gota da solução de EEPV, utilizando o mesmo bico dosador, posteriormente espaturado com o pó do cimento para a obtenção de um material sólido (FARRET *et al.* 2011).

**Quadro 1** – Composição dos cimentos testados

CIVs	Composição	Fabricante	Lote
<b>Meron®</b>	Pó: Vidro de fluorsilicato de alumínio, ácido poliacrílico e pigmentos Líquido: Solução de ácido tartárico.	VOCO, Cuxhaven, Alemanha	1627583
<b>Riva®</b>	Pó: Fluoreto de silicato de alumínio, ácido poliacrílico. Líquido: Solução de ácido tartárico.	SDI, Bayswater, Austrália	150212

As amostras foram assim distribuídas em oito grupos: Grupo MC (Meron® Controle), Grupo M10 (Meron® com EEPV à 10%), Grupo M25 (Meron®, com EEPV à 25%), Grupo M50 (Meron® com EEPV à 50%), Grupo RC (Riva® Controle), Grupo R10 (Riva® com EEPV à 10%), Grupo R25 (Riva®, com EEPV à 25%) e Grupo R50 (Riva® com EEPV à 50%).

### 3.6 Quantidade de amostras

Para os testes de atividade antimicrobiana foram preparados 24 espécimes (n=3) para cada teste (antibacteriano e antifúngico). Para análise de liberação de flúor também foram confeccionados 24 espécimes (n=3). Para as análises das propriedades mecânicas de resistência à tração diametral, resistência à compressão e resistência de união ao cisalhamento foram confeccionados 80 espécimes (n=10) para cada teste, e para o ensaio de microdureza 40 espécimes (n=5) (Quadro 2).

**Quadro 2** - Distribuição das amostras dos testes antimicrobianos, liberação de flúor, resistência à tração diametral, resistência à compressão, resistência de união ao cisalhamento e microdureza de acordo com os cimentos avaliados.

Grupos	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	Flúor	Tração	Compressão	Cisalhamento	Microdureza
MC	3	3	3	10	10	10	5
M10	3	3	3	10	10	10	5
M25	3	3	3	10	10	10	5
M50	3	3	3	10	10	10	5
RC	3	3	3	10	10	10	5
R10	3	3	3	10	10	10	5
R25	3	3	3	10	10	10	5
R50	3	3	3	10	10	10	5
<b>TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>40</b>

Para o estudo laboratorial *in vivo* de avaliação da biocompatibilidade, a população foi constituída de 108 ratos Wistar machos adultos com peso entre 200g e 300g, distribuídos em nove grupos, sendo dois grupos controles dos cimentos, seis grupos dos cimentos manipulados com EEPV nas concentrações utilizadas (como descritos anteriormente), e um grupo controle com o tubo de polietileno vazio (Grupo C), com o objetivo de avaliação do efeito inflamatório causado pelo tubo. Cada grupo consistiu de 4 ratos para cada um dos períodos de acompanhamento (7, 15 e 30 dias). Cada rato recebeu um implante do cimento a ser analisado e o material biopsiado foi seccionado na região mediana, totalizando 216 amostras de tecidos para análise (Quadro 3).

O estudo foi duplo-cego, cada material foi direcionado aos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX de forma que examinador e orientador não tinham conhecimento de quais materiais foram implantados em cada grupo.



**Quadro 3** - Distribuição das amostras do estudo laboratorial *in vivo* de avaliação da biocompatibilidade de acordo com os materiais testados.

Grupos	Quantidade de ratos			Total	Amostras de tecido			Total
	7 dias	15 Dias	30 Dias		7 dias	15 dias	30 dias	
C	4	4	4	12	8	8	8	24
MC	4	4	4	12	8	8	8	24
M10	4	4	4	12	8	8	8	24
M25	4	4	4	12	8	8	8	24
M50	4	4	4	12	8	8	8	24
RC	4	4	4	12	8	8	8	24
R10	4	4	4	12	8	8	8	24
R25	4	4	4	12	8	8	8	24
R50	4	4	4	12	8	8	8	24
<b>Total</b>	36	36	36	108	72	72	72	216

### 3.7 Critérios de inclusão e exclusão

Para os testes de atividade antimicrobiana, liberação de flúor, microdureza, resistência à tração diametral e resistência à compressão foram descartados os espécimes que apresentaram imperfeições em sua superfície. Para o teste de resistência de união ao cisalhamento foram excluídos os dentes que apresentaram fraturas, sulcos profundos e manchas na superfície do esmalte (FARRET *et al.* 2011).

Foram incluídos no estudo de biocompatibilidade ratos machos Wistar adultos com peso entre 200 e 300g pertencentes ao Biotério da FCM/UNIFACISA. Foram excluídos os ratos que não estavam no peso apropriado durante a inserção dos cimentos. Os materiais biológicos provenientes das biópsias excisionais que não apresentaram quantidade ou qualidade suficiente para a realização das análises morfológica e imunoistoquímica também foram excluídos do estudo (SANTOS *et al.* 2014).

### 3.8 Análise de atividade antimicrobiana

Suspensões de *S. mutans* (ATCC 25175) foram estabelecidas em densidade equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC-*S.mutans*/mL e as suspensões de *C. albicans* (ATCC 90028) foram estabelecidas em densidade equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC-*Candida*/mL. O inoculo dos microrganismos foi determinado com o auxílio de um espectrofotômetro.



Os espécimes dos cimentos ( $n=3$  por microrganismo) foram preparados através da inserção do material em moldes de silicone (10 mm de diâmetro X 5 mm de altura) e remoção após tempo de presa inicial (5 min).

Para a análise antibacteriana, os espécimes foram posicionados horizontalmente em uma placa de 24 poços e, em cada poço, biofilmes de *S. mutans* foram formados a partir da mistura de 0,2 mL do inóculo dos microrganismos em 1,8 mL de meio BHI suplementado com 1% de sacarose (Merck & Co, NJ) e incubados a 37°C, por 24 h, em aerobiose. Os biofilmes foram coletados, após 24 h, por meio da transferência dos espécimes para tubos de polipropileno contendo 2 mL de solução salina e submetidos a agitação vigorosa no vórtex por 60 s para obtenção de suspensões dos biofilmes. As suspensões foram diluídas de maneira decimal seriada, em concentrações que variam de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Essas diluições foram semeadas em placas de ágar BHI, utilizando-se o método da gota. As placas foram então incubadas a 37°C, em aerobiose, por 24 h. A contagem de microrganismos viáveis foi realizada na diluição onde houve crescimento entre 6 e 60 colônias.

Para a análise antifúngica, os espécimes foram posicionados horizontalmente em uma placa de 24 poços e, em cada poço, biofilmes de *C. albicans* foram formados a partir da mistura de 0,2 mL do inóculo dos microrganismos em 1,8 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 100 mM de glicose (Merck KGaA, Germany) e incubados a 37°C, por 24 h. Os biofilmes foram coletados, após 24 h, por meio da transferência dos espécimes para tubos de polipropileno contendo 2 mL de solução salina e submetidos a agitação vigorosa no vórtex por 60 s para obtenção de suspensões dos biofilmes. As suspensões foram diluídas de maneira decimal seriada, em concentrações que variam de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Essas diluições foram semeadas em placas de Agar Sabouraud Dextrose, utilizando-se o método da gota. As placas foram então incubadas a 37°C, por 24 h. A contagem de microrganismos viáveis foi realizada na diluição onde houve crescimento entre 6 e 60 colônias.

### 3.9 Testes de resistência à tração diametral e de resistência à compressão

Para os testes de resistência à tração diametral (TD) e de resistência à compressão (RC) os espécimes foram preparados através da inserção do material em moldes cilíndricos de silicona (6 mm de diâmetro  $\times$  3 mm de altura para TD e 4 mm de diâmetro  $\times$  8 mm de altura para RC). Após a inserção do material, uma tira de poliéster foi colocada sobre a superfície superior e uma placa de vidro foi pressionada manualmente para se obter uma superfície regular do espécime. Depois de 5 min (tempo de presa inicial), os espécimes foram armazenados a 37

°C em 100% de umidade por 24 h e suas dimensões foram medidas com um paquímetro digital (Mitutoyo, IL).

Os ensaios mecânicos foram realizados em uma máquina universal de ensaios Instron 3365® (Instron Corporation, USA), com célula de carga de 5 Kg e velocidade de 0,5 mm/min. A carga foi aplicada ao longo do diâmetro do espécime e a força máxima antes da ruptura foi registrada. Em seguida, as equações subsequentes foram aplicadas a cada espécime para se obter os resultados dos testes de TD e RC, sendo,  $TD = 2F / \pi dt$  e  $RC = 4F / \pi d^2$ , em que F é a carga de ruptura, d é o diâmetro e t a altura dos espécimes (FARRET *et al.* 2011).

### 3.10 Análise de microdureza

Para os testes de microdureza, os espécimes foram preparados através da inserção do material em moldes cilíndricos de silicona (6 mm de diâmetro × 3 mm de altura) seguindo os mesmos procedimentos para a manipulação, inserção e cura anteriormente descritos, seguidos de polimento da superfície dos espécimes utilizando uma lixa 200 em politriz metalográfica (Aerotec, Cotia, SP, Brasil). As medições de microdureza Vickers foram realizadas utilizando um microdurômetro HMV® (Shimadzu Corporation, Japão) com 200g de carga ao longo de 15 s. Em cada espécime, foram realizados três entalhes equidistantes, obtendo-se 15 medições por grupo (FARRET *et al.* 2011).

### 3.11 Teste de resistência de união ao cisalhamento

Para o teste de resistência de união ao cisalhamento foram utilizados 80 incisivos bovinos, mantidos em solução de timol a 0,1% até o momento do experimento. Os dentes foram segmentados utilizando um disco diamantado (KG Sorensen, Brasil) acoplado a uma peça reta de baixa rotação ao redor do terço cervical das raízes e no terço incisal da coroa. Cada dente foi então posicionado horizontalmente em matrizes cilíndricas de tubos de PVC (20 mm de diâmetro x 10 mm de altura) e fixados com resina acrílica (VIPIFlash, Brasil). As superfícies vestibulares foram polidas com taça de borracha (KG Sorensen, Brasil), e pedra-pomes (S.S. White, Brasil) em baixa rotação por 10 s, lavadas e secas, pelo mesmo tempo.

Matrizes metálicas (n=80) para bandas ortodônticas (Morelli, Brasil) foram cortadas (5 mm de altura x 10 mm de comprimento) e braquêtes metálicos (Morelli, Brasil) foram soldados sobre elas, utilizando uma máquina de solda à ponto (Kernit, Idaiatuba, SP, Brasil). Os CIVs foram manipulados e cada matriz foi cimentada no centro da superfície vestibular do dente.

Após 5 min de tempo de presa inicial, os espécimes foram armazenados a 37°C em 100% de humidade durante 24 h. Os testes foram realizados em uma máquina universal de ensaios Instron 3365® (Instron Corporation, USA), usando uma matriz com um cinzel de carga de 5 Kg a uma velocidade de 1 mm/min. Os resultados foram obtidos em N e divididos pela área da base do braquete, fornecendo resultados em Mpa (FARRET *et al.* 2011).

Após a realização do ensaio, a superfície vestibular de cada corpo de prova foi avaliada em lupa estereoscópica (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com aumento de 8 vezes, para ser quantificado o Índice de Remanescente do Adesivo (IRA): 0 = nenhuma quantidade de cimento aderido ao esmalte; 1 = menos de metade do cimento aderido ao esmalte; 2 = mais de metade do cimento aderido ao esmalte; 3 = todo o cimento aderido ao esmalte (PITHON *et al.* 2011).

### 3.12 Análise de liberação de íons flúor

Os espécimes (n=3) foram confeccionados utilizando moldes de silicone (10 mm de diâmetro X 5 mm de altura) e armazenados a 37°C e com 100% de umidade por 30 min. Após esse período, cada espécime foi pesado com auxílio de uma balança analítica de precisão (Marte Shimadzu, Japão) e colocado em 2 mL de água deionizada por meio do sistema de purificação Milli-Q e mantido em estufa a 37 °C. A liberação de flúor foi medida após 24 h, utilizando-se um eletrodo íon seletivo conectado a um analisador de íons (Thermo Scientific Orion, USA) previamente calibrados com padrões de 0,2 a 5,0 ppm de F em TISAB II à 50%. As leituras foram feitas em milivolts (mV) e transformados em µg/mL (ppm F) por regressão linear da curva de calibração (LACERDA-SANTOS *et al.* 2015).

### 3.13 Estudo laboratorial *in vivo* de avaliação da biocompatibilidade

Para a confecção dos espécimes, os cimentos foram manipulados e introduzidos, com auxílio de seringa (Centrix®, USA), nas aberturas das extremidades de tubos de polietileno (5 mm de diâmetro X 3 mm de altura), previamente desinfetados e autoclavados, utilizados como veículo de inoculação dos materiais testados. Após o tempo de presa inicial, os espécimes foram inseridos no tecido subcutâneo dos ratos. Para o grupo controle, foram utilizados tubos de polietileno vazios que correspondem ao trauma induzido e possível contaminação dos mesmos.

Para a inserção dos espécimes, os ratos foram sedados (tiopental sódico, 50 mg/kg) e foi realizada tricotomia da região dorsal de cada animal para eliminação dos pelos (4x4 cm). Para antissepsia do campo operatório foi utilizado digluconato de clorexidina a 2% (Maquira,

Brasil) e para anestesia local Lidocaína 3% com vasoconstritor (DFL, Brasil). Foi realizada uma incisão de aproximadamente 8 mm de comprimento. Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, o tecido subcutâneo foi divulsionado lateralmente formando uma loja cirúrgica, com aproximadamente 18 mm de profundidade. Cada rato recebeu um implante do material correspondente ao seu grupo.

Após o implante dos materiais, as lojas cirúrgicas foram suturadas e em seguida os animais receberam pentabiótico veterinário (0,2 ml Wyeth Laboratory®, EUA) e uma injeção de dipirona sódica (0,3 ml/100g, Novalgina®, Brasil). Todos os procedimentos do presente estudo foram realizados em conformidade com o guia Canadian Council on Animal Care (1981). Após 7, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados pela técnica do deslocamento cervical após sedação (tiopental sódico 50 mg/kg), para obtenção das biópsias excisionais das áreas dos implantes, abrangendo tecido normal circundante suficiente (SANTOS *et al.* 2014).

### 3.14 Estudo morfológico

As amostras de tecido excisionado foram preparadas em lâminas de vidro através da coloração de rotina em Hematoxilina e Eosina (H/E) e posteriormente avaliados por um único avaliador, previamente treinado e calibrado, em um microscópio óptico Leica DM500® (Leica Microsystems, DE), em aumentos de 100x, 400x e 1000x. Foram avaliados os seguintes parâmetros histopatológicos: infiltrado inflamatório, reação de células gigantes multinucleadas, edema, necrose, reação de granulação, fibroblastos e fibras colágenas. Cada um desses parâmetros recebeu os seguintes escores, de acordo com a intensidade: 1- ausente/escasso (<25% de toda a área), 2- leve (26% a 50% de toda a área), 3 – moderado (51% a 75% de toda a área) e 4 – intenso (>75% de toda a área). Para cada amostra do estudo, foram analisadas cinco secções representativas da condição histológica do tecido, quando todas as cinco secções de tecido demonstraram a mesma condição histológica, as pontuações representam: 1, ausente (5,00); 2, escasso (10,00); 3, moderada (15,00); e 4, intensa (20,00) (SANTOS *et al.* 2014).

### 3.15 Estudo imunoistoquímico

Os espécimes de tecido excisionado, fixados em formol à 10% e emblocados em parafina, foram submetidos a cortes de 3 µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Aldrich Chemical CO, St Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido

ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Polymer/HRP) utilizando como anticorpo primário o anti-CD68 (Quadro 4).

**Quadro 4** - Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
<b>CD68</b>	ED1	Abcam	1:1500	Citrato, pH 6, 95 <sup>0</sup> , 30 min, Steamer	60 min

A técnica seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Imunoistoquímica do PPGO/UEPB, conforme descrito a seguir:

- Duas passagens em Xilol (15 minutos cada)
- Reidratação em etanóis:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
  - Álcool etílico 95°;
  - Álcool etílico 80°;
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Recuperação antigênica (Quadro 4);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas incubações em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Incubação dos cortes com os anticorpos primários, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente;
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente

(5 minutos cada);

- Incubação com anticorpo secundário (*ADVANCE™ HRP Link*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*ADVANCE™ HRP Enzyme*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente (5 minutos cada);
- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (8 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Desidratação em álcool absoluto:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- Montagem em resina Permount® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Como controle positivo foram utilizados espécimes de tecido subcutâneo de rato livres da inserção de material ortodôntico e para o controle negativo o anticorpo primário foi substituído por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

### 3.15.1 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz por um avaliador previamente treinado e calibrado. A análise foi do tipo quantitativa. Sob aumento de 100x foram selecionados 5 campos de maior imunorreatividade ao anticorpo. Sob aumento de 400x, cada um destes campos foi fotomicrografado (Leica DM500®, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador de uso pessoal. Com o auxílio do programa ImageJ® (National Institute of Mental Health)



Health, USA), em cada um destes campos foi realizada a contagem das células CD68+. Os valores obtidos foram somados, estabelecendo-se o número total de células CD68+, e posteriormente, calculada a média por campo, para cada caso (ALMEIDA MESQUITA *et al.* 2017).

### 3.16 Análise estatística

Os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados com o auxílio do programa Microsoft Excel, versão 2010 e em seguida exportado para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 20, SPSS, Inc., USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas, tomando como base os níveis de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) para determinação de significância estatística.

A análise de distribuição dos dados foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise do efeito antimicrobiano, dada uma distribuição não normal, os dados sofreram transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ), sendo a distribuição normal confirmada pelo mesmo teste estatístico.

Nos testes de análise antimicrobiana, liberação de flúor, TD, RC e microdureza, a análise comparativa entre grupos foi realizada por meio da análise de variância a dois fatores fixos (2-way ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey para comparações post-hoc ( $p < 0,05$ ). Para os resultados do teste de resistência de união ao cisalhamento foi utilizada a da análise de variância a um fator fixo (one-way ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para os resultados do IRA e dos estudos morfológico e imunoistoquímico foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn ( $p < 0,05$ ).

**4 ARTIGO 1****ANTIMICROBIAL PROPERTIES, MECHANICS AND FLUORITE RELEASE OF  
IONOMERIC CEMENTS MODIFIED BY RED PROPOLIS**

Propriedades antimicrobianas, mecânicas e liberação de flúor de cimentos ionoméricos modificados por própolis vermelha

Será submetido ao periódico:

**BRAZILIAN DENTAL JOURNAL**

Qualis Capes para Odontologia: A2



Antimicrobial Properties, Mechanics and Fluorite Release of Ionomeric Cements Modified by  
Red Propolis

Analysis of Cements Modified by Red Propolis

Gêisa Aiane de Moraes Sampaio<sup>1</sup>

Rogério Lacerda-Santos<sup>2</sup>

Yuri Wanderley Cavalcante<sup>3</sup>

Gustavo Henrique Apolinário Vieira<sup>1</sup>

Cassiano Francisco Weege Nonaka<sup>1</sup>

Pollianna Muniz Alves<sup>1</sup>

1- Graduate Program in Dentistry, State University of Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

2- Department of Dentistry, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil.

3 - Graduate Program in Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

**Corresponding author:**

Pollianna Muniz Alves

Universidade Estadual da Paraíba

Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil, CEP 58429-500.

Tel: +55 83 987383047

Email: [pmunizalves@gmail.com](mailto:pmunizalves@gmail.com)

## ABSTRACT

This study evaluated the antimicrobial activity, mechanical properties and fluoride release capacity of glass ionomer cement (GIC) used for cementing orthodontic bands, modified by ethanolic extract of red propolis (EERP) in different concentrations. Two orthodontic GICs containing EERP at 10%, 25% and 50%, were used. The following assays were carried out: cell viability tests against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, diametral tensile strength (DTS), compressive strength (CS), shear bond strength, microhardness and fluoride release capacity. The statistical analysis of the antimicrobial tests, fluoride release, DTS, CS and microhardness was performed using Two-way ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The shear bond strength data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). At the concentrations of 25% and 50%, EERP was shown to be a promising antimicrobial agent incorporated into GICs against *C. albicans* ( $P < 0.001$ ) and *S. mutans* ( $P < 0.001$ ). The fluoride release capacity of the GICs was not affected, and the EERP concentration of 25% was the one that least affected the mechanical properties of the cements ( $P > 0.05$ ). The GICs containing EERP at 25% showed a significant increase in their antimicrobial activity against *S. mutans* and *C. albicans*, unaltered mechanical properties and fluoride release capacity.

**KEY WORDS:** Glass ionomer cement; Propolis; Antimicrobial.

## INTRODUCTION

Orthodontic bands play an important role in conventional orthodontic therapy. Cementation of bands on posterior teeth is necessary to improve anchorage and retention of fixed appliances (1). However, the presence of these devices may cause biofilm accumulation in the region and demineralization of enamel adjacent to the orthodontic bands. Been a major concern for dental surgeons, especially in patients with poor oral hygiene (2)

In the last decades, glass ionomer cements (GIC) have been widely used for cementing orthodontic bands due to their various clinical properties (1,3, 4). With the advent of GIC for band cementation, caries and periodontal disease rates in orthodontic patients decreased considerably, due to the lower amount of microleakage and their fluoride release capacity (5). However, these cements can be modified in their composition by the addition of antimicrobial agents aiming to improve their antimicrobial properties (4,6-8).

Due to its antibacterial activity against microorganisms of the oral cavity (9,10), studies have suggested the incorporation of ethanolic extract of propolis (EEP) to the GIC in order to increase its potential (7,8,11-13). The use of this material in the cementation of orthodontic bands may contribute to a decrease in the number of bacteria in the region (6).

The propolis is a resinous composition produced by honeybees from plant exudates, found in the stem, leaves and flowers, being used in the hive to prevent microbial contaminations (14). The interests in its therapeutic use has been exacerbated by scientific evidence regarding the prevention of diseases due to its various biological properties, such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, antiviral and healing action (15-17).

Red propolis is found in the northeastern region of Brazil, especially in the coastal areas, and has been the target of numerous chemical and pharmacological studies that aroused great interests in the world scientific community because of its good biological, antimicrobial and antifungal activity (14). Therefore, it presents as a promising antimicrobial agent for incorporation in orthodontic GIC.

The addition of antimicrobial agents to the GICs can, however, result in changes in their physical and biological properties. Thus, this article proposed to evaluate the antimicrobial activity, mechanical properties and fluoride release capacity of GIC used for cementing the orthodontic bands, modified by ethanolic extract of Red Propolis (EERP) in different concentrations.

## MATERIALS AND METHODS

### *Preparation of the Ethanolic Extract of Red Propolis*

The present study used the EERP, from the coasts of Paraíba (João Pessoa, Paraíba, Brazil), obtained from crude extract red propolis. For each 25 g of propolis, this was dissolved in 250 mL of 80% (vol / vol) ethanol solution. The extract was then filtered twice on filter paper to remove excess wax. Then, the EERP was prepared at the concentrations of 10%, 25% and 50% and placed in an amber glass bottle at room temperature (8).

### *Preparation of Propolis Containing GIC*

Two orthodontic GICs, Meron® (VOCO) and Riva® (SDI), were used. For the control groups the cements were handled according to the manufacturers instruction's (Figure 1). For the tests groups, the 10%, 25% and 50% concentrations of EERP were incorporated into the liquid of the cements during their manipulation in a ratio of one drop of the liquid (tartaric acid) to one drop of the EERP solution, using the same dosing nozzle, then spatulated with the cement powder to obtain a solid material (5). The samples were thus distributed into eight groups: MC (Control), M10, M25, M50, RC (Control), R10, R25 and R50.

### *Analysis of antimicrobial activity*

The specimens of the cements (n = 3 by microorganism) were prepared by inserting the materials into silicone molds (10 mm X 5 mm). Suspensions of *S. mutans* (ATCC 25175) and *C. albicans* (ATCC 90028) were established at densities equivalent to  $1 \times 10^8$  CFU-*S.mutans* / mL and  $1 \times 10^6$  CFU-*Candida* / mL, respectively, with spectrophotometer.

The specimens were positioned horizontally in a 24-well plate and, in each well, *S. mutans* and *C. albicans* biofilms were formed from the mixture of 0.2 mL of the inoculum of the microorganisms in 1.8 mL of supplemented BHI medium with 1% sucrose (Merck & Co, Kenilworth, Nova Jersey, USA) for *S. mutans* and RPMI 1640 medium supplemented with 100 mM glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany) for *C. albicans*, and incubated at 37 °C for 24 h in aerobiosis.

In order to measure the cellular viability of the microorganisms adhered to the specimens, the biofilms were collected after 24 h by transferring the specimens to polypropylene tubes containing 2 mL of saline solution and subjected to vigorous vortexing for 60 s to obtain suspensions of biofilms. The suspensions were diluted serially, in concentrations ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$ . These dilutions were seeded on BHI agar plates for *S. mutans*, and on

Sabouraud Dextrose Agar plates for *C. albicans*, using the drop method (10 µl). The plates were then incubated at 37 ° C in aerobiose for 24 h. The counting of viable microorganisms was performed in the dilutions where there was growth between 6 and 60 colonies.

#### *Analysis of mechanical properties*

For diametral tensile strength (DTS) and compressive strength (CS) tensile test's, the specimens (n = 10) were prepared by inserting the material into cylindrical silicone molds (6 mm × 3 mm TD and 4 mm x 8 mm RC). After insertion of the material, a polyester strip was placed on the upper surface and a glass plate was manually pressed to obtain a regular surface of the specimen. After 5 min, the specimens were stored at 37°C in 100% moisture for 24 h and their dimensions were measured with a digital caliper (Mitutoyo, Kawasaki, Kanagawa, Japan).

The assays were performed in a universal Instron 3365® tests machine (Instron Corporation, Norwood, Massachusetts, USA), with a loading cell of 5 kg and a speed of 0.5 mm / min. The load was applied along the diameter of the specimen and the maximum force before rupture was recorded. Subsequent equations were then applied to each specimen to obtain DTS and SC tests results, where  $DTS = 2F / \pi dt$  and  $SC = 4F / \pi d^2$ , where F is the bursting load, d is the diameter and t height of the specimens.

For Vickers Microhardness test's, the specimens (n = 5) were prepared by inserting the material into cylindrical silicone molds (6 mm × 3 mm) following the same procedures for manipulation, insertion and cure previously described, followed by polishing of the surface of the specimens. Vickers microhardness measurements were performed using an HMV® microdurometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) with 200g load over 15 s. In each specimen, three equidistant notches were performed, obtaining 15 measurements per group.

For the shear bond strength tests, 80 bovine incisors were used, kept in 0.1% thymol solution until the moment of the experiment. The teeth were segmented using a diamond disc (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brazil) coupled to a straight piece of low rotation around the cervical third of the roots and in the incisal third of the crown. Each tooth was then positioned horizontally in cylindrical arrays of PVC tubes (20 mm x 10 mm) and fixed with acrylic resin (VIPI, Pirassununga, São Paulo, Brazil). The buccal surfaces were polished with a rubber bowl (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brazil), and pumice (S.S. White, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil) at low spin for 10 sec, washed and dried, for the same time.

Metal matrices for orthodontic bands (Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brazil) were cut (5 mm x 10 mm) and metal brackets (Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brazil) were welded over them. The GICs were manipulated and each matrix was cemented to the center of the buccal

surface of the tooth. After 5 min, the specimens ( $n = 10$ ) were stored at 37°C in 100% moisture for 24 h. The test's were run on a universal Instron 3365® tests machine (Instron Corporation, Norwood, Massachusetts, USA) using a die with a 5 kg loading chisel at a speed of 1 mm / min. The results were obtained in N and divided by the base area of the bracket, providing results in Mpa.

After the tests, the vestibular surface of each tests specimen was evaluated in a stereoscopic magnifying glass (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) with 8-fold increase, to quantify the Adhesive Remnant Index (ARI): 0 = no cement adhered to the enamel; 1 = less than half of the cement adhered to the enamel; 2 = more than half of the cement adhered to the enamel; 3 = all the cement adhered to the enamel.

#### *Fluoride release analysis*

The specimens ( $n = 3$ ) were made using silicone molds (10 mm X 5 mm) and stored at 37 ° C and at 100% moisture for 30 min. After this period, each specimen was weighed with a precision analytical balance (Mars Shimadzu, Kyoto, Japan) and placed in 2 mL of deionized water by the Milli-Q purification system and maintained in an oven at 37 ° C. The fluoride release was measured after 24 h using a selective ion electrode connected to an ion analyzer (Thermo Scientific Orion, USA) previously calibrated with standard's of 0.2 to 5.0 ppm F in TISAB II at 50 %. The readings were made in millivolts (mV) and transformed into  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (ppm F) by linear regression of the calibration curve.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis of the data were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (version 20, SPSS, Inc., USA) based on the 95% significance levels ( $p < 0.05$ ) for statistical significance determination.

Data distributions analysis was performed using the Kolmogorov-Smirnov tests. For analysis of the antimicrobial effect, given a non-normal distributions, the data underwent log transformation ( $\log_{10}$ ), the normal distributions being confirmed by the same Statistical tests.

In the tests of antimicrobial analysis, fluoride release, DTS, CS and microhardness, the comparative analysis between groups was performed by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons tests for post- hoc ( $p < 0.05$ ). For the results of the tests of shear bond strength was used the analysis of variance to a fixed factor (one-way ANOVA) followed by the tests of Tukey ( $p < 0.05$ ). The Kruskal-Wallis non-parametric tests was used for the ARI results, followed by Dunn's multiple comparison tests.

## RESULTS

### *Antimicrobial activity*

At cell viability tests (*S. mutans* and *C. albicans*), no statistically significant differences were observed between Meron® and Riva® materials ( $p > 0.05$ ) (Tables 1 and 2). For the different concentrations of propolis, there was a decrease in the cell viability of *S. mutans*, with the groups of concentrations 25% and 50% differing significantly from each other ( $p < 0.05$ ) (Table 1). A decrease in the cellular viability of *C. albicans* was also observed, with the groups 25% and 50% differing significantly from the control group ( $p < 0.05$ ) and with no statistical difference between the 10%, 25% and 50% groups (Table 2).

### *Mechanical properties*

Results of the DTS tests showed significant differences between the materials, being Meron® cement more resistant ( $p < 0.05$ ). The different concentrations of propolis, concentrations of 10% and 50% presented a decrease in TD resistance with a significant difference in relation to the control ( $p < 0.05$ ) (Table 3).

At CS results, no statistically significant differences were observed between the Meron® and Riva® materials ( $p > 0.05$ ). For the different concentrations of propolis, there was no significant statistical difference with the control, however, the concentration of 50% presented a decrease in CS with a significant difference in relation to the concentration of 25% ( $p < 0.05$ ) (Table 4).

Vickers Microhardness analysis, no statistically significant differences were observed between Meron® and Riva® materials ( $p > 0.05$ ), as well as between the different concentrations of propolis and controls ( $p > 0.05$ ) (Table 5). For the results of shear bond strength, significant differences were observed between the materials, with Riva® cement appearing with greater resistance ( $p < 0.05$ ), and for the different concentrations of propolis there was no significant statistical difference between groups ( $p > 0.05$ ) (Table 6). Regarding ARI results, no significant statistical differences were also observed ( $p > 0.05$ ) (Table 7).

### *Release of fluoride*

For the fluoride ion release analysis, no statistically significant differences were observed between the Meron® and Riva® materials ( $p > 0.05$ ), as well as between the different concentrations of propolis and the controls ( $p > 0.05$ ) (Table 8).



## DISCUSSION

The EERP led to a decrease in cell viability of *S. mutans* in the groups with their addition. The cements with concentrations higher than 25% presented better antimicrobial activity, differing statistically from the control group. Hatunoglu *et al.* (8) also demonstrated an increase in antimicrobial activity against *S. mutans* of GIC with addition of ethanolic extract of yellow propolis at concentrations of 25% and 50% by means of minimum inhibitory concentration measurement tests. An antimicrobial action against *S. mutans* was also demonstrated by the addition of lyophilized of ethanolic extract of yellow propolis to the GIC powder at concentrations of 0.75% and 1.25% by agar diffusion and bacterial adhesion tests (13).

A decrease in the cellular viability of *C. albicans* was also observed in the groups of the cements with 25% and 50% concentrations of EERP differing significantly from the control group. This is probably due to the antimicrobial action that EERP exerts on *Candida spp* (14,18). As shown by Freires *et al* (19) that showed same results with a propolis species from Northeast's Brazil (19). And Haghdoost *et al* (20), using a germ tube formation assay, where ethanolic extract of yellow propolis significantly decreased *Candida* formation in a direct concentration dependency (20).

Regarding the evaluation of the mechanical properties, it was observed that the 25% EERP showed no significant alteration of the DTS and CS, unlike the other concentrations. Troca *et al.* (7) also observed a significant decrease in the resistance to DTS of restorative GICs containing ethanolic extract of green propolis, in addition to an increase in water absorption and solubility of the cement. Another study also verified the decrease in CS and increase in the solubility of cements containing ethanolic extract of green propolis (21). This can be attributed to propolis interference with the reaction of glass particles and polyacrylic acid, thus increasing the number of unreacted particles in the structure (7, 21).

For Vickers Microhardness, no significant difference between the groups were found, which shows that the addition of EERP in the concentrations of 10%, 25% and 50%, did not affect the microhardness of the cements. Altunsoy *et al.* (12) have verified that the addition of EEP to a conventional GIC at the same concentrations increased the Vickers microhardness of the material and did not affect its microleakage.

In order to analyze mechanical properties of orthodontic cements, whenever possible, it is also interesting to associate a shear bond strength test, to simulate orthodontic treatment and verify the performance of a material under conditions similar to the oral environment (5). In the



present study, the results of the tests of shear bond strength and ARI did not show significant differences between the cements with addition of EERP and conventional cements. Similar results were found in studies that verified the shear strength of a GIC with a liquid containing 1% ethanolic extract of yellow propolis (22) and a GIC with 10%, 25% and 50% concentration (8). These findings suggest that the addition of ethanolic extract of propolis does not affect the shear bond strength of the GIC.

In relation to fluoride release, this study did not observe an alteration of the fluoride release capacity of the materials modified by the red propolis, regardless of the concentration. The fluoride released by the GIC can reduce the enamel demineralization in areas with high risk of caries, and this release of fluoride, together with the chemical properties of the cement, made these materials the most suitable for cementing orthodontic bands (3). The use of the selective ion electrode is an accurate method to estimate the amount of fluoride release, as it shows a direct estimate of free fluorine ions (22). In the present study, the addition of EERP to the GIC did not affect the fluoride release capacity of the cements. Other studies, however, found an increase in the fluoride release of a GIC with its liquid containing 1% ethanolic extract of yellow propolis (22) and a GIC with its powder containing 1.25% lyophilized ethanolic extract of yellow propolis (13).

Regarding the two brands of cement tested, it was observed that the Meron® cement showed a higher resistance to DTS. For the other tests, no significant differences were observed between the cements, this is probably due to the similarities in their compositions.

Finally, the results of the present study demonstrated that EERP, at concentrations of 25% and 50%, is shown as a promising antimicrobial agent for addition in orthodontic GICs. The fluoride ion release capacity was not affected and the addition of 25% EERP was the one with least effect on the mechanical properties of the cements. However, further studies using other concentrations of EERP are recommended, as well as other mechanical and clinical trials. In addition, only the ethanolic extract was used in this study, other forms of red propolis should be incorporated into the GIC and studied.

In summary, it can be observed that the 25% concentration has been shown to be able to increase the antimicrobial capacity of cements against *S. muntans* and *C. albicans*, without affecting its mechanical properties and its ability to release fluoride.

## RESUMO

Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e capacidade de liberação de flúor de cimentos de ionômero de vidro (CIV) utilizados na cimentação de bandas ortodônticas, modificados com extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) em diferentes concentrações. Foram utilizados dois CIV ortodônticos com adição de EEPV em concentrações de 10%, 25% e 50%. Foram realizados testes de viabilidade celular contra *Streptococcus mutans* (n=3) e *Candida albicans* (n=3), resistência à tração diametral (TD), resistência à compressão (RC), resistência de união ao cisalhamento, microdureza e liberação de flúor. A análise estatística dos testes antimicrobianos, liberação de flúor, TD, RC e microdureza, foi realizada por meio de 2-way ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para o teste de resistência de união ao cisalhamento foi utilizada one-way ANOVA seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). EEPV em concentrações de 25% e 50% se mostraram como agentes antimicrobianos promissores para adição em CIV contra *C. albicans* ( $P < 0,001$ ) e *S. mutans* ( $P < 0,001$ ). A capacidade de liberação de íons flúor não foi afetada e a adição de 25% de EEPV foi a concentração que menos afetou as propriedades mecânicas dos cimentos ( $P > 0,05$ ). Os cimentos com adição de EEPV 25% demonstraram aumento significativo da capacidade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans*, sem afetar as propriedades mecânicas e a capacidade de liberação de flúor.

## ACKNOWLEDGMENT

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support

## REFERENCE

1. Enan ET, Hammad SM. Microleakage under orthodontic bands cemented with nano-hydroxyapatite-modified glass ionomer. *Angle Orthod* 2013;83(6):981-6.
2. Kashani M, Farhadi S, Rastegarfar N. Comparison of the effect of three cements on prevention of enamel demineralization adjacent to orthodontic bands. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2012;6(3):89-93.
3. Santos RL, Moura Mde F, Carvalho FG, Guenes GM, Alves PM, Pithon MM. Histological analysis of biocompatibility of ionomer cements with an acid-base reaction. *Braz Oral Res* 2014; 28(1):1-7.
4. Marti LM, Mata M, Ferraz-Santos B, Azevedo ER, Giro EM, Zuanon AC. Addition of chlorhexidine gluconate to a glass ionomer cement: a study on mechanical, physical and antibacterial properties. *Braz Dent J.* 2014;25(1):33-7.
5. Farret MM, de Lima EM, Mota EG, Oshima HM, Barth V, de Oliveira SD. Can we add chlorhexidine into glass ionomer cements for band cementation? *Angle Orthod.* 2011;81(3):496-502.
6. de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA, et al. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent.* 2013;41(2):155-63.
7. Troca VB, Fernandes KB, Terrile AE, Marcucci MC, Andrade FB, Wang L. Effect of green propolis addition to physical mechanical properties of glass ionomer cements. *J. Appl. Oral Sci.* 2011;19(2):100-5.
8. Hatunoglu E, Ozturk F, Bilenler T, Aksakalli S, Simsek N. Antibacterial and mechanical properties of propolis added to glass ionomer cement. *Angle Orthod.* 2014;84(2):368-73.
9. Duailibe SA, Goncalves AG, Ahid FJ. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(5):420-3.
10. Hegde KS, Bhat SS, Rao A, Sain S. Effect of propolis on *Streptococcus mutans* counts: An in vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2013; 6(1):22-5.
11. Topcuoglu N, Ozan F, Ozyurt M, Kulekci G. *In vitro* antibacterial effects of glass-ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans* Eur J Dent. 2012;6(4):428-33.
12. Altunsoy M, Tanriver M, Turkan U, Uslu ME, Silici S. In vitro evaluation of microleakage and microhardness of ethanolic extracts of propolis in different proportions added to glass ionomer cement. *J Clin Pediatr Dent.* 2016;40(2):136-40.
13. Elgamily H, Ghallab O, El-Sayed H, Nasr M. Antibacterial potency and fluoride release of a glass ionomer restorative material containing different concentrations of natural and chemical products: An in-vitro comparative study. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(4):e312-e20.

14. Das Neves MVM, Silva TMS, Lima EO, Cunha EVL, Oliveira EJ. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Braz J Microbiol* 2016; 47(1):159-66.
15. Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5):493-97.
16. Batista LLV, Campesatto EA, Assis MLB, Barbosa APF, Grillo LAM, Dornelas CB. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev Col Bras Cir* 2012; 39(6):515-20.
17. Grenho L, Barros J, Ferreira C, Santos VR, Monteiro FJ, Ferraz MP, et al. *In vitro* antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite *Biomed Mater* 2015; 10(2):025004.
18. Pippi B, Lana AJ, Moraes RC, Guez CM, Machado M, de Oliveira LF, et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *J Appl Microbiol*. 2015;118(4):839-50.
19. Freires IA, Alencar SM, Rosalen PL. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases *Eur J Med Chem* 2016; 110(2016):267-79.
20. Haghdoust NS, Salehi TZ, Khosravi A, Sharifzadeh A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *J Mycol Med* 2016 26(4):298-305.
21. Subramaniam P, Girish Babu KL, Neeraja G, Pillai S. Does addition of propolis to glass ionomer cement alter its physicochemical properties? an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*. 2016;40(5):400-3.
22. Prabhakar AR, Balehosur DV, Basappa N. Comparative Evaluation of Shear Bond Strength and Fluoride Release of Conventional Glass Ionomer with 1% Ethanolic Extract of Propolis Incorporated Glass Ionomer Cement -Invitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(5):ZC88-91.

Table 1 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for cellular viability test with *S. mutans* (log<sub>10</sub> UFC/mL).

	Meron	Riva	Total	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	P*
Control	8.27 (0.26)	8.19 (0.25)	8.23 (0.24) <sup>a</sup>	-
RP10%	8.17 (0.23)	7.96 (0.22)	8.06 (0.24) <sup>a</sup>	-
RP25%	7.38 (0.13)	7.42 (0.08)	7.40 (0.10) <sup>b</sup>	-
RP50%	7.23 (0.14)	6.89 (0.17)	7.06 (0.23) <sup>c</sup>	-
Total	7.76 (0.51)	7.61 (0.55)	-	0.470
P*	-	-	0.,001	-

\* 2-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison set. Different letters indicate statistical difference between the lines (p <0.05).

Table 2 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for cellular viability test with *C. albicans* (log<sub>10</sub> UFC/mL).

	Meron	Riva	Total	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	P*
Control	7.32 (0.42)	7.08 (0.60)	7,20 (0.49) <sup>a</sup>	-
RP10%	6.90 (0.42)	6.52 (0.06)	6,73 (0.35) <sup>ab</sup>	-
RP25%	5.38 (0.55)	6.32 (0.17)	5,85 (0.63) <sup>b</sup>	-
RP50%	5.47 (1.09)	6.29 (0.45)	6,04 (0.81) <sup>b</sup>	-
Total	6.33 (0.48)	6.51 (0.55)	-	0.434
P*	-	-	0.004	-

\*2-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison set. Different letters indicate statistical difference between the lines (p <0.05).

Table 3 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for Diametral Tensile Strength (Mpa)

	Meron	Riva	Total	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	P*
Control	27.93 (6.09)	16.83 (6.33)	22.67 <sup>a</sup> (8.29)	-
RP10%	17.19 (6.49)	14.00 (8.70)	15.59 <sup>b</sup> (7.65)	-
RP25%	27.28 (5.51)	12.81 (6.22)	20.05 <sup>ab</sup> (9.37)	-
RP50%	23.68 (6.73)	10.27 (5.53)	16.98 <sup>b</sup> (9.12)	-
Total	24.02 <sup>A</sup> (7.37)	13.39 <sup>B</sup> (6.95)	-	0.001
P*	-	-	0.008	-

\* 2-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison set. Different letters indicate statistical difference between the lines (p <0.05).

Table 4 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for Compression Strength (Mpa)

	Meron	Riva	Total	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	P*
Control	27.83 (5.71)	20.97 (4.12)	24.58 <sup>ab</sup> (6.02)	-
RP10%	25.34 (7.68)	22.37 (8.77)	23.93 <sup>ab</sup> (8.12)	-
RP25%	28.93 (6.61)	26.06 (5.97)	27.49 <sup>a</sup> (6.30)	-
RP50%	18.65 (7.66)	20.96 (5.79)	19.80 <sup>b</sup> (6.69)	-
Total	25.35 (7.74)	22.68 (6.47)	- -	0.095
P*	-	-	0.008	-

\* 2-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison set. Different letters indicate statistical difference between the lines (p <0.05).

Table 5 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between groups for Vickers Microhardness (HV)

	Meron	Riva	Total	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	P*
Control	74.86 (16.49)	84.62 (8.43)	79.74 (13.38)	-
RP10%	97.58 (17.85)	87.60 (9.02)	92.59 (14.33)	-
RP25%	88.62 (13.98)	89.94 (8.02)	89.28 (10.77)	-
RP50%	74.66 (12.90)	85.54 (10.94)	80.10 (12.65)	-
Total	83.93 (17.31)	86.93 (8.67)	-	0.461
P*	-	-	0.067	-

\* 2-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison set. Different letters indicate statistical difference between the lines (p <0.05).

Table 6 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between between groups for the Shear Bond Strength (Mpa)

	Meron	Riva	
	Mean (SD)	Mean (SD)	P*
Control	0.160 (0.046) <sup>A</sup>	0.218 (0.066) <sup>B</sup>	0.033
RP10%	0.149 (0.072)	0.180 (0.081)	0.383
RP25%	0.118 (0.040)	0.169 (0.083)	0.104
RP50%	0.130 (0.063)	0.174 (0.071)	0.160
P*	0.373	0.455	-

\*2-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison set. Different letters indicate statistical difference between the lines (p <0.05).

Table 7- ARI scores and mean values presented by groups<sup>a,b</sup>

Grupos	ARI Scores				P*
	0	1	2	3	
MC	0	1	4	5	2.4
M10	0	1	1	8	2.7
M25	1	1	2	6	2.3
M50	2	1	1	6	2.1
<i>P</i> valor*	-	-	-	-	0.575
RC	2	0	4	4	2.0
R10	2	1	2	5	2.0
R25	1	3	0	6	2.1
R50	5	0	2	3	1.3
<i>P</i> valor*	-	-	-	-	0.469

0, no remaining adhesive; 1, less than half the remaining adhesive; 2, more than half of the remaining adhesive; 3, all remaining adhesive. b ARI - Adhesive Remaining Index. \* TeSDe of Kruskal-Wallis and multiple comparison of Dunn (P <0.05).

Table 8 - Mean, standard deviation (SD) for comparison between group for fluoride release test (µg/ml)

	Meron	Riva	Total	P*
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	
Control	4.53 (0.05)	4.68 (0.11)	4.60 (0.11)	-
RP10%	4.47 (0.03)	4.50 (0.01)	4.48 (0.02)	-
RP25%	4.54 (0.04)	4.60 (0.01)	4.57 (0.04)	-
RP50%	4.53 (0.05)	4.56 (0.04)	4.55 (0.04)	-
Total	4.52 (0.05)	4.58 (0.08)	-	>0.05
<i>P</i> *	-	-	>0.05	-

\*2-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison set. Different letters indicate statistical difference between the lines (p <0.05).

Figure 1 – Composition of tested Glass Ionomer Cements

GIC's	Composition	Brand	Lot
Meron®	Powder: Fluorsilicate glass, aluminum, polyacrylic acid and pigments Liquid: Tartaric acid solution	VOCO, Cuxhaven, Germany	1627583
Riva®	Powder: Aluminum silicate fluoride, polyacrylic acid. Liquid: Tartaric acid solution.	SDI, Bayswater, Australia	150212



**5 ARTIGO 2****BIOCOMPATIBILITY OF IONOMERIC CEMENTS MODIFIED BY RED PROPOLIS: A MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS**

Biocompatibilidade de cimentos ionoméricos modificados por própolis vermelha: análise morfológica e imunoistoquímica

Submetido ao periódico:

**THE JOURNAL ADHESIVE OF DENTISTRY**

Fator de impacto: 1.691

Qualis Capes: A2

## **Biocompatibility of Ionomeric Cements Modified by Red Propolis: a Morphological and Immunohistochemistry Analysis**

Gêisa Aiane de Moraes Sampaio<sup>1</sup>

Rogério Lacerda-Santos<sup>2</sup>

Yuri Wanderley Cavalcante<sup>3</sup>

Gustavo Henrique Apolinario Vieira<sup>4</sup>

Cassiano Francisco Weege Nonaka<sup>4</sup>

Pollianna Muniz Alves<sup>4</sup>

1- Master in Dentistry, Student of Graduate Program in Dentistry, State University of Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brazil. Performed experiments, wrote manuscript.

2- PhD in Dentistry, Professor of Department of Dentistry, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil. Idea, wrote manuscript, performed statistical evaluation.

3 - PhD in Dentistry, Professor of Graduate Program in Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil. Performed experiments, performed statistical evaluation.

4 - PhD in Oral Pathology, Professor of Graduate Program in Dentistry, State University of Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brazil. Performed histological tests, wrote manuscript, contributed substantially to discussion.

### **Corresponding author:**

Pollianna Muniz Alves

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia

Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil, CEP 58429-500.

Email: [pmunizalves@gmail.com](mailto:pmunizalves@gmail.com)

## ABSTRACT

**Purpose:** This study evaluated the biocompatibility in rat subcutaneous tissue of conventional orthodontic cements (Riva® and Meron®) and modified by ethanolic extract of red propolis (EERP) in different concentrations and at different time intervals. **Material and Methods:** One hundred and eight male adult Wistar rats were used, distributed in nine groups of cements handled with EERP at the concentrations used (C, MC, M10, M25, M50, RC, R10, R25 and R50) was sacrificed in 3 times (7, 14 and 21 days). Histological and immunohistochemical analyzes were performed. The statistical analysis of findings was performed using by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test ( $p < 0.05$ ). **Results:** The highest concentrations led to a greater inflammation in the initial times ( $P < 0.05$ ) without differences after 30 days. For collagen, in the initial times there was less collagenization in relation to group C. However over time the addition of propolis resulted in a healing compatible with group C. CD68 immunostaining was more expressive for the groups with the highest concentration, R50 and M50, with a statistically significant difference ( $p = 0.001$ ). **Conclusion:** The orthodontic cements with the addition of EERP were found to be biocompatible in rat subcutaneous tissue. Riva cement with 50% EERP addition showed the highest response in tissue inflammation, but with a satisfactory tissue repair.

**Keywords:** Glass ionomer cements; Propolis; Biocompatibility

## INTRODUCTION

Glass Ionomer Cements (GIC) were developed in the late 1960s and their properties of adhesion to dental structure and release of fluoride ions ensured their popularity among dental professionals<sup>19</sup>. These cements have several clinical applications due to variations in the powder / liquid ratio and the viscosity of the material, among them is the orthodontic cementation<sup>2</sup>.

The GICs are used for cementing orthodontic bands because they present several desirable characteristics, such as chemical bonding to enamel and stainless steel, biocompatibility and continuous fluoride release and absorption<sup>8,16</sup>. These characteristics are very important to provide adequate bonding strength between the tooth and the band and to reduce the incidence of caries and periodontal diseases in orthodontic patients<sup>16</sup>.

The evaluation of the biocompatibility of orthodontic GICs is important because the presence of cement materials may cause inflammatory reactions in the gingival tissue underlying the orthodontic bands<sup>5,14</sup>. In vitro studies have demonstrated that conventional GICs are biocompatible on human gingival fibroblasts<sup>17</sup> and mouse L929 fibroblasts<sup>6</sup>. The same could be verified in rat subcutaneous tissue, which is the most commonly used method for evaluating the in vivo biocompatibility of biomaterials<sup>18</sup>.

Several types of materials are being added to the composition of ionomeric cements in order to increase their antimicrobial activity. Among them, the addition of propolis ethanolic extract (PEE) is an innovative strategy for the incorporation of controlled release antimicrobial agents into the GIC<sup>10</sup>. Scientific evidence has exacerbated the interest in the therapeutic use of propolis due to its various biological properties, including its antimicrobial action<sup>9</sup>. The brazilian red propolis has botanical origin of *Dalbergia ecastophyllum* and although it is still little explored, it presents good results of antibacterial and antifungal activity<sup>1,13</sup>.

Recent studies have evaluated the antibacterial effect of GIC containing PEE and found that the addition of propolis significantly increased the antibacterial effect of the material<sup>7,11,21</sup>. However, it is necessary to evaluate the biocompatibility of these cements since the addition of an antibacterial agent to the GIC can affect its biological properties<sup>3</sup>.

In the light of the above, this studies proposes to evaluate the biocompatibility in rat subcutaneous tissue of conventional orthodontic cements modified by ethanol extract of red propolis (EERP) in different concentrations and at different time intervals.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Preparation of the Ethanolic Extract of Red Propolis***

The present study used the EERP, from the coast of Paraíba, obtained from crude red propolis. For each 25 g of propolis, this was dissolved in 250 mL of 80% (vol / vol) ethanol solution. The extract was then filtered twice on filter paper to remove excess wax. Then, the EERP was prepared at the concentrations of 10%, 25% and 50% in 80% hydroalcoholic solution and placed in an amber glass bottle at room temperature<sup>11</sup>.

### ***Manipulation of cements***

Two orthodontic GICs, Meron® (VOCO, Cuxhaven, Germany) and Riva® (SDI, Bayswater, Australia) were used. For the control groups the cements were handled according to the manufacturers instructions (Figure 1). For the test groups, the 10%, 25% and 50% concentrations of EERP were incorporated into the liquid of the cements during their manipulation in a ratio of one drop of the liquid (tartaric acid) to one drop of the EERP solution, using the same dosing nozzle, then spatulated with the cement powder to obtain a solid material<sup>8</sup>.

### ***Animal model and experimental groups***

For this study, 108 adult male Wistar rats weighing between 200g and 300g were distributed in nine groups, two cement control groups (MC and RC), six groups of cements handled with EERP at the concentrations used (M10, M25, M50, R10, R25 and R50), and a control group with the empty polyethylene tube (Group C) for the purpose of evaluating the inflammatory effect caused by the tube. Each group consisted of 4 rats for each of the follow-up periods (7, 15 and 30 days). The animal experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Academic Unit of Biologic Sciences, CSTR/UFCG, Protocol CEP/No.082011.

For the preparation of the specimens, the cements were handled and introduced with the aid of a Centrix syringe (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) into the end openings of polyethylene tubes (5 mm X 3 mm), previously disinfected and autoclaved, used as inoculation vehicle of the materials tested. After the initial prey time, the specimens were inserted into the subcutaneous tissue of the rats.

For insertion of the specimens, rats were sedated (sodium thiopental, 50 mg / kg) and tricotomy of the dorsal region of each animal was performed to eliminate hairs (4x4 cm). For antisepsis of the operative field, 2% chlorhexidine digluconate (Maquira, Maringá, PR, Brazil) and for local anesthesia Lidocaine 3% with vasoconstrictor (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were used. An incision of approximately 8 mm in length was performed using a No.15 scalpel blade (Embramac; Itapira, SP, Brazil) adapted to a scalpel handle. With the aid of blunt-tipped scissors (Duflex, SS White: Rio de Janeiro, RJ, Brazil), the subcutaneous tissue was laterally parted to make a tunnel in the lateral direction, forming a surgical recesses, each approximately 18 mm deep. Each mouse received an implant from the material corresponding to its group.

After implantation of the materials, the surgical recesses were sutured and the animals received veterinary pentabiotic (0.2 ml Wyeth Laboratory®, USA) and one injection of sodium dipyrone (0.3 ml / 100 g, Novalgina®, BR). All procedures in the present study were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care (1981). After 7, 15 and 30 days, the animals were sacrificed by the technique of cervical displacement after sedation (sodium thiopental 50 mg / kg), to obtain the excisional biopsies of the implant areas covering sufficient normal surrounding tissue. The study was double blinded, each material was directed so that examiner and supervisor were not aware of which materials were implanted in each group<sup>18</sup>.

### ***Morphological analysis***

Excised tissue samples were prepared on glass slides by routine staining in Hematoxylin and Eosin (H / E) and then evaluated by a single, previously trained and calibrated test (kappa = 0.7) in a Leica DM500® optical microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), in magnification of 40x, 100x and 400x. The following histopathological parameters were evaluated: inflammatory infiltrate, multinucleated giant cell reaction, edema, necrosis, granulation tissue, young fibroblasts and collagen fibers. For each sample, five sessions of the tissue were evaluated and each of the parameters received the following scores according to the intensity: 1 - absent / scarce (<25% of the entire area), 2 - mild (26% to 50% the entire area), 3 - moderate (51% to 75% of all area) and 4 - intense (> 75% of the entire area)<sup>18</sup>.

### ***Immunohistochemical Analysis***

Excised tissue specimens, fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin, were subjected to 3 µm thick slices, which were spread on glass slides previously prepared with 3-aminopropyltriethoxysilane based adhesive (Sigma Aldrich Chemical, St. Louis, Missouri

USA). Subsequently, the material was subjected to the immunoperoxidase method using the dextran polymer-based technique (Polymer / HRP) using the anti-CD68 as the primary antibody (Figure 2).

As a positive control, free subcutaneous tissue specimens were used from the insertion of material and for the negative control the primary antibody was replaced with 1% bovine serum albumin (BSA) in buffer solution.

After immunohistochemical treatment, each specimen was analyzed under light microscopy by a previously trained and calibrated evaluator. Under a magnification 100x, five fields of immunoreactivity to the antibody were selected. Under a magnification of 400x, each of these fields was photomicrographed (Leica DM500®, DE) and the images obtained were transferred to a personal computer. With of the ImageJ® program (National Institute of Mental Health, USA), in each of these fields the CD68 + cells were counted. The obtained values were summed, establishing the total number of CD68 + cells and later, calculated by means of field, for each case.

### **Statistical analysis**

The results were organized and exported to the Statistical Package for the Social Sciences (version 20, SPSS, Inc., USA), in which statistical analyzes were performed, based on the 95% significance level ( $p < 0.05$ ) to determine statistical significance. Data distribution analysis was performed using the Kolmogorov-Smirnov test. Non-parametric Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTS**

### ***Morphological analysis***

The morphological analysis showed that in the Meron cement in the initial concentrations, M10 and M25, had a little inflammatory infiltrate, lower edema, necrosis and granulation tissue when compared to group C. For Riva cement, in the lower concentrations, R10 and R25 groups demonstrated a higher inflammatory infiltrate when compared to the control in the 7-day time period (P value), a similar condition evidenced only in the M50 group (Figure 3A-D). For Edema, only the R25 group differed statistically from the control (put P value) at the time of 7 days (Figure 3A-D).

The morphological analysis showed significant inflammatory infiltrate in the R10, R25 and M50 groups at 7 days ( $p = 0.002$ ) and in the R50 group at 15 days ( $p = 0.025$ ) and 30 days ( $p = 0.006$ ), differing significantly from the group C. Edema and necrosis were more expressive in the R25 group at 7 days with statistical difference in relation to the MC, M25 and C groups ( $p = 0.001$ ). The M25 group had the highest amount of granulation tissue in the time of 7 days, differing significantly from group C ( $p = 0.005$ ), and group R50 at the time of 30 days, differing from MC and C groups ( $p = 0.012$ ). In relation to the number of multinucleated giant cells, the R10 group exhibited a larger quantity, with a statistical difference in relation to the R25 and C groups in 15 days ( $p = 0.005$ ) (Table 1).

The addition of propolis did not interfere in the repair process, demonstrated by the number of fibroblasts, in the initial times, but the R50 group presented the highest amount, with a significant difference in relation to the group C in the time of 30 days ( $p = 0.007$ ). For collagen, in the initial times there was less collagenization in relation to group C. However over time the addition of propolis resulted in a healing compatible with group C (Table 1).

### ***Immunohistochemical Analysis***

Immunostaining was more expressive for the groups with the highest concentration, R50 and M50, with a statistically significant difference ( $p = 0.001$ ), for time 7 days. For the 15-day time, the R50 group showed the highest immunostaining, but no significant difference with the M, R10 and M25 groups, however the groups differed statistically from the control group ( $p = 0.001$ ). In the 30-day period only the R50 group showed a greater number of immunostaining cells with significant difference in relation to group C ( $p = 0.009$ ) (Table 2) (Figure 3E-P).

## **DISCUSSION**

A more intense inflammatory reaction was observed in the tissues exposed to the materials of groups R10, R25 and M50 in 7 days, remaining in the R50 group at times of 15 days and 30 days, however, no differences were observed between these and the cement control groups (RC and MC). Similar results were observed in a study evaluating the biocompatibility of orthodontic GICs in subcutaneous tissue of rats, where the events of inflammatory infiltrate and edema were expressive within 7 days and gradually became less intense over time<sup>5</sup>. This inflammatory reaction can be caused by small amounts of aluminum and / or iron ions present



in the composition of the GICs, since these components have been identified as substances capable of causing oxidative stress within the cells and interfering in the cellular response<sup>12</sup>.

Groups with EERP-containing materials also showed a slower tissue repair reaction (young fibroblasts and collagenization) in relation to group C, in the 7-day time, but without statistical difference with the RC and MC groups. The same was no longer observed in the time of 30 days, where the tissue response was similar between the groups. This process in which there is an increase in the number of fibroblasts and collagen fibers replacing the areas of inflammatory response, edema and necrosis are described as a favorable tissue response in relation to the biological compatibility of materials<sup>5</sup>.

The circulatory changes (edema) and the presence of necrotic tissue were more expressive in the R25 group at 7 days, differing from group C, but it was not present at the time of 15 and 30 days. Other studies, however, did not find significant differences between the tested materials and the control groups for these two parameters<sup>12,14,18</sup>.

In relation to the granulation tissue, the M25 group had a larger amount in the time of 7 days, differing significantly from the C group, and the R50 group in the time of 30 days, differing from the MC and C. Lacerda-Santos *et al.*<sup>12</sup> also observed a granulation tissue densely present in two groups at 7 days, persisting significantly at 15 days. However, these results differ from other studies found in the literature, where there were no significant differences between the presence of granulation tissue in the groups of the tested materials and the control group, at intervals of 7, 15 and 30 days<sup>5,14,18</sup>.

Regarding the presence of multinucleated giant cells, the R10 group showed a significant amount in relation to the R25 and C groups in 15 days. Santos *et al.*<sup>5</sup> also observed a significant difference between groups in the amount of giant cells at all time intervals. Mesquita *et al.*<sup>14</sup> found a significant difference between the groups only in the interval of 30 days. However, other studies did not find significant differences between the groups regarding the number of multinucleated giant cells<sup>12,14,18</sup>. The presence of these cells in the tissues reflects the body's efforts to isolate the foreign body<sup>12</sup>.

In the present study, the histological parameters were evaluated after time intervals of 7, 15 and 30 days, as also observed in other studies<sup>4,6,12,14,18</sup>. The first analysis was performed after 7 days because it is only after this period that a more organized inflammatory reaction can be expected<sup>14,18</sup>. The analyze after 30 days are for the purpose of checking the tissue repair capacity after the aggressive provocation initially caused by the materials tested<sup>4</sup>. When different histopathological parameters of rat subcutaneous tissue are observed at various time

intervals after being in contact with the tested materials, they allow a more accurate evaluation because of the dynamism of the inflammatory reactions<sup>25</sup>.

Immunostaining was more intense in the initial time periods, with the R50 and M50 groups presenting statistical difference in relation to group C, in the time of 7 days, and the groups R10, R50, M and M25, in the time of 15 days, also in relation to group C, remaining until the time of 30 days only for the R50 group. However, no statistically significant differences were observed between the cements containing EERP and the control cements (RC and MC) in the evaluated periods.

This initial inflammatory response reflects the attempt of the tissue to induce the degradation process of the materials by means of the macrophages recruited into the surrounding tissue and towards the surface of the cements. Activated macrophages play an important role in the phagocytosis of these foreign materials, in the recruitment of fibroblasts and in the release of inflammatory mediators<sup>14</sup>.

However, the addition of antimicrobial agents in their composition may interfere with their biological properties. The authors concluded that an orthodontic GIC containing 18% chlorhexidine caused a toxic effect on subcutaneous tissue of rats, but it was not observed in cements containing lower concentrations of this antimicrobial agent<sup>12</sup>.

Propolis-based preparations have been studied for a wide range of applications in various dentistry specialties due to their richness of natural components that give it an antibacterial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, analgesic and healing effect among others<sup>22</sup>. A study that investigated the response of human pulp tissue to propolis found that it was similar to the tissue response to Dycal and MTA<sup>15</sup>. However, there are still few studies in the literature that evaluate the biocompatibility of orthodontic GICs with addition of EEP, especially EERP.

In the present study, the method used to evaluate the biocompatibility of the cements containing EERP was through implantation of the material into subcutaneous tissue of rats. Although this methodology does not faithfully reproduce conditions in the oral cavity, it provides important preliminary information on the biological properties of the materials and characteristic tissue reactions<sup>6,12,14,18,24</sup>.

In the present study, immunohistochemical methods of assessing biocompatibility through the specific identification of macrophages using the CD68 antibody were used, similarly to other studies<sup>14,23</sup>. The immunohistochemical method is considered a more sensitive system for the quantification of inflammatory cells than the traditional methods, since the

technique facilitates the identification of cells, allowing specific evaluations of cellular responses with precision and reliability<sup>23</sup>.

When different histopathological parameters of rat subcutaneous tissue are observed at various time intervals after being in contact with the tested materials, they allow a more accurate evaluation because of the dynamism of the inflammatory reactions<sup>25</sup>. However, given the study limitations and the differences between the animal tissue and the human gingival tissue, it is recommended to carry out new studies, such as clinical trials, in order to enable the use of the material during clinical dental care.

## **CONCLUSION**

The results of the present study showed that the tissues exposed to cements containing EERP presented a tissue reaction similar to that of the tissues exposed to cements that did not contain propolis, demonstrating that they are biocompatible in rat subcutaneous tissue.

## REFERENCES:

1. Andrade JKS, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res Int* 2017;101:129-138.
2. Baig MS, Fleming GJ. Conventional glass-ionomer materials: A review of the developments in glass powder, polyacid liquid and the strategies of reinforcement. *J Dent* 2015;43:897-912.
3. Becci ACO, Marti LM, Zuanon ACC, Brighenti FL, Spolidório DMP, Giro EMA. Influence of the addition of chlorhexidine diacetate on bond strength of a high-viscosity glass ionomer cement to sound and artificial caries-affected dentin. *Rev Odontol UNESP* 2014;43(1):1-7.
4. Costa CA, Ribeiro AP, Giro EM, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater* 2011;27:e158-170.
5. dos Santos RL, de Sampaio GA, de Carvalho FG, Pithon MM, Guenes GM, Alves PM. Influence of degree of conversion on the biocompatibility of different composites in vivo. *J Adhes Dent* 2014;16:15-20.
6. dos Santos RL, Pithon MM, Martins FO, Romanos MT, Ruellas AC. Evaluation of cytotoxicity and degree of conversion of glass ionomer cements reinforced with resin. *Eur J Orthod* 2012;34:362-366.
7. Elgamily H, Ghallab O, El-Sayed H, Nasr M. Antibacterial potency and fluoride release of a glass ionomer restorative material containing different concentrations of natural and chemical products: An in-vitro comparative study. *J Clin Exp Dent* 2018;10:e312-e320.
8. Farret MM, de Lima EM, Mota EG, Oshima HM, Barth V, de Oliveira SD. Can we add chlorhexidine into glass ionomer cements for band cementation? *Angle Orthod* 2011;81:496-502.
9. Grenho L, Barros J, Ferreira C, Santos VR, Monteiro FJ, Ferraz MP, et al. In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. *Biomed Mater* 2015;10:025004.
10. Hafshejani TM, Zamanian A, Venugopal JR, Rezvani Z, Sefat F, Saeb MR, et al. Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations. *J Control Release* 2017;262:317-328.

11. Hatunoglu E, Ozturk F, Bilenler T, Aksakalli S, Simsek N. Antibacterial and mechanical properties of propolis added to glass ionomer cement. *Angle Orthod* 2014;84:368-373.
12. Lacerda-Santos R, de Meneses IH, Sampaio GA, Pithon MM, Alves PM. Effect of degree of conversion on in vivo biocompatibility of flowable resin used for bioprotection of mini-implants. *Angle Orthod* 2016;86:157-163.
13. Machado BAS, Silva RPD, Barreto GdA, Costa SS, Silva DFd, Brandão HN, *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS ONE* 2016;11(1):e0145954.
14. Mesquita JA, Lacerda-Santos R, Sampaio GAM, Godoy GP, Nonaka CFW, Alves PM. Evaluation in vivo of biocompatibility of different resin-modified cements for bonding orthodontic bands. *An Acad Bras Cienc* 2017;89:2433-2443.
15. Parolia A, Kundabala M, Rao NN, Acharya SR, Agrawal P, Mohan M, *et al.* A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J* 2010;55:59-64.
16. Prabhakar AR, Balehosur DV, Basappa N. Comparative Evaluation of Shear Bond Strength and Fluoride Release of Conventional Glass Ionomer with 1% Ethanolic Extract of Propolis Incorporated Glass Ionomer Cement -Invitro Study. *J Clin Diagn Res* 2016;10:ZC88-91.
17. Rodriguez IA, Ferrara CA, Campos-Sanchez F, Alaminos M, Echevarria JU, Campos A. An in vitro biocompatibility study of conventional and resin-modified glass ionomer cements. *J Adhes Dent* 2013;15:541-546.
18. Santos RL, Moura Mde F, Carvalho FG, Guenes GM, Alves PM, Pithon MM. Histological analysis of biocompatibility of ionomer cements with an acid-base reaction. *Braz Oral Res* 2014;28(1):1-7.
19. Shahid S, Hassan U, Billington RW, Hill RG, Anderson P. Glass ionomer cements: effect of strontium substitution on esthetics, radiopacity and fluoride release. *Dent Mater* 2014;30:308-313.
20. Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials* 2003;24:3-9.
21. Topcuoglu N, Ozan F, Ozyurt M, Kulekci G. In vitro antibacterial effects of glass-ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans*. *Eur J Dent* 2012;6:428-433.

22. Wieckiewicz W, Miernik M, Wieckiewicz M, Morawiec T. Does propolis help to maintain oral health? Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:351062.
23. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshida K, Yoshida N, Okiji T. Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. International endodontic journal 2011;44:669-675.
24. Yang WK, Ko HJ, Kim MR. Evaluation of the rat tissue reaction to experimental new resin cement and mineral trioxide aggregate cement. Restor Dent Endod 2012;37:194-200.
25. Zhou J, Tsai YT, Weng H, Baker DW, Tang L. Real time monitoring of biomaterial-mediated inflammatory responses via macrophage-targeting NIR nanoprobe. Biomaterials 2011; 32(35):9383-90.

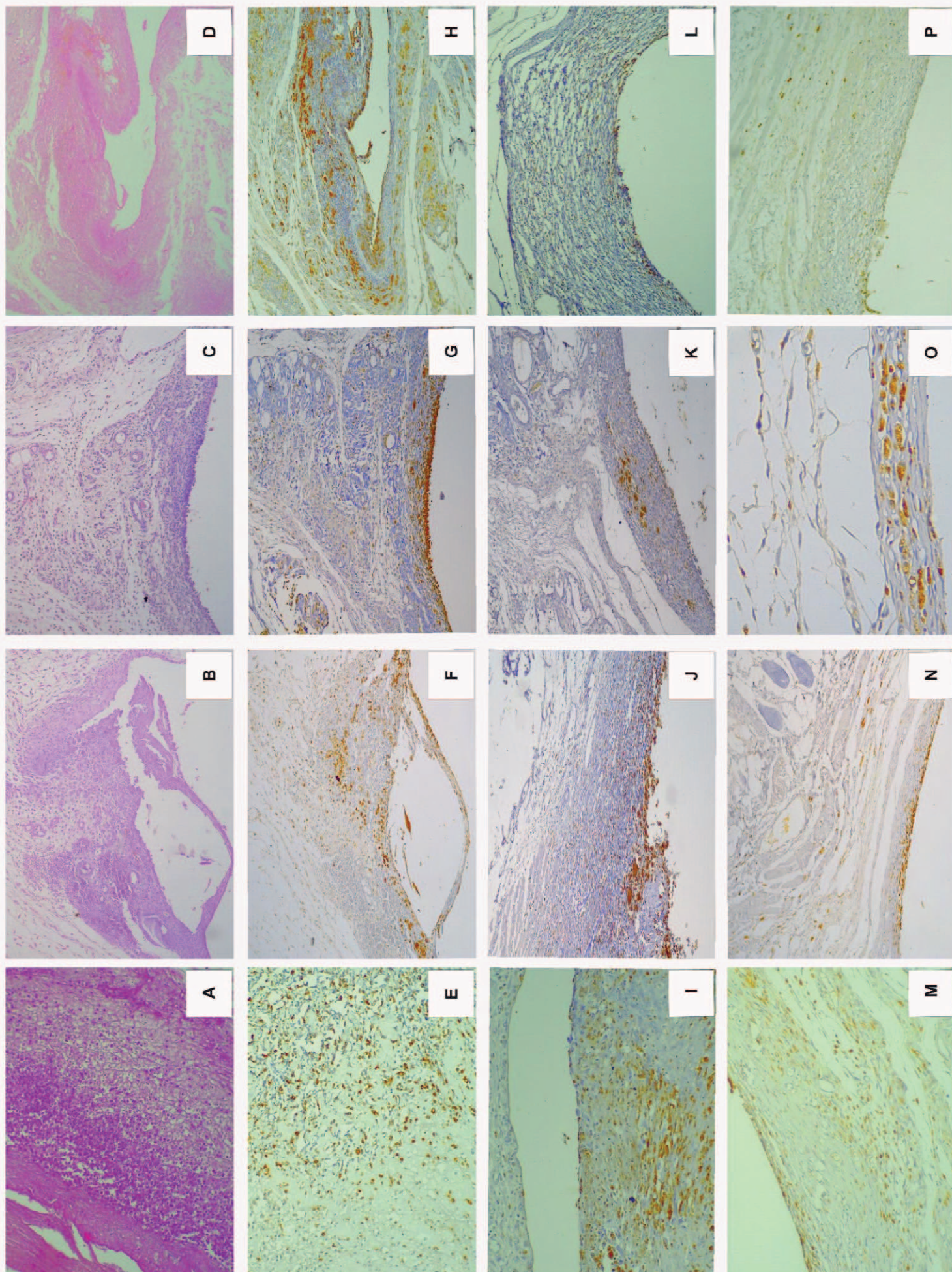
#### ACKNOWLEDGMENT

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support

GIC's	Composition	Brand	Lot
<b>Meron®</b>	Powder: Fluorsilicate glass, aluminum, polyacrylic acid and pigments Liquid: Tartaric acid solution	VOCO, Cuxhaven, Germany	1627583
<b>Riva®</b>	Powder: Aluminum silicate fluoride, polyacrylic acid. Liquid: Tartaric acid solution.	SDI, Bayswater, Australia	150212

Specificity	Clone	Manufacturer	Dilution	Antigen retrieval	Incubation
<b>CD68</b>	ED1	Abcam	1:1500	Citrato, pH 6, 95 <sup>0</sup> , 30 min	60 min







## FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Composition of the tested cements

Figure 2 - Specificity, clone, manufacturer, dilution, antigen retrieval and incubation time of the primary antibody used in the study.

Figure 3: A-D) Photomicrography, at the period of 7 days, of R25, M50, R50 and control groups, respectively (HE, 100x, scale: 200  $\mu$ m). A) R25 group evidencing cavity surrounded by intense chronic inflammatory infiltrate and areas of edema. B and C) M50 and R50 groups, respectively, showing cavity surrounded by moderate chronic inflammatory infiltrate and granulation reaction. D) Control group exhibiting cavity surrounded by necrosis area and moderate chronic inflammatory infiltrate.

E-P) Immunostaining of CD68 at period of 7, 15 and 30 days, respectively (ADVANCED, 100x, scale 200  $\mu$ m). E-H) At period of 7 days, R25, M50, R50 and control groups, respectively, exhibiting intense immunostaining of CD68. I-K) At the period of 15 days, R25, M50 and R50 showing moderate immunostaining of CD68. L) Scarce immunostaining of control group at period of 15 days. M-O) At the period of 30 days, R25, M50 and R50 showing light immunostaining of CD68. P) Scarce immunostaining of control group at period of 30 days.

**TABLES:**

Table 1: Mean of the scores attributed to the cements for the morphological analysis, after the intervals of 7, 15 and 30 days.

	Groups									P*
Evento/ Tempo	RC	R10	R25	R50	MC	M10	M25	M50	C	
Inflammatory Infiltrate										
7 days	17.50 <sup>AB</sup>	20.00 <sup>B</sup>	20.00 <sup>B</sup>	17.50 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>AB</sup>	17.50 <sup>AB</sup>	17.50 <sup>AB</sup>	20.00 <sup>B</sup>	10.00 <sup>A</sup>	0.002
15 days	13.75 <sup>AB</sup>	12.50 <sup>AB</sup>	12.50 <sup>AB</sup>	16.25 <sup>B</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>AB</sup>	12.50 <sup>AB</sup>	7.50 <sup>A</sup>	0.025
30 days	10.00 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>AB</sup>	15.00 <sup>B</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	7.50 <sup>A</sup>	0.006
Edema										
7 days	10.00 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	12.50 <sup>B</sup>	8.75 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	7.50 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	6.25 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	0.001
15 days	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
30 days	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
Necrosis										
7 days	10.00 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>B</sup>	8.75 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	7.50 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	6.25 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	0.001
15 days	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
30 days	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
Granulation Tissue										
7 days	15.00 <sup>AB</sup>	18.75 <sup>AB</sup>	18.75 <sup>AB</sup>	17.50 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>AB</sup>	16.25 <sup>AB</sup>	20.00 <sup>B</sup>	16.25 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>A</sup>	0.005
15 days	12.50	11.25	12.50	13.75	8.75	12.50	12.50	10.00	7.50	0.072
30 days	10.00 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	12.50 <sup>B</sup>	6.25 <sup>A</sup>	8.75 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	7.50 <sup>AB</sup>	6.25 <sup>A</sup>	0.012
Multinucleated Giant Cells										
7 days	6.25	8.75	6.25	8.75	7.50	6.25	8.75	8.75	5.00	0.224
15 days	7.50 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>B</sup>	5.00 <sup>A</sup>	7.50 <sup>AB</sup>	6.25 <sup>AB</sup>	6.25 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>AB</sup>	8.75 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	0.005
30 days	7.50	8.75	7.50	7.50	5.00	6.25	6.25	7.50	5.00	0.371
Young Fibroblasts										
7 days	12.50	12.50	11.25	11.25	13.75	15.00	13.75	13.75	15.00	0.215
15 days	15.00	15.00	16.25	15.00	15.00	15.00	16.25	15.00	16.25	0.606
30 days	15.00 <sup>AB</sup>	15.00 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>AB</sup>	17.50 <sup>B</sup>	11.25 <sup>AB</sup>	16.25 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>A</sup>	0.007
Collagen fibers										
7 days	10.00 <sup>B</sup>	10.00 <sup>B</sup>	10.00 <sup>B</sup>	10.00 <sup>B</sup>	12.50 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>B</sup>	10.00 <sup>B</sup>	15.00 <sup>A</sup>	0.007
15 days	15.00 <sup>AB</sup>	11.25 <sup>B</sup>	17.50 <sup>AB</sup>	16.25 <sup>AB</sup>	16.25 <sup>AB</sup>	15.00 <sup>AB</sup>	13.75 <sup>AB</sup>	17.50 <sup>AB</sup>	18.75 <sup>A</sup>	0.021
30 days	17.50	18.75	16.25	17.50	18.75	17.50	18.75	18.75	20.00	0.585

P \* = Kruskal-Wallis non-parametric test, followed by Dunn's multiple comparison test. Means followed by different letters express a statistically significant difference (P < 0.05).

Table 2: Immunohistochemical analysis of CD68, after the time intervals of 7, 15 and 30 days

	Groups								<i>P</i> *	
	RC	R10	R25	R50	MC	M10	M25	M50	C	
<b>Macrophages</b>										
<b>7 days</b>	84.3 <sup>AB</sup>	95.6 <sup>AB</sup>	117.6 <sup>AB</sup>	<b>145.2<sup>B</sup></b>	98.3 <sup>AB</sup>	111.5 <sup>AB</sup>	88.8 <sup>AB</sup>	<b>172.3<sup>B</sup></b>	<b>20.2<sup>A</sup></b>	<b>0.001</b>
<b>15 days</b>	42.1 <sup>AB</sup>	<b>97.2<sup>B</sup></b>	52.7 <sup>AB</sup>	<b>125.8<sup>B</sup></b>	<b>85.1<sup>B</sup></b>	33.5 <sup>AB</sup>	<b>77.3<sup>B</sup></b>	41.9 <sup>AB</sup>	<b>13.6<sup>A</sup></b>	<b>0.001</b>
<b>30 days</b>	58.2 <sup>AB</sup>	63.1 <sup>AB</sup>	41.8 <sup>AB</sup>	<b>95.0<sup>B</sup></b>	62.0 <sup>AB</sup>	51.8 <sup>AB</sup>	45.1 <sup>AB</sup>	55.1 <sup>AB</sup>	<b>10.6<sup>A</sup></b>	<b>0.009</b>

P \* = Kruskal-Wallis non-parametric test, followed by Dunn's multiple comparison test. Means followed by different letters express a statistically significant difference (P <0.05).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de EEPV 25% demonstrou ser capaz de aumentar a capacidade antimicrobiana dos cimentos contra *S. muntans* e *C. albicans*, sem afetar as suas propriedades mecânicas e sua capacidade de liberação de flúor. Os cimentos ortodônticos com adição de EEPV demonstraram também serem biocompatíveis em tecido subcutâneo de ratos.

## REFERÊNCIAS

AHLUWALIA P.; CHOPRA S.; THOMAS A.M. Strength characteristics and marginal sealing ability of chlorhexidine-modified glass ionomer cement: An in vitro study. **Journal of Indian Society Pedodontics and Preventive Dentistry** v.30, n.1, p.41-46, 2012.

AIKAWA E. Immunohistochemistry. In: DUCHEYNE P, editor. *Comprehensive Biomaterials – Metallic, Ceramic and Polymeric Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Science v.3, p.277-290, 2011.

ALENCAR S.M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology** v.113, n. 2, p.278-283, 2007.

ALMEIDA MESQUITA J. A. *et al.* Morphological and immunohistochemical analysis of the biocompatibility of resin-modified cements. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, n. 5, p. 504-510, 2017.

ALTUNSOY M. *et al.* *In vitro* evaluation of microleakage and microhardness of ethanolic extracts of propolis in different proportions added to glass ionomer cement. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry** v. 40, n. 2, p. 136-140, 2016.

ANDRADE J.K.S. *et al.* Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International** v.101, p. 129-138, 2017.

ATKINSON A.S.; PEARSON G.J. The evolution of glass ionomer cements. **British Dental Journal** v.159, n.10, p.335–337, 1985.

BAIG M.S.; FLEMING G.J.P. Conventional glass-ionomer materials: A review of the developments in glass powder, polyacid liquid and the strategies of reinforcement. **Journal of Dentistry** v.43, n.8, p.897-912, 2015.

BANKOVA V.; POPOVA M.; TRUSHEVA B. New emerging fields of application of propolis. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 1–11, 2016.

BATISTA L.L.V. *et al.* Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões** v. 39, n 6, p 515-520, 2012.

BATISTA C.M. *et al.* The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of Photochemistry & Photobiology, Biology** v. 180, p. 198-207, 2018.

BECCI A.C.O. *et al.* Influence of the addition of chlorhexidine diacetate on bond strength of a high-viscosity glass ionomer cement to sound and artificial caries-affected dentin. **Revista de Odontologia da UNESP** v.43, n.1, p.1-7, 2014.

BEGNINI K.R. *et al.* Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2014, n. 639856, p. 1-13, 2014.

BENGTSON A.L. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de três cimentos de ionômero de vidro. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada** v. 13, n. 1, p. 119-122, 2013.

BISPO JUNIOR W. *et al.* Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Ciências Biológicas e da Saúde** v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

BOAVENTURA J.C.M. *et al.* Tissue response to experimental dental cements prepared from a modified power glass composition. **Dental Materials Journal** v.31, n.4, p.583-92, 2012.

BUENO-SILVA B. *et al.* Effect of neovestitol-vestitol containing brazilian red propolis on biofilm accumulation *in vitro* and dental caries development *in vivo*. **Biofouling** v. 29, n. 10, p. 1-20, 2013.

BUENO-SILVA B. *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **Journal Agricultural and Food Chemistry** v. 61, n. 19, p. 4546-4550, 2013.

BUENO-SILVA *et al.* Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in LPS-activated macrophages. **Plos One** v. 10, n. 12, p.e0144954, 2015.

BUENO-SILVA B. *et al.* Main pathways of action of brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine** v. 23, n. 13, p.1583-1590, 2016.

BUENO-SILVA B. *et al.* Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology** v. 207, p. 100-107, 2017.

BUENO-SILVA B. *et al.* Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. **Journal of Functional Foods** v. 36, p. 440–447, 2017.

CASTILHO A.R.F. *et al.* *In vitro* and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. **Journal of Dentistry** v. 41, n.1, p.155–163, 2013.

CHAU N.P.T. *et al.* Relationship between fluoride release rate and anti-cariogenic biofilm activity of glass ionomer cements. **Dental Materials** v. 31, n. 4, p. e100-108, 2015.

DAS NEVES M.V.M. *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida sp.* **Brazilian Journal of Microbiology** v. 47, n. 1, p. 159-166, 2016.

DAUGSCH *et al.* Brazilian red própolis - chemical composition and botanical origin. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine** v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DEEPALAKSHMI M. *et al.* Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: An in-vitro study. **Indian Journal Dental Research** v.21, n.4, p.552-556, 2010.

DO NASCIMENTO *et al.* Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some comercial extract of própolis. **Journal of Apicultural Research** v. 57, n. 2, p. 246-254, 2018.

DOS SANTOS R.L. *et al.*, Evaluation of cytotoxicity and degree of conversion of glass ionomer cements reinforced with resin. **European Journal of Orthodontics** v. 34, n. 3, p. 362-366, 2012.

DUAILIBE S.A.; GONCALVES A.G.; AHID F.J. Effect of a própolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. **Journal Apple Oral Science** v 15, n. 5, p. 420–423, 2007.

DUQUE C. *et al.* In vitro and in vivo evaluations of glass-ionomer cement containing chlorhexidine for atraumatic restorative treatment. **Journal of Applied Oral Science** v. 25, n. 5, p. 541-550, 2017.

ELGAMILY H. *et al.* Antibacterial potency and fluoride release of a glass ionomer restorative material containing different concentrations of natural and chemical products: An *in-vitro* comparative study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry** v. 10, n. 4, p. e312-e320, 2018.

ENAN E.T.; HAMMAD S.M. Microleakage under orthodontic bands cemented with nano-hydroxyapatite-modified glass ionomer an *in vivo* study. **Angle Orthodontic** v. 83, n. 6, p. 981-986, 2013.

FARRET M.M. *et al.* Can we add chlorhexidine into glass ionomer cements for band cementation? **Angle Orthodontist** v. 81, n. 3, p. 496-502, 2011.

FARRET M.M. *et al.* Assessment of the mechanical properties of glass ionomer cements for orthodontic cementation. **Dental Press Journal of Orthodontics** v.17, n.6, p.154-159, 2012.

FRANCHI G.C. *et al.* Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2012, n. 918956, p. 1-6, 2012.

FRANCHIN M. *et al.* Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports** v. 6, n. 36401, p.1-12, 2016.

FREIRES I.A.; ALENCAR S.M.; ROSALEN P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 110, p. 267-279, 2016.

FRENCKEN J.E. *et al.* Antibacterial effect of chlorhexidine-containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study. **Caries Research** v.41, n.1, p.102–107, 2007.

- FÚCIO S.B.P. *et al.* *Streptococcus mutans* biofilm influences on the antimicrobial properties of glass ionomer cements. **Brazilian Dental Journal** v. 27, n. 6, p. 681-687, 2016.
- GARCIA L.F.R. *et al.* Synthesis and biocompatibility of an experimental glass ionomer cement prepared by a non-hydrolytic sol-gel method. **Brazilian Dental Journal** v.21, n.6, p.499-507, 2010.
- GONÇALVES T.S. *et al.* Differences of cytotoxicity of orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomedic Research International** v.2014, n.143283, p.1-7, 2014.
- GRENHO L. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity and biocompatibility of própolis containing nanohydroxyapatite. **Biomedichal Material** v. 10, n. 2, p. 1-8, 2015.
- GUIMARÃES A.G.; SERAFINI M.R.; QUINTANS-JUNIOR L.J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents** v. 24, n. 3, p. 243-65, 2014.
- HAFSHEJANI T.M. *et al.* Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations. **Journal of Controlled Release** v. 262, p. 317-328, 2017.
- HATUNOGLU E. *et al.* Antibacterial and mechanical properties of propolis added to glass ionomer cement. **Angle Orthodontist** v. 84, n. 2, p 368-373, 2014.
- HEGDE K.S. *et al.* Effect of propolis on *Streptococcus mutans* counts: an *in vivo* study. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry** v. 6, n. 1, p. 22-5, 2013.
- HOOK E.R. *et al.* Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology** v.12, n.3, p.1-9, 2014.
- IBRAGUIMOV A. *et al.* Stability analysis of a model for foreign body fibrotic reactions. **Computational and Mathematical Methods in Medicine** v.13, n.6, p.01-11, 2012.
- KAMIYA T. *et al.* Ethanol extract of brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer mcf- 7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 60, p. 11065–11070, 2012.
- KLAI S. *et al.* Antimicrobial effects of dental luting glass ionomer cements on *Streptococcus mutans*. **Scientific World Journal** v. 23, n. 1, p. 1-7, 2014.
- KOLE L. *et al.* Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFkB nuclear translocation. **European Journal of Pharmacology** v. 653, p. 8-15, 2011.
- LACERDA-SANTOS R. *et al.* Estudo in vitro da captação e liberação de flúor de cimentos ionoméricos reforçados com resina. **Orthodontic Science Practice** v. 8, n. 29, p. 60-64, 2015.



LACERDA-SANTOS R. *et al.* Effect of degree of conversion on in vivo biocompatibility of flowable resin used for bioprotection of mini-implants. **The Angle Orthodontist**, v. 86, n. 1 p. 157-163, 2016.

LACERDA-SANTOS R. *et al.* Effect of different concentrations of chlorhexidine in glass-ionomer cements on in vivo biocompatibility. **Journal of Adhesive Dentistry** v. 18, n. 4, p. 325-330, 2016.

LEWINSTEIN I. *et al.* Incorporation of chlorhexidine diacetate in provisional cements: antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and the effect on tensile strength in vitro. **International Endodontics Journal** v. 45, n. 1, p. 1010-1017, 2012.

MACHADO B.A.S. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One** v.8, n.1, p.1-26, 2016.

MANOLEA H. *et al.* Immunohistochemical aspects of the evaluation of the inflammatory answer of the dental pulp. **Romanian Journal of Morphology Embryology** v.50, n.2, p.207-212, 2009.

MARTI L.M. *et al.* Addition of chlorhexidine gluconate to a glass ionomer cement: a study on mechanical, physical and antibacterial properties. **Brazilian Dental Journal** v. 25, n. 1, p. 33-37, 2014.

MARTINS M.L. *et al.* Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. **Archives of Oral Biology** v. 93, p. 56–65, 2018.

MATOS L.L. *et al.* Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. **Biomark Insights** v. 9, n. 5, p. 9-20, 2010.

MENDONÇA I.C.G. *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complement Alternative Medicine** v. 15, n. 357, p.1-12, 2015.

MESQUITA J. A. *et al.* Evaluation in vivo of biocompatibility of differents resin modified cements for bonding orthodontic bands. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 89, n.3, p. 2433-2443, 2017.

MILLETT D.T. *et al.* *In vitro* comparison of orthodontic band cements. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics** v. 123, n. 1, p. 15-20, 2003.

MISHA A.; PANDEY R.K.; MANICKAM N. Antibacterial effect and physical properties of chitosan and chlorhexidine-cetrimide-modified glass ionomer cements. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry** v. 35, n. 1, p. 28-33, 2017.

MOURA M.S.; SIMPLÍCIO A.H.M.; CURY J.A. *In vivo* effects of fluoridated antiplaque dentifrice and bonding material on enamel demineralization adjacent to orthodontic

appliances. **American Journal Orthodontics Dentofacial Orthopedics** v. 130, n. 3, p. 357-363, 2006.

MURRAY P.J.; WYNN T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology** v.11, n.11, p.723-737, 2012.

NAKAJO K. *et al.* Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. **Dental Materials** v.25, n.1, p.703-708, 2009.

NANI B.D. *et al.* Isoflavonoids from brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. **Phytotherapy Research** v. 32, n. 4, p. 750-754, 2017.

NICHOLSON J.W. Chemistry of glass-ionomer cements: a review. **Biomaterials** v. 19, p. 485-494, 1998.

NUNES L.C.C. *et al.* Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 19, n 2B, p 524-529, 2009.

OLIVEIRA A.C.P. *et al.* Antifungal activity of própolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 101, n. 5, p 493-497, 2006.

PARK Y.K.; ALENCAR S.M.; AGUIAR C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.50, n. 9, p. 2502–2506, 2002.

PITHON M.M. *et al.* Avaliação da resistência ao cisalhamento de dois compósitos colados em superfície condicionada com primer autocondicionante. **Dental Press Journal Orthodontics** v. 16, n. 2, p. 94-99, 2011.

PIPPI B. *et al.* In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology** v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015.

PRABHAKAR A.R.; BALEHOSUR D.B.; BASSAPAR N. Comparative evaluation of shear bond strength and fluoride release of conventional glass ionomer with 1% ethanolic extract of propolis incorporated glass ionomer cement – in vitro study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** v.10, n.5, p.88-91, 2016.

PRABHAVATH V. *et al.* Orthodontic cements and demineralization: an *in vitro* comparative scanning electron microscope study. **Journal of International Oral Health** v. 7, n. 2, p. 28-32, 2015.

REGUEIRA NETO *et al.* Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology** v. 107, part B, p. 572-580, 2017.

RODRIGUEZ I.A., *et al.* An *in vitro* biocompatibility study of conventional and resin-modified glass ionomer cements. **Journal Adhesive Dentistry** v.15, n.6, p.541-546, 2013.

RUFANO *et al.* Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** v. 7, n. 7, p. 591-598, 2017.

SAMPAIO G.A.M. **Análise das propriedades mecânicas e da biocompatibilidade de cimentos ortodônticos modificados por clorexidina** 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SANTOS R.L. *et al.* Histological analysis of biocompatibility of ionomer cements with an acid-base reaction. **Brasilian Oral Research**. v. 28, n. 1, p. 1-7, 2014.

SENA-LOPES *et al.* Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **PLoS One** v. 13, n. 2, p. e0191797, 2018.

SFONDRINE M.F. *et al.* *In vitro* bond strength evaluation of four orthodontic cements. **Journal Adhesive Dentistry** v.12, n.2, p.131-135, 2010.

SHAHID S. *et al.* Glass ionomer cements: Effect of strontium substitution on esthetics, radiopacity and fluoride release. **Dental Materials** v. 30, n. 3, p. 308-313, 2014.

SILVA R.P.D. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One** v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

SUBRAMANIAM P. *et al.* Does addition of propolis to glass ionomer cement alter its physicommechanical properties? an *in vitro* study. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry** v. 40, n. 5, p. 400-403, 2016.

TOPCUOGLU N. *et al.* *In vitro* antibacterial effects of glass-ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans*. **European of Journal Dentistry** v. 6, n. 4, p. 428-433, 2012.

TROCA V.B.P.B. *et al.* Effect of green propolis addition to physical-mechanical properties of glass ionomer cements. **Journal Apple Oral Science** v. 19, n. 2, p. 100-105, 2011.

TURKUN L.S. *et al.* Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. **Journal of Esthetic Restorative Dentistry** v.20, n.1, p.29-44, 2008.

TUZUNER T. *et al.* Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. **Journal Esthetic Restorative Dentistry** v. 23, n.1, p. 46-56, 2011.

VELLINI-FERREIRA F.; COTRIM-FERREIRA F.; COTRIM-FERREIRA A. *Ortodontia Clínica: Tratamento com aparelhos fixos*. São Paulo: Artes Médicas, 2013.

WILSON A.D.; BATCHELOR R.F. Dental silicate cements I. The chemistry of erosion. **Journal of Dental Research** v.46, n.5, p.1078–1085, 1967.

WILSON A.D.; KENT B.E. The glass- ionomer cement: a new translucent dental filling material. **Journal of Applied Chemistry and Biotechnology** v.21, n.11, p. 313-314, 1971.

YAMANAKA Y. *et al.* Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. **International Endodontics Journal** v.44, n.7, p.669–675, 2011.

YESILYURT C. *et al.* Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. **Operative Dentistry** v. 34, n.1, p. 18-23, 2009.

ZHOU J. *et al.* Real time monitoring of biomaterial-mediated inflammatory responses via macrophage-targeting NIR nanoprobe. **Biomaterials** v.32, n.35, p.9383-9390, 2011.



## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)

ISSN 0103-6440 *versão impressa*  
ISSN 1806-4760 *versão online*

### Escopo e política

O Brazilian Dental Journal é um periódico científico revisado por pares (sistema duplo-cego) que publica Documentos Originais Completos, Comunicações Curtas, Relatórios de Casos e Críticas Convidadas, tratando os diversos campos da Odontologia ou áreas relacionadas, com acesso aberto. Serão considerados para publicação apenas artigos originais. Na submissão de um manuscrito, os autores devem informar em carta de encaminhamento que o material não foi publicado anteriormente e não está sendo considerado para publicação em outro periódico, quer seja no formato impresso ou eletrônico.

ENDEREÇO ELETRÔNICO PARA SUBMISSÃO:

<http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>

SERÃO CONSIDERADOS APENAS TRABALHOS REDIGIDOS EM INGLÊS. Autores cuja língua nativa não seja o Inglês, devem ter seus manuscritos revisados por profissionais proficientes na Língua Inglesa.

**Os trabalhos aceitos para publicação serão submetidos à Revisão Técnica, que compreende revisão lingüística, revisão das normas técnicas e adequação ao padrão de publicação do periódico. O custo da Revisão Técnica será repassado aos autores. A submissão de um manuscrito ao BDJ implica na aceitação prévia desta condição.** A decisão de aceitação para publicação é de responsabilidade dos Editores e baseia-se nas recomendações do corpo editorial e/ou revisores "ad hoc". Os manuscritos que não forem considerados aptos para publicação receberão um e-mail justificando a decisão. Os conceitos emitidos nos trabalhos publicados no BDJ são de responsabilidade exclusiva dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do corpo editorial.

Todos os manuscritos serão submetidos a revisão por pares. Autores e revisores serão mantidos anônimos durante o processo de revisão. Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista.

Brazilian Dental Journal é um jornal de acesso aberto, o que significa que todos os artigos publicados estão disponíveis gratuitamente na Internet imediatamente após a publicação.

O Brazilian Dental Journal manterá os direitos autorais e editoriais de todos os artigos publicados, incluindo traduções. Os usuários podem usar, reutilizar e construir sobre o material publicado na revista, mas apenas para fins não comerciais e desde que a fonte seja claramente e adequadamente mencionada.

A Revista adota sistema para identificação de plágio (AntiPlagiarist - ACNP Software).

O Brazilian Dental Journal está indexado na base de dados DOAJ para acesso público.

## Forma e preparação de manuscritos

### AS NORMAS DESCRITAS A SEGUIR DEVERÃO SER CRITERIOSAMENTE SEGUIDAS.

#### GERAL

- Submeter o manuscrito em Word e em PDF, composto pela página de rosto, texto, tabelas, legendas das figuras e figuras (fotografias, micrografias, desenhos esquemáticos, gráficos e imagens geradas em computador, etc).
- O manuscrito deve ser digitado usando fonte Times New Roman 12, espaço entrelinhas de 1,5 e margens de 2,5 cm em todos os lados. **NÃO UTILIZAR** negrito, marcas d'água ou outros recursos para tornar o texto visualmente atrativo.
- As páginas devem ser numeradas seqüencialmente, começando no *Summary*.
- Trabalhos completos devem estar divididos sequencialmente conforme os itens abaixo:
  1. Página de Rosto
  2. Summary e Key Words
  3. Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão
  4. Resumo em Português (obrigatório apenas para os autores nacionais)
  5. Agradecimentos (se houver)
  6. Referências
  7. Tabelas
  8. Legendas das figuras
  9. Figuras
- Todos os títulos dos capítulos (Introdução, Material e Métodos, etc) em letras maiúsculas e sem negrito.
- Resultados e Discussão **NÃO** podem ser apresentados conjuntamente.
- Comunicações rápidas e relatos de casos devem ser divididos em itens apropriados.
- Produtos, equipamentos e materiais: na primeira citação mencionar o nome do fabricante e o local de fabricação completo (cidade, estado e país). Nas demais citações, incluir apenas o nome do fabricante.
- Todas as abreviações devem ter sua descrição por extenso, entre parênteses, na primeira vez em que são mencionadas.

#### **PÁGINA DE ROSTO**

- A primeira página deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, nome dos autores (máximo 6), Departamento, Faculdade e/ou Universidade/Instituição a que pertencem (incluindo cidade, estado e país). **NÃO INCLUIR** titulação (DDS, MSc, PhD etc) e/ou cargos dos autores (Professor, Aluno de Pós-Graduação, etc).
- Incluir o nome e endereço **completo** do autor para correspondência (**informar e-mail, telefone e fax**).
- A página de rosto deve ser incluída em arquivo separado do manuscrito.

#### **MANUSCRITO**

- **O manuscrito deve conter:**  
A primeira página do manuscrito deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, sem o nome dos autores.



## SUMMARY

- A segunda página deve conter o *Summary* (resumo em Inglês; máximo 250 palavras), em redação contínua, descrevendo o objetivo, material e métodos, resultados e conclusões. Não dividir em tópicos e não citar referências.
- Abaixo do *Summary* deve ser incluída uma lista de Key Words (5 no máximo), em letras minúsculas, separadas por vírgulas.

## INTRODUÇÃO

- Breve descrição dos objetivos do estudo, apresentando somente as referências pertinentes. Não deve ser feita uma extensa revisão da literatura existente. As hipóteses do trabalho devem ser claramente apresentadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

- A metodologia, bem como os materiais, técnicas e equipamentos utilizados devem ser apresentados de forma detalhada. **Indicar os testes estatísticos utilizados neste capítulo.**

## RESULTADOS

- Apresentar os resultados em uma seqüência lógica no texto, tabelas e figuras, enfatizando as informações importantes.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto.
- Tabelas e figuras devem trazer informações distintas ou complementares entre si.
- Os dados estatísticos devem ser descritos neste capítulo.

## DISCUSSÃO

- Resumir os fatos encontrados sem repetir em detalhes os dados fornecidos nos Resultados.
- Comparar as observações do trabalho com as de outros estudos relevantes, indicando as implicações dos achados e suas limitações. Citar outros estudos pertinentes.
- Apresentar as conclusões no final deste capítulo. Preferencialmente, as conclusões devem ser dispostas de forma corrida, isto é, evitar citá-las em tópicos.

## RESUMO (em Português) - Somente para autores nacionais

O resumo em Português deve ser **IDÊNTICO** ao resumo em Inglês (Summary). OBS: **NÃO COLOCAR** título e palavras-chave em Português.

## AGRADECIMENTOS

O Apoio financeiro de agências governamentais deve ser mencionado. Agradecimentos a auxílio técnico e assistência de colaboradores podem ser feitos neste capítulo.

## REFERÊNCIAS

- As referências devem ser apresentadas de acordo com o estilo do **Brazilian Dental Journal**. É recomendado aos autores consultar números recentes do BDJ para se familiarizar com a forma de citação das referências.
- As referências devem ser numeradas por ordem de aparecimento no texto e citadas entre parênteses, sem espaço entre os números: (1), (3,5,8), (10-15). **NÃO USAR SOBRESCRITO.**
- Para artigos com dois autores deve-se citar os dois nomes sempre que o artigo for referido. Ex: "According to Santos **and** Silva (1)..." Para artigos com três ou mais autores, citar apenas

- o primeiro autor, seguido de "et al.". Ex: "Pécora et al. (2) reported that..."
- Na lista de referências, os nomes de TODOS OS AUTORES de cada artigo devem ser relacionados. Para trabalhos com 7 ou mais autores, os 6 primeiros autores devem ser listados seguido de "et al."
  - A lista de referências deve ser digitada no final do manuscrito, em sequência numérica. Citar **NO MÁXIMO** 25 referências.
  - A citação de abstracts e livros, bem como de artigos publicados em revistas não indexadas deve ser evitada, a menos que seja absolutamente necessário. **Não citar referências em Português.**
  - Os títulos dos periódicos devem estar abreviados de acordo com o Dental Index. O estilo e pontuação das referências devem seguir o formato indicado abaixo:

#### *Periódico*

1. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. A novel method for the evaluation of powered toothbrush oscillation characteristics. Am J Dent 2004;17:307-309.

#### *Livro*

2. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1983.

#### *Capítulo de Livro*

3. Walton RE, Rotstein I. Bleaching discolored teeth: internal and external. In: Principles and Practice of Endodontics. Walton RE (Editor). 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p 385-400.

### **TABELAS**

- As tabelas com seus respectivos títulos devem ser inseridas após o texto, numeradas com algarismos arábicos; **NÃO UTILIZAR** linhas verticais, negrito e letras maiúsculas (exceto as iniciais).
- O título de cada tabela deve ser colocado na parte superior.
- Cada tabela deve conter toda a informação necessária, de modo a ser compreendida independentemente do texto.

### **FIGURAS**

- **NÃO SERÃO ACEITAS FIGURAS INSERIDAS EM ARQUIVOS ORIGINADOS EM EDITORES DE TEXTO COMO O WORD E NEM FIGURAS EM POWER POINT;**
- Os arquivos digitais das imagens devem ser gerados em Photoshop, Corel ou outro software similar, com extensão TIFF e resolução mínima de 300 dpi. Apenas figuras em PRETO E BRANCO são publicadas. Salvar as figuras no CD-ROM.
- Letras e marcas de identificação devem ser claras e definidas. Áreas críticas de radiografias e fotomicrografias devem estar isoladas e/ou demarcadas.
- Partes separadas de uma mesma figura devem ser legendadas com letras maiúsculas (A, B, C, etc). Figuras simples e pranchas de figuras devem ter largura mínima de 8 cm e 16 cm, respectivamente.
- As legendas das figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos e apresentadas em uma página separada, após a lista de referências (ou após as tabelas, quando houver).

### **Envio de manuscritos**

#### **CHECAR OS ITENS ABAIXO ANTES DE ENVIAR O MANUSCRITO À REVISTA**

1. Carta de submissão.



2. Página de rosto.

3. Manuscrito (incluindo tabelas e legendas).

4. No manuscrito, observar:

- identificação dos autores somente na página de rosto.
- texto digitado em fonte Times New Roman 12, espaço entrelinhas de 1,5 e margem de 2,5 cm em todos os lados.
- tabelas, legendas e figuras ao final do texto.

5. Os arquivos digitais as figuras em preto e branco, salvas em TIFF, com resolução mínima de 300 dpi.

Não há taxas para submissão e avaliação de artigos.

A Taxa de Revisão técnica varia de R\$ 450,00 a R\$ 500,00 Reais Brasileiros (para autores nacionais) ou U\$ 200 a U\$ 300 Dólares Americanos (para autores estrangeiros) e será cobrada do autor correspondente, ainda que apenas pequenas correções no manuscrito sejam necessárias.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**Fundação Odontológica de Ribeirão Preto**  
**Av. do Café, S/N**  
**14040-904 Ribeirão Preto SP Brasil**  
**Tel.: (55 16) 3602-3982**  
**Fax: (55 16) 3633-0999**



[bdj@forp.usp.br](mailto:bdj@forp.usp.br)

## The Journal of Adhesive Dentistry

### GUIDELINES FOR AUTHORS

*The Journal of Adhesive Dentistry* is a bi-monthly journal that publishes scientifically sound articles of interest to practitioners and researchers in the field of adhesion to hard and soft dental tissues. The Journal publishes several types of peer-reviewed original articles:

1. **Clinical and basic science research reports** – based on original research in adhesive dentistry and related topics.
2. **Reviews topics** – on topics related to adhesive dentistry
3. **Short communications** – of original research in adhesive dentistry and related topics. Max. 4 printed pages, including figures and references (max. characters 18,000). High priority will be given to the review of these papers to speed publication.
- 4a. **Invited focus articles** – presenting a position or hypothesis on a basic science or clinical subject of relevant related topics. These articles are not intended for the presentation of original results, and the authors of the articles are selected by the Editorial Board.
- 4b. **Invited commentaries** – critiquing a focus article by addressing the strong and weak points of the focus article. These are selected by the Editorial Board in consultation with the focus article author, and the focus article and the commentaries on it are published in sequence in the same issue of the Journal.
5. **Invited guest editorials** – may periodically be solicited by the Editorial Board.
6. **Proceedings of symposia, workshops, or conferences** – covering topics of relevance to adhesive dentistry and related topics.
7. **Letters to the Editor** – may be submitted to the editor-in-chief; these should normally be no more than 500 words in length.

### SUBMISSION INSTRUCTIONS

Submission of manuscripts in order of preference:

1. Submission via online submission service ([www.manuscriptmanager.com/jadd](http://www.manuscriptmanager.com/jadd)). Manuscript texts should be uploaded as PC-word files with tables and figures preferably embedded within the PC-word document. A broad range of file formats are acceptable. No paper version required but high resolution photographs or illustrations should be sent to the editorial office (see below). Online submissions are automatically uploaded into the editorial office's reviewer assignment schedule and are therefore processed immediately upon upload.
2. Submission via e-mail as a PC-word document ([wintonowycz@quintessenz.de](mailto:wintonowycz@quintessenz.de)). Illustrations can be attached in any format that can be opened using Adobe Photoshop (TIF, GIF, JPG, PSD, EPS etc.) or as Microsoft PowerPoint Documents (ppt). No paper version required but high resolution photographs or illustrations should be sent to the editorial office.
3. One paper copy of the manuscript plus a floppy diskette or CD-ROM (mandatory) containing a PC-word file of the manuscript text, tables and legends. Figures should be included on the disk if possible in any format that can be opened using Adobe Photoshop (Tif, Gif, Jpg, Psd, Eps etc.) or as a Microsoft PowerPoint Document (ppt)

### Mailing address:

Quintessenz Verlags-GmbH, Karin Wintonowycz  
The Journal of Adhesive Dentistry,  
Ifenpfad 2-4, D-12107 Berlin, Germany

Illustrations that cannot be sent electronically will be scanned at the editorial office so that they can be sent to reviewers via e-mail along with the manuscript to expedite the evaluation process.

Resubmitted manuscripts should also be submitted in the above manner. Please note that supplying electronic

versions of your tables and illustrations upon resubmission will assure a faster publication time if the manuscript is accepted.

**Review/editing of manuscripts.** Manuscripts will be reviewed by the editor-in-chief and at least two reviewers with expertise within the scope of the article. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

**Adherence to guidelines.** Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

### MANUSCRIPT PREPARATION

- The Journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126: 36-47).
- **Title page.** The first page should include the title of the article (descriptive but as concise as possible) and the name, degrees, job title, professional affiliation, contribution to the paper (e.g., idea, hypothesis, experimental design, performed the experiments in partial fulfillment of requirements for a degree, wrote the manuscript, proofread the manuscript, performed a certain test, consulted on and performed statistical evaluation, contributed substantially to discussion, etc.) and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- **3-8 keywords.**
- **Structured abstract.** Include a maximum 250-word structured abstract (with headings *Purpose, Materials and Methods, Results, Conclusion*).
- **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.
- **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
- **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
- **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
- **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer should be included parenthetically at first mention.
- **Clinical Relevance.** Please include a very brief (2 sentences or 3 lines) clinical relevance statement.

### REFERENCES

- **All references must be cited** in the text, according to the alphabetical and numerical reference list.
- **The reference list** should appear at the end of the article, in alphabetical and numerical sequence.
- **Do not include unpublished data** or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- **Avoid using abstracts** as references.
- **Provide complete information** for each reference,

including names of all authors. If the reference is part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

### Journal reference style:

1. Turp JC, Kowalski CJ, Stohler CS. Treatment-seeking patterns of facial pain patients: Many possibilities, limited satisfaction. *J Orofacial Pain* 1998;12:61-66.

### Book reference style:

1. Hannam AG, Langenbach GEJ, Peck CC. Computer simulations of jaw biomechanics. In: McNeill C (ed). *Science and Practice of Occlusion*. Chicago: Quintessenz, 1997:187-194.

### ILLUSTRATIONS

- All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance.
- Submitted figures should meet the following minimum requirements:
  - High-resolution images should have a width of 83 mm and 300 dpi (for column size).
  - Graphics (bar diagrams, schematic representations, drawings) wherever possible should be produced in Adobe Illustrator and saved as AI or EPS files.
  - All figures and graphics should be separate files – not embedded in Word or Power Point documents.

Upon article acceptance, high-resolution digital image files must be sent via one of the following ways:

1. As an e-mail attachment, if the files are not excessively large (not more than 10 MB), to our production department: [Steinbrueck@quintessenz.de](mailto:Steinbrueck@quintessenz.de)
2. Online File Exchange Tool: Please send your figures with our Online File Exchange Tool. This web tool allows you to upload large files (< 350.0 MB) to our server. Please archive your figures with a maximum size of 350 MB first. Then upload these archives with the following link: <http://files.qvnet.de/JAD/>, password: IAAD. Please name the archive with your name and article number so we can identify the figures.

**Line drawings**—Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction. Good-quality computer-generated laser prints are acceptable (no photocopies); also provide electronic files (eps, ai) if possible. Lines within graphs should be of a single weight unless special emphasis is needed.

**Legends**—Figure legends should be grouped on a separate sheet and typed double-spaced.

### TABLES

- Each table should be logically organized, on a separate sheet, and numbered consecutively.
- The title and footnotes should be typed on the same sheet as the table.

### MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form, signed by all authors, must accompany all submitted manuscripts before they can be reviewed for publication. Electronic submission: scan the signed form and submit as JPG or TIF file.

### PERMISSIONS & WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification. For clinical studies the approval of the ethics committee must be presented.

### PAGE CHARGE

The first 8 printed pages in an article are free of charge. For excess pages, the charge is €140 per printed page. The approximate number of characters on a printed page is approximately 6,800. Please also consider the number and size of illustrations.

---

**The Journal of  
Adhesive Dentistry**

**MANDATORY SUBMISSION FORM**

**Title of article:** \_\_\_\_\_

**A signature below certifies compliance with the following statements:**

**Copyright transfer.** In consideration of the acceptance of the above work for publication, I do hereby assign and transfer to Quintessence Publishing Company all rights, title, interest in and copyright to the above-titled work. This assignment applies to all translations of said article as well as to preliminary display/posting of the abstract of the accepted article in electronic form before publication. If any changes in authorship (order, deletions, or additions) occur after the manuscript is submitted, agreement by all authors for such changes must be on file with the Publisher. An author's name may be removed only at his/her request. (Note: material prepared by employees of the US Government in the course of their official duties cannot be copyrighted.)

**Author responsibilities.** I attest that:

The manuscript is original work without fabrication, plagiarism, or fraud;

The manuscript is not currently under consideration elsewhere and the research reported will not be submitted for publication elsewhere unless a final decision is made by the Journal that the manuscript is not acceptable;

I have made a significant scientific contribution to the study and I am thoroughly familiar with the primary data outlined in the manuscript;

I have read the complete manuscript and take responsibility for the content and completeness of the final submitted manuscript and understand that if the manuscript, or part of the manuscript, is found to be faulty or fraudulent, I share responsibility.

**Conflict of interest disclosure.** All institutional or corporate affiliations of mine and all funding sources supporting the work are acknowledged. Except as disclosed in the separate enclosed letter, I certify that I have no commercial associations (eg, consultancies, patent-licensing arrangements, equity interests) that might represent a conflict of interest in connection with the submitted manuscript (letter attached).

**Experimental procedures in humans and animals.** The Journal endorses the principles embodied in the Declaration of Helsinki and insists that all investigations involving human beings reported in articles in the Journal be carried out in conformity with these principles and with similar principles such as those of the American Physiological Society, eg, see *J Neurophysiol* 1997;78(6). In the case of animal experiments reported in the Journal, these should also conform to these latter principles or with analogous principles such as those of the Canadian Council on Animal Care or The International Association for the Study of Pain. In articles reporting experiments involving surgical procedures on animals, the type and dosage of anesthetic agent used must be specified in the Materials and Methods section, and evidence must be provided that anesthesia of suitable grade and duration was achieved. Authors reporting on their experimental work in humans or animals should also cite evidence in the Materials and Methods section of the article that this work has been approved by, respectively, an institutional clinical/human experimentation panel or an institutional animal care and use panel (or equivalent). The editor-in-chief and associate editors are expected to refuse articles in which there is no clear evidence that these principles have been adhered to, and they reserve the right to judge the appropriateness of the use of human beings and animals in experiments reported in articles submitted to the Journal.

**Signature of each author required in the same order as on the manuscript title page** (Fax signatures, multiple forms are acceptable). For more than 5 authors, use an extra sheet.

Signature (1) _____	Print name _____	Date _____
Signature (2) _____	Print name _____	Date _____
Signature (3) _____	Print name _____	Date _____
Signature (4) _____	Print name _____	Date _____
Signature (5) _____	Print name _____	Date _____

**Corresponding author** \_\_\_\_\_ **Mailing address** \_\_\_\_\_

Phone \_\_\_\_\_

Fax \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_