



unopar

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

JOYCE SAYURI YAMADA LEONCIO

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO  
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO CONTENDO EXTRATO  
DE SEMENTE DE UVA**

---

Londrina  
2016

JOYCE SAYURI YAMADA LEONCIO

**Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana do cimento de ionômero de vidro contendo extrato de semente de uva**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Danil Guiraldo

Londrina

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação**  
**Universidade Norte do Paraná**  
**Biblioteca Central**  
**Setor de Tratamento da Informação**

L597e Leoncio, Joyce Sayuri Yamada  
Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana do cimento de  
ionômero de vidro contendo extrato de semente de uva./ Joyce  
Sayuri Yamada Leoncio. Londrina: [s.n], 2017  
35f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Norte do  
Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Danil Guiraldo

1 - Odontologia – dissertação de mestrado- UNOPAR 2-  
Cimentos de ionômeros de vidro 3- Extratos de sementes de uva 4-  
Tratamento restaurador dentário atraumático 5-*Streptococcus*  
*mutans* I- Guiraldo, Ricardo Danil; orient. II- Universidade Norte do  
Paraná.

JOYCE SAYURI YAMADA LEONCIO

**Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana do cimento de ionômero de vidro contendo extrato de semente de uva**

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Odontologia, área de concentração em Dentística, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

---

Prof. Dr. Ricardo Danil Guiraldo  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof. Dr. Alcides Gonini Júnior  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof. Dr. Roberto Prescinotti  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 16 de Dezembro de 2016.

## **Dedicatória**

A **DEUS**, acima de tudo, por me permitir vivenciar mais este momento importante em minha vida e que me fez entender que o tempo DELE é muito diferente do meu, mas que sempre vale a pena esperar.

Ao meu **marido Gustavo**, por sua existência, por estar sempre ao meu lado, pelo respeito e paciência. Sempre presente em minha vida, com amor e carinho contribuiu decisivamente para que esta dissertação pudesse ser concluída.

Aos **meus pais**, exemplos de vida e dignidade e que sempre me apoiaram e garantiram todo o suporte para que eu conseguisse realizar mais esse sonho. Agradeço cada esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui. A quem só tenho motivos de agradecimentos, sempre.

À minha **filha Isabela**, pela oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor.

Aos demais **familiares e amigos** que sempre me incentivaram e torceram pela minha vitória.

## **Agradecimentos**

Ao orientador **Prof. Dr. Ricardo Danil Guiraldo**, pela confiança em mim depositada, possibilitando a realização desta importante etapa de minha vida; pelos ensinamentos transmitidos; pela orientação segura e imprescindível deste trabalho e pelo exemplo de caráter e dignidade.

À **Profa. Dra. Regina Célia Poli-Frederico**, pela toda dedicação e pelos ensinamentos e por demonstrar o verdadeiro significado de “trabalho em equipe”. Sempre disposta a ajudar, conquistou meu carinho, admiração e confiança.

Aos **colegas de turma** pelos momentos de convívio, pela troca de experiências profissional e pessoal, tornando esta jornada extremamente agradável.

Meus sinceros agradecimentos a todos os **professores e funcionários** da Universidade Norte do Paraná que contribuíram direta ou indiretamente em todo o programa de mestrado, especialmente, à **Flávia**, do setor de laboratório de microbiologia, sempre dedicada, competente e responsável nas suas funções.

Aos funcionários e colegas de trabalho da Universidade Estadual de Londrina, em especial ao **Prof. Dr. Ricardo Sergio Almeida** pela gentileza e pela inestimável contribuição na obtenção da amostra desta pesquisa.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, representada pelo **Prof. Dr. Hélio Hiroshi Sugimoto** e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, representado pelo coordenador **Prof. Dr. Alcides Gonini Júnior**.

LEONCIO, Joyce Sayuri Yamada. **Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana do cimento de ionômero de vidro contendo extrato de semente de uva**. 2016. 35 fls. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2016.

## RESUMO

O objetivo neste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana dos cimentos de ionômeros de vidro (CIVs) acrescidos de extrato de semente de uva (GSE) sobre o *Streptococcus mutans*. Foram testadas dois tipos de CIVs: um convencional quimicamente ativado (Maxxion R) e um modificado por resina composta (Vitremmer). O GSE foi inserido ao líquido do CIV na forma de extrato glicólico na concentração de 10%. A atividade antimicrobiana do GSE foi examinada utilizando o método de difusão em ágar para determinar a inibição do crescimento bacteriano, em que o CIV sem GSE foi utilizado como controle. Foram confeccionados corpos de prova em forma de disco com 8 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Os corpos de prova foram colocados sobre a superfície do meio BHI sólido, em placas de Petri, contendo 100 CFU/ml de *S. mutans*. As placas foram incubadas a 37°C em jarra de anaerobiose e observados após 24 horas, no terceiro, quinto e sétimo dia e o diâmetro do halo de inibição de crescimento formado em torno do material que foi medido em milímetros, utilizando o paquímetro digital. Foi realizado o experimento em triplicata com duas repetições. Para o confronto estatístico dos resultados obtidos nos grupos controle e experimental, foram obtidos as médias e desvios-padrão das zonas de inibição para cada material e a significância estatística dos resultados foram avaliadas através da Análise de Variância seguido de teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Os resultados obtidos mostraram que o CIV convencional apresentou valor superior de zona de inibição quando comparado ao CIV modificado por resina composta ( $p=0,031$ ). Os CIVs com GSE apresentaram valor superior de zona de inibição quando comparado aos que não tiveram adição de GSE ( $p<0,0001$ ). No período de sete dias não houve diferença estatisticamente significativa nos valores médios da zona de inibição ( $p=0,215$ ). Conclui-se que a incorporação do GSE aos CIVs avaliados aumentou sua atividade antibacteriana contra o *S. mutans* no período testado.

**Palavras-chave:** Cimentos de ionômeros de vidro. Extrato de sementes de uva. Tratamento restaurador dentário atraumático. *Streptococcus mutans*.

LEONCIO, Joyce Sayuri Yamada. ***In vitro* antibacterial activity of glass ionomer cement containing grape seed extract.** 2016. 35 fls. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate, *in vitro*, the antibacterial activity of glass ionomer cements (GICs) added grape seed extract (GSE) on *Streptococcus mutans*. Two types of GICs were tested: a conventional chemically activated (Maxxion R) and a composite resin modified (Vitremer). GSE was inserted into the GIC liquid in the form of 10% glycolic extract. The antimicrobial activity of GSE was examined using the agar diffusion method to determine inhibition of bacterial growth, in which the GIC without GSE was used as a control. Test specimens were made in the form of discs (8-mm diameter and 2-mm height). The test bodies were placed on the surface of the solid BHI medium in Petri dishes containing 100 CFU / ml of *S. mutans*. The plates were incubated at 37°C in anaerobic jar and observed after 24 hours on the third, fifth and seventh day and the diameter of the growth inhibition halo formed around the material which was measured in millimeters using the digital caliper. The experiment was performed in triplicate with two replicates. For the statistical comparison of the results obtained in the control and experimental groups, the means and standard deviations of the zones of inhibition for each material were obtained and the statistical significance of the results were evaluated through the Analysis of Variance followed by Tukey's ( $\alpha=0.05$ ). The results showed that the conventional GIC presented a higher value of zone of inhibition when compared to the composite resin modified GIC ( $p=0.031$ ). The GSE with GICs presented higher value of zone of inhibition when compared to those that did not have GSE ( $p<0.0001$ ). In the seven-day period there was no statistically significant difference in the mean values of the inhibition zone ( $p=0.215$ ). It was concluded that the incorporation of GSE into the evaluated GICs increased its antibacterial activity against *S. mutans* in the period tested.

**Key words:** Glass ionomer cements. Grape seed extract. Atraumatic restorative dental treatment. *Streptococcus mutans*.



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.	PROPOSIÇÃO.....	21
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.	RESULTADOS.....	27
6.	DISCUSSÃO.....	30
7.	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar da ocorrência de ações preventivas mundiais, a cárie dentária ainda é um problema de saúde bucal na maioria dos países industrializados, afetando 60-90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos, especialmente os grupos menos privilegiados em países desenvolvidos e em desenvolvimento.<sup>1</sup> E tais níveis de prevalência estão diretamente ligadas à sua etiologia multifatorial, ao considerar a interação entre quatro fatores: hospedeiro (saliva e dentes), microbiota (biofilme dental), dieta cariogênica e o tempo.<sup>2</sup>

Entre as ações preventivas e/ou curativas o Tratamento Restaurador Atraumático (ART) é uma abordagem de intervenção mínima tanto para prevenir quanto para impedir a progressão da cárie dentária, ao preconizar a remoção dos tecidos moles completamente desmineralizados com instrumentos manuais, seguido da restauração adesiva da cavidade com cimento de ionômero e vidro (CIV).<sup>3</sup>

Já em 1971, Wilson e Kent relataram que o CIV oferece vantagens particulares como materiais restauradores por fornecer uma fonte de fluoreto, que tem um efeito cariostático e melhor adesão química a dentina e esmalte dentário.<sup>4</sup> Apesar dos benefícios deste material, como no ART toda a dentina cariada nem sempre é removida, estudo clínico mostrou que as bactérias residuais localizadas sob uma restauração do CIV são viáveis por até dois anos<sup>5</sup> e, portanto, poderá causar falha na restauração.

Para minimizar este problema, vários estudos têm proposto modificações nos CIVs no intuito de diminuir ou eliminar essas bactérias remanescentes tal como a adição de produtos com atividade antimicrobiana.<sup>6-9</sup> A incorporação de substâncias, tal como a clorexidina, inibem o crescimento bacteriano, sem alterar negativamente as propriedades físicas do material.<sup>7</sup> Embora esta substância seja um excelente antimicrobiano, possui efeitos indesejáveis, como coloração dos dentes, descamação reversível da mucosa, alterações do paladar e aumento dos depósitos calcificados supra gengivais.<sup>10</sup> Entretanto, produtos naturais têm mostrado ser uma boa alternativa a substâncias químicas sintéticas para a prevenção e controle da cárie.<sup>8,9</sup>

Destaca-se que a uva (*Vitis vinifera* L.) é uma das culturas de frutas mais amplamente cultivada em todo o mundo.<sup>11</sup> Entre os produtos naturais o extrato de semente de uva (Grape Seed Extract- GSE), um subproduto derivado a partir da semente de uva que é extraído, seco e purificado, possui propriedades medicinais e terapêuticas devido à sua alta concentração de compostos fenólicos, que incluem as proantocianidinas, antocianinas, flavonóis, resveratrol e ácidos fenólicos.<sup>12</sup>

Relatos na literatura mostram que o GSE é um material natural com atividade antibacteriana contra diversas bactérias,<sup>11,13-17</sup> entre eles o *Streptococcus mutans*, principal agente causador da cárie dentária.<sup>12,18-20</sup> Sendo assim, o objetivo nessa pesquisa foi investigar, por meio de estudo *in vitro*, as propriedades antibacterianas do CIV acrescido do extrato de semente de uva (GSE), visto que, a associação poderá potencializar o efeito antibacteriano do material restaurador.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Wilson & Kent<sup>4</sup> em 1971, idealizaram um cimento para fins odontológicos, denominado CIV. Esse material baseia-se na reação de presa entre pó de vidro especial e solução aquosa de ácido poliacrílico, que quando misturados formam uma pasta que se transforma em substância duras translúcida no tempo de 2-10 minutos. O CIV possui algumas vantagens como, fonte de fluoreto que tem um efeito cariostático, superfície é mais resistente à coloração e ataque ácido, menos irritante para a polpa dentária e melhor adesão ao esmalte dental e superfície metálica.

Weerheijm *et al.*<sup>5</sup> (1999) investigaram a influência no período de dois anos do cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIV-RM) e amálgama nas contagens bacteriológicas da dentina cariada que permaneceram sob as restaurações. Utilizaram trinta e três pares de molares em trinta e três pacientes com presença de cárie de dentina oclusal. A dentina cariada foi removida sob condições assépticas logo abaixo da junção amelodentinária, em seguida, foram alternadamente restaurados com CIV-RM ou amálgama. As amostras foram processadas para determinação microbiológica das contagens das bactérias viáveis de *S. mutans* e Lactobacilos. Os pares de molares de vinte e cinco pacientes foram reavaliados após dois anos. Os resultados mostraram que em ambos os materiais ocorreu diminuição substancial no número de *S. mutans* e Lactobacilos, porém, não foram detectados micro-organismos em apenas onze molares (6 CIV-RM e 5 amálgama) após o período de 2 anos. Com base na presença de micro-organismos após dois anos, sugerem que a remoção completa da dentina cariada é ainda o melhor tratamento, independentemente do material restaurador utilizado.

Torres *et al.*<sup>10</sup> (2000) apresentaram uma revisão sobre os principais agentes antimicrobianos que vêm sendo estudados para uso em Odontologia. Na vigência de processos infecciosos já consolidados, o profissional deverá agir de forma terapêutica, implementando medidas tanto de controle mecânico quanto químico da microbiota. Em relação à cárie, a substância mais eficiente contra *S. mutans* tem sido a clorexidina, pois estas bactérias são muito sensíveis a este agente. No caso de lesões periodontais,

nem sempre o controle de placa é suficiente, pois certas bactérias predominantes da doença se alojam no tecido conjuntivo gengival e outros sítios e o uso de antibióticos sistêmicos como a amoxicilina, augmentina, metronidazol, clindamicina, tetraciclina, toxicilina e ciprofloxacina têm sido usadas em casos refratários. Devido uma grande variedade de agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, cabe ao profissional uma correta avaliação clínica, de forma a estabelecer o risco de cárie e doença periodontal daquele determinado indivíduo, assim como a eficiência dos métodos mecânicos de controle da placa bacteriana. Desta forma, se for conveniente, poderá indicar o agente microbiano mais adequado para a necessidade do paciente.

Jayaprakasha *et al.*<sup>13</sup> (2003) estudaram a atividade antibacteriana do GSE, sobre o crescimento de diferentes bactérias (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Quantidades de GSE em propilenoglicol foram transferidas em frascos contendo 20 ml de ágar nutritivo para obter concentrações finais de 250, 500, 750, 850, 900, 1000, 1250 e 1500 ppm. Uma amostra controle foi preparada pela transferência de 20 ml de propilenoglicol em ágar. Foi inoculado em frascos, 100 ml (cerca de 10<sup>4</sup> CFU/ml) de cada bactéria, sob condições assépticas. O meio foi, em seguida, vertido em placas de Petri esterilizadas em quadruplicata e incubadas a 37°C durante 20-24 horas. As colônias desenvolvidas após incubação foram contadas e expressas como unidades formadoras de colônias por ml de cultura (CFU/ml). A concentração inibitória mínima (CIM) foi reportada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento completo da bactéria testada. Os resultados mostraram que o GSE exibiu efeito antibacteriano contra todas as bactérias testadas, porém as bactérias gram-positivas foram completamente inibidas na concentração 850-1000 ppm, enquanto as bactérias gram-negativas foram inibidas na concentração de 1250-1500 ppm. Dessa forma, concluíram que GSE exibiu efeito antibacteriano, sendo mais eficaz contra bactérias gram-positivas quando comparado com as bactérias gram-negativas.

Duarte *et al.*<sup>18</sup> (2006) estudaram a influência de extratos de flavonóis, antocianinas e proantocianidinas do cramberry nos fatores de virulência do *Streptococcus mutans* na formação do biofilme e sua

acidogenicidade. Biofilmes de *S. mutans* foram formados em discos revestidos com saliva de hidroxiapatita. Os biofilmes foram cultivados durante 24 horas e tratados duas vezes por dia com agente teste e veículo controle. A produção de ácido pelo biofilme tratado com o agente teste (ou controle) foi determinada pela queda do pH glicolítico após a adição de solução de glucose (concentração final de 1%, w/v) por meio de um eletrodo de vidro no período de duas horas. Os resultados mostraram que as proantocianidinas e flavonóis do cramberry inibiram a produção de ácido pelo *S. mutans* e conseqüentemente afetaram sua virulência.

Smullen *et al.*<sup>19</sup> (2007) estudaram a atividade antimicrobiana em *S. mutans* e outras bactérias orais e não-oral, através da técnica de diluição em ágar, para investigar a atividade anticariogênicas, de diferentes ingredientes alimentares, tanto comercialmente disponíveis e recém extraídos, selecionados pelo seu teor em polifenóis. Os resultados para todas as estirpes de extrato da casca da uva vermelha tinha um valor de CIM de 0,5 mg/ml<sup>-1</sup> e do chá verde foi de 2 mg/ml<sup>-1</sup>. Todos os outros extratos necessitaram de  $\geq 2$  mg/ml<sup>-1</sup> para inibir o crescimento bacteriano. GSE foram mais ativos (0,5 e 4 mg/ml<sup>-1</sup>) que a sua casca (16 e 8 mg/ml<sup>-1</sup>). Extratos da uva vermelha e verde tinha uma atividade antimicrobiana mais elevada do que os outros frutos testados. Os extratos selecionados foram testados contra outras bactérias orais e mostrou atividade contra micro-organismos gram-positivos. O chá verde e a semente de uva vermelha foram bacteriostáticos e impediu a produção de ácido para culturas de *S. mutans*, cultivadas num meio quimicamente definido suplementado com glicose ou sacarose. Também, a adesão de *S. mutans* foi inibida, o que sugere que ocorreu a inibição na síntese de glicano. Dessa forma, concluíram que, os extratos de plantas que contêm níveis elevados de polifenóis inibem o crescimento de *S. mutans* e outras bactérias, assim podem ter um papel na prevenção da cárie.

Yesilyurt *et al.*<sup>6</sup> (2009) avaliaram os efeitos antibacterianos, propriedades físicas e forças de ligação de CIV contendo antibióticos e determinou a concentração ótima de antibióticos para uso no ART. Adicionaram três antibióticos (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) no pó do CIV nas concentrações de 1,5, 3,0 e 4,5% e as amostras controles foram utilizadas os CIVs sem os antibióticos. A atividade antibacteriana foi avaliada

contra *S. mutans* e *Lactobacillus casei* utilizando métodos de ágar. A liberação de antibióticos foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. A força de ligação e resistência à compressão de dentina foram medidos e comparados com as amostras controle. Os grupos testados mostrou uma inibição significativamente maior no crescimento bacteriano, em comparação com os grupos controle. No entanto, a concentração de 3% e 4,5% de antibióticos tiveram significativamente menor resistência à compressão e menor resistência de união à dentina do que o grupo controle. Os CIVs contendo antibióticos eficazes na inibição do *S. mutans* e *Lactobacillus casei*. A adição de antibiótico na concentração de 1,5% foi ideal em não alterar as propriedades físicas e de ligação do material.

Rotava *et al.*<sup>14</sup> (2009) no seu estudo utilizaram semente de uva desengordurada, em solução contendo acetona, água e ácido acético, resultando em 10,3% de rendimento de extrato de semente de uva desengordurada (ESUD). A CIM e a concentração bactericida mínima (CBM) do ESUD, como solução etanólica a 20%, foram determinadas para cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e do gênero *Salmonella*, pelo método de microdiluição em caldo. Valores de CIM, entre 50-500  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ , são considerados de elevada atividade, sendo que, de 600 a 1.500  $\mu\text{g/ml}^{-1}$  e acima de 1.500  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ , são considerados de média e baixa atividade, respectivamente. Os resultados obtidos foram que a CIM do ESUD para 30 cepas de *E. coli* apresentou média geométrica de 393,6  $\mu\text{g/ml}^{-1}$  e para CBM foi de 1039  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ . Para 15 cepas de *S. aureus*, as médias foram de 206 e 452  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ , para CIM e CBM, respectivamente. Para 15 cepas de *Salmonella sp.* a CIM mostrou valores superiores a 2500  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ , não sendo avaliada, para esta bactéria, a CBM. Concluíram, através dos resultados observados, alta atividade antibacteriana do ESUD contra *S. aureus* e *E. coli*, mas não contra *Salmonella sp.*

De acordo com Furiga *et al.*<sup>15</sup> (2009) estudaram o efeito do GSE em bactérias anaeróbias bucais intimamente associadas com doenças periodontais (*P. Gingivalis* e *F. nucleatum*) e sua atividade na formação de biofilme multi-espécies (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus*). A atividade antimicrobiana foi examinada através da determinação da CIM e a CBM, utilizando a técnica de

macrodiluição em caldo e o biofilme multi-espécies foram cultivadas em discos de hidroxiapatita revestidos de saliva. Observaram que os efeitos inibidores de GSE sobre a formação de biofilme são dependentes da dose. Na concentração de 2.000 µg/ml o GSE diminuiu significativamente a formação do biofilme e concentrações maiores levou a uma diminuição da sua eficácia, causado principalmente por sua dissolução em água. Os resultados mostraram que o GSE teve um efeito bacteriostático sobre os anaeróbios envolvidos na periodontite.

Assim dentro deste contexto, Adámez *et al.*<sup>11</sup> (2012) testaram a atividade antibacteriana do GSE, pelo método CIM, contra estirpes de bactérias, incluindo: três bactérias gram-positivas (*Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta*, *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*) e três bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *salmonela entérica* subsp. *entérico* e *Escherichia coli*). Os extratos foram diluídos em um intervalo de concentração de 100 µl/ml<sup>-1</sup> a 12,5 µl/ml<sup>-1</sup>. Um controle positivo (contendo inóculo, mas não extratos) e controle negativo (contendo extratos, mas não inóculo) foram incluídos em cada microplaca. Observaram que a inibição não foi produzida nas amostras controle (0% de inibição), enquanto que para todas com o GSE a inibição foi de cerca de 100% para concentração de 100 e 50 µl/ml<sup>-1</sup>. Concluíram que o GSE exibiu ação antibacteriana contra todas as bactérias testadas, sendo mais efetivos contra bactérias gram-positivas do que as bactérias gram-negativas.

Shrestha *et al.*<sup>16</sup> (2012) testaram o GSE contra microflora periimplantite mais comumente encontrados em implantes craniofaciais, incluindo estirpes de referência como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e estirpes clínicas de *S. Aureus*, *Klebsiella pneumonia* e *Candida parapsilosis* pelo teste de difusão em disco. As CIM e concentrações mínimas cidal (MCC) foram determinadas usando o método de diluição em ágar modificado Millipore. Os extratos foram combinados com polietilenoglicol e propilenoglicol. Os resultados dos testes mostraram que o GSE apresentou atividade moderada contra as estirpes de *S. aureus* com zonas de inibição de 12,5 mm a 7 mm. No entanto, o reagente mostrou pouca ou nenhuma reatividade contra *E. coli*, *K. pneumonia*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Nos testes de CIM e MCC o GSE foi eficaz contra as duas estirpes de *S. aureus* em



valores de MIC de 0,625 mg/ml e MCC em 1,25 mg/ml. No entanto, o teste de diluição em ágar tinha limitações e não conseguiu obter um conjunto homogêneo, quando a concentração do extrato foi aumentada mais de 20 mg/ml em ágar. O ensaio para CIM para espécies de *Cândida* que exigiam concentração maior que 20 mg/ml não pôde ser estabelecida. A combinação do GSE com propilenoglicol e propilenoglicol mostrou um efeito inibidor dependente da dose em ambas às estirpes de *S. aureus*. Concluíram que as sementes de uva tem efeitos potenciais antimicrobianos que pode ser mais estudadas e desenvolvidas para serem utilizados no tratamento de interface infectada de implantes craniofaciais.

EL-Adawi<sup>20</sup> (2012) investigou o efeito do GSE sobre o crescimento e a formação de biofilme de *S. mutans*. A atividade antimicrobiana do GSE foi examinada, *in vitro*, utilizando o método de placas de microtitulação para determinar a CIM. A potencialidade do GSE na aderência bacteriana (biofilme) também foi testada no crescimento de células na parte inferior da placa da cultura celular. O estudo revelou que GSE e os principais constituintes, no caso da epicatequina, na dose não tóxica (15%) demonstrou capacidade para inibir mais de 80% o crescimento de *S. mutans*. A inibição de biofilme foi confirmada no ensaio de adesão, em que a adesão de *S. mutans* às células HEP2 estava inibida na presença de epicatequina e reduziu a formação de biofilme até 66,25%. Portanto, concluiu que o GSE, especificamente a epicatequina, pode ser considerado uma alternativa promissora para prevenir e controlar a cárie dentária.

Gupta *et al.*<sup>2</sup> (2013) fizeram uma revisão na literatura sobre o papel do açúcar e dos seus substitutos na prevenção da cárie dentária. Concluíram que embora o açúcar esteja associado com a cárie dentária, destaca-se o fato de que o açúcar sozinho não é o único determinante dessa doença. Para prevenir os profissionais de saúde bucal devem orientar e educar os pacientes a adotar programas dietéticos especiais e motivá-los a alterar seu comportamento alimentar habitual.

No estudo realizado por Mirkarimi *et al.*<sup>17</sup> (2013) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato semente de uva contra *S. mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Foi utilizado neste estudo experimental o extrato de semente de uva preparado através do método de

maceração A atividade antimicrobiana foi examinada através da determinação da CIM e CBM, utilizando a técnica de macrodiluição em caldo. Os resultados mostraram que a CIM e CBM para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi 3,84 mg/ml e 7,68 mg/ml respectivamente. Entretanto, não ocorreu qualquer efeito inibitório (bactericida ou bacteriostática) contra *S. mutans*.

Frencken & Holmgren<sup>3</sup> (2014) apresentaram um editorial sobre a abordagem do ART. A eficácia de restaurações ART é avaliada pelo tempo de longevidade e as meta-análises mais recentes sobre o desempenho de restaurações do ART concluíram que a longevidade das restaurações do ART em dentes decíduos não é diferente daquelas usando métodos tradicionais usando amálgama; CIV teve maior efeito preventivo que restaurações de amálgama em dentes permanentes, sem diferença em dentes decíduos; selantes do ART são tão eficazes na prevenção de lesões de cárie como selantes à base de resina. Portanto, os autores concluíram que o ART pode ser incondicionalmente usado para tratar a cárie dentária em dentes decíduos e permanentes.

Martin *et al.*<sup>7</sup> (2014) estudaram o efeito de diferentes concentrações de digluconato de clorexidina (CHX) na definição de tempo, dureza superficial, resistência máxima à tração e atividade antibacteriana CIV. O material utilizado como controle foi CIV Ketac Molar Easymix. CHX foi incorporada no CIV nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%. A atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *L. acidophilus* foi avaliada por meio do teste de difusão em ágar. Observaram que a adição de CHX em concentrações de 1% e 2% aumentou significativamente o tempo de endurecimento do material. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e 0,5% de CHX sobre o tempo de presa. A adição de 2% de CHX diminuiu significativamente a dureza de superfície, em relação ao grupo controle, seguido pelo grupo CHX 1%. A força de ligação à tração do material também diminuiu significativamente após a adição de CHX a uma concentração de 2%. A adição de CHX promoveu formação de um halo de inibição em ambas as estirpes bacterianas para todas as concentrações. Os resultados mostraram que a melhor opção para o uso clínico de CIV com CHX é a uma concentração de 0,5%, uma vez que a atividade antibacteriana aumentada e as propriedades físico-mecânicas mantiveram-se inalterada.

Hatunoglu *et al.*<sup>8</sup> (2014) investigaram a adição de extrato etanólico de própolis (EEP) nas propriedades antibacterianas e mecânicas do CIV utilizado na cimentação de banda ortodôntico. O cimento foi dividido em quatro grupos: um com a composição original e três com 10%, 25% e 50% EEP adicionado ao líquido. Um método de ensaio, caldo de diluição antimicrobiana foi utilizado para determinar a capacidade antibacteriana do CIV contendo EEP. Os resultados obtidos mostraram que a adição de 25% e 50% EEP inibiu o crescimento de *S. mutans*, mas este efeito não ocorreu no grupo controle. Concluíram que a adição de EEP podem aumentar as propriedades antibacterianas sem alterar de forma negativa as propriedades mecânicas do CIV.

Dhillon *et al.*<sup>12</sup> (2015) no seu estudo analisaram o efeito do GSE, comercialmente disponível, contra *S. mutans*, na qual foram adicionados em ágar sangue várias diluições do GSE. *S. mutans* foi inoculada em todas as amostras durante 48 horas a 37° C e ágar sangue sem GSE foi utilizado como controle. Foi observado o crescimento bacteriano apenas sobre a placa controle e as placas com diluição do GSE de 0,25 mg/ml e 0,5 mg/ml apresentou a CIM > 0,5 mg/ml contra *S. mutans*. Portanto, concluíram que o GSE tem atividade antimicrobiana substancial contra *S. mutans*.

World Health Organization<sup>1</sup> (2016) relata que a cárie dentária e a doença periodontal têm sido consideradas os mais importantes problemas de saúde bucal. O complexo craniofacial permite falar, sorrir, beijar, degustar, mastigar, engolir e o impacto psicossocial dessas doenças muitas vezes diminui significativamente a qualidade de vida do indivíduo. A inter-relação entre saúde bucal e geral é comprovada por evidências, por exemplo, doença periodontal pode está associada com a diabetes, dessa forma, a forte correlação entre várias doenças orais e doenças crônicas não transmissíveis é consequência dos fatores de risco comuns.

Altunsoy *et al.*<sup>9</sup> (2016) avaliaram o efeito EEP em diferentes proporções incorporados no CIV na propriedade de infiltração e microdureza do material. O cimento foi dividido em quatro grupos: um com a composição original e três com 10%, 25% e 50% EEP. Para a avaliar a infiltração, sessenta molares decíduos foram divididos aleatoriamente em quatro

grupos. Cavidade classe II foram preparadas e, em seguida, preenchidas com CIVs incorporados com EEP. Teste de microinfiltração foi realizado utilizando um método de penetração de corante. Amostras em forma de disco foram preparadas a partir do CIV testados para determinar a dureza de Vickers. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em termos de infiltração. O aumento da adição de EEP no CIV aumentou estatisticamente o valor dureza de Vickers do CIV. Portanto, concluíram que a adição de EEP no CIV aumentou a dureza do material e não afetou adversamente a infiltração. Assim, ele pode ser usado durante a prática odontológica de rotina devido às suas propriedades antibacterianas.

## PROPOSIÇÃO

O objetivo neste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antibacterianas dos CIVs acrescidos de extrato de semente de uva (GSE) sobre o *Streptococcus mutans* em diferentes tempos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

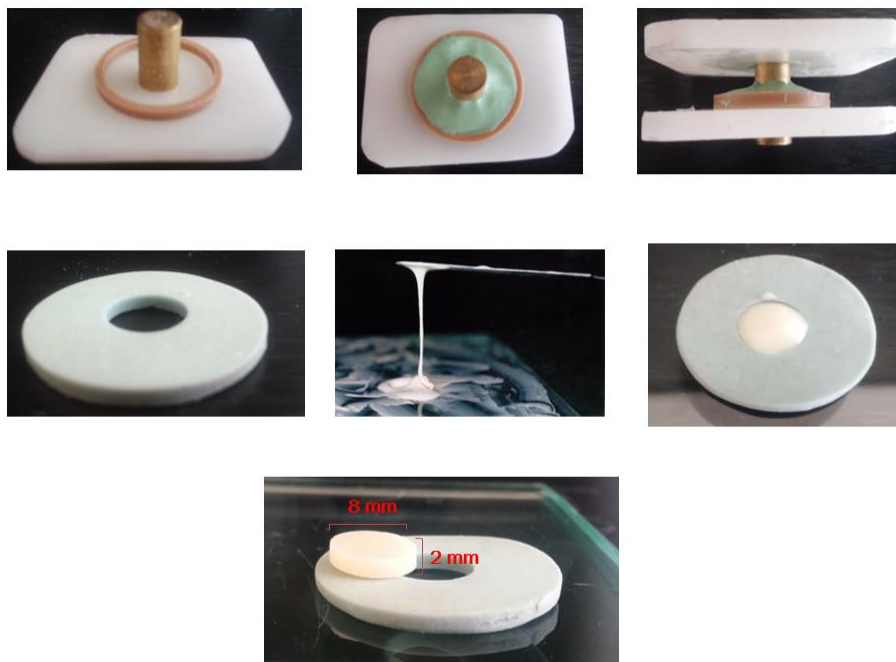
### Preparo das amostras

Foi utilizado o cimento de ionômero de vidro convencional (Maxxion R; FGM, Joinville, SC, Brasil) e o cimento de ionômero de vidro modificado por resina composta (Vitremmer, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) modificados por extrato de semente de uva (GSE) que foi adquirida da empresa Mapric Produtos Farmacocosméticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil.

O GSE foi inserido ao líquido do CIV na forma de extrato glicólico a 10%. Anteriormente aos testes, foram realizados vários testes-piloto, para avaliação das formas de inserção do GSE ao cimento ionomérico e as respectivas proporções.

Para obtenção dos corpos-de-prova de 8 mm de diâmetro por 2 mm de altura, foram confeccionados moldes, em silicone de condensação para moldagem odontológica (Zetapuls; Zhermack, Badia Polesine, RO, Italy), nos quais foram inseridos os cimentos em questão, obedecendo aos critérios de manipulação preconizados pelo fabricante (Figura 1). A fim de respeitar a técnica preconizada pelo ART, em que não é utilizado equipamentos, o CIV modificado por resina composta não foi fotopolimerizado.

Figura 1: confecção do corpo-de-prova.



Fonte: Da autora (2016).

Para realização da presente pesquisa foram obtidos corpos-de-prova em forma de disco de CIV convencional e modificado por resina composta (Tabela 1).

Tabela 1: CIVs utilizados.

Material	Procedência	Composição	Lote
Maxxion R	Dentscare Ltda Joinville / Santa Catarina / Brasil	Vidro de Aluminofluorsilicato, ácido poli-carboxílico, ácido tartárico, fluoreto de cálcio e água.	130815
Vitremer	3M ESPE Saint Paul / Minnesota / EUA	Silicato de flúor- alumínio	N536764

Fonte: Da autora (2016).

Foi realizado o experimento em triplicata, com duas repetições e os grupos foram divididos de acordo com acréscimo ou não de GSE (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos testados.

Grupos	GSE	Corpos-de-prova (Quantidade em número)
Grupo Controle	Sem adição	12
Grupo Experimental	Com adição	12

Fonte: Da autora (2016).

### Preparo das cepas

A atividade antibacteriana dos materiais foi analisada por meio do teste de formação do halo de inibição de crescimento em ágar para *Streptococcus mutans* UA159, estirpe selecionada por meio de

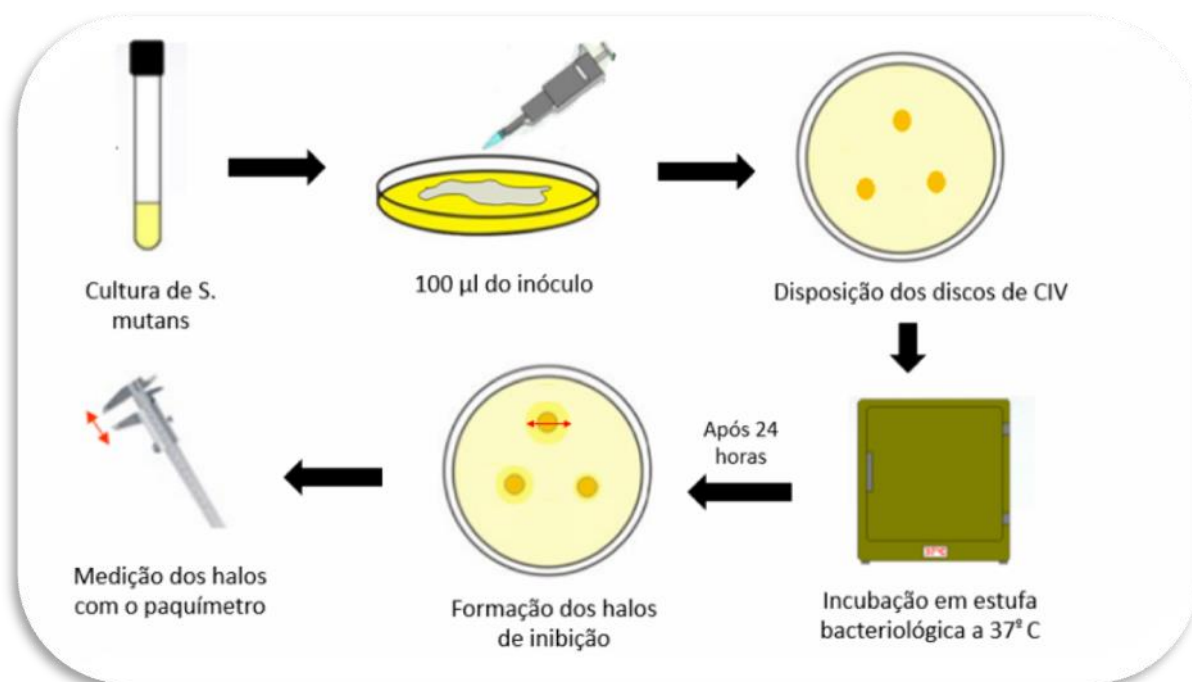
sequenciamento.<sup>21</sup> As bactérias foram mantidas em placas de Petri com sólido de infusão de cérebro e coração (BHI - DFICO) e mantidos sob refrigeração. Para os experimentos, foi removida uma pequena quantidade de cultura a partir das placas com uma alça de platina de inoculação, diluiu-se em 5 ml de BHI líquido e incubadas em jarra de anaerobiose durante 24 horas a 37°C e sem agitação.

### **Análise microbiológica**

Em cada placa de Petri esterilizada, foi preparada uma camada-base do meio de cultura BHI ágar para cultivo de *Streptococcus mutans*, que após a solidificação recebeu semeadura, sendo que em cada placa foi acrescida 100 CFU/ml da suspensão do inóculo. Os corpos de prova foram inseridos nas placas contendo o micro-organismo citado (03 corpos de prova por placa). As placas foram, então, incubadas em jarra de anaerobiose e o crescimento microbiano foi avaliado em dias alternados, isto é, após 24 horas, no terceiro, quinto e sétimo dia de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Após o período de incubação, os halos de inibição foram medidos em milímetros, utilizando o paquímetro digital (Mitutoyo Absolute; Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, SP, Brasil) (Figura 2). Todas as medidas foram determinadas a partir de dois pontos opostos localizados nos limites mais externos de cada halo formado ao redor de cada corpo de prova. A atividade antimicrobiana dos materiais foi calculada como uma zona de inibição (ZI), dada como a razão entre o diâmetro do halo de inibição de crescimento (x) e o diâmetro do espécime (y) (Figura 3).

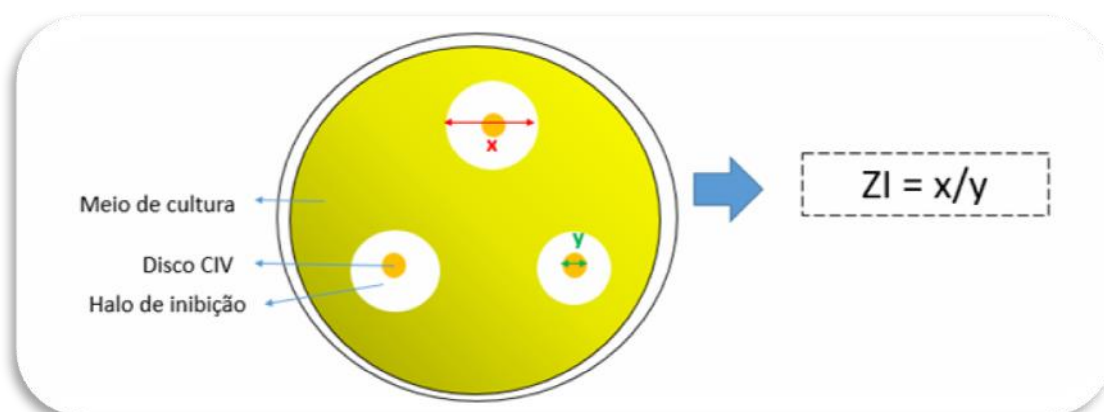


Figura 2: Sequência esquemática do teste de formação do halo de inibição em ágar para *S. mutans*.



Fonte: Da autora (2016).

Figura 3: Cálculo da zona de inibição de crescimento.



Fonte: Da autora (2016).

### Análise estatística

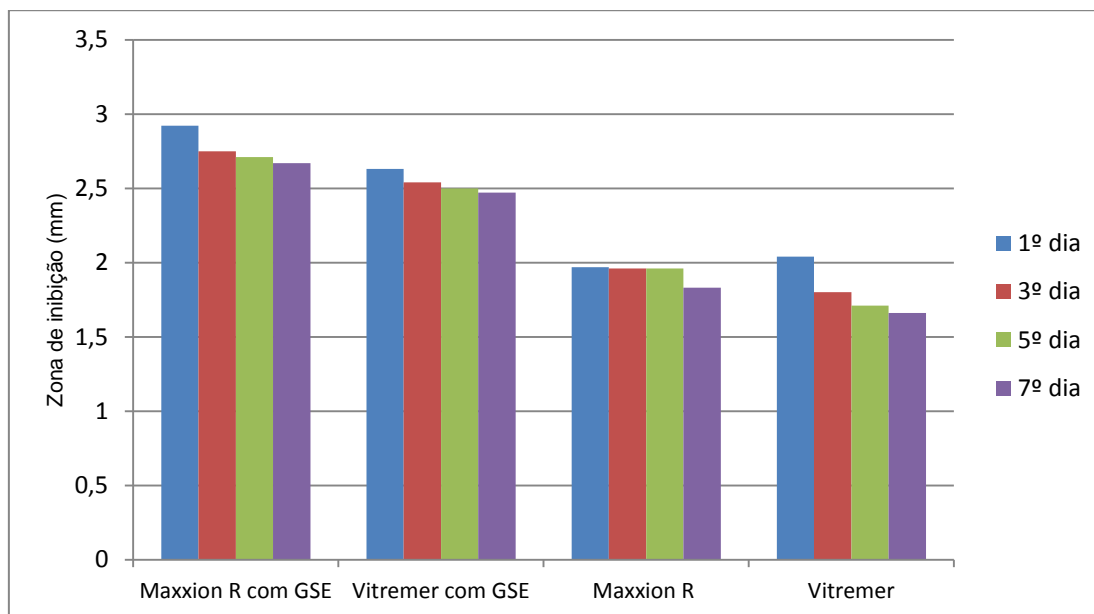
A análise estatística foi realizada com o software Minitab 16 para Windows 8 (Minitab, State College, Pa). As distribuições das medições foram investigadas com o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizados os testes paramétricos. Os dados para valores da zona de inibição

(Fatores: material, adição de extrato de uva e tempo) foram avaliados estatisticamente pela Análise de Variância e posteriormente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Os valores médios das zonas de inibição (mm) do crescimento bacteriano para os grupos testados são mostrados no Gráfico 1.

Gráfico 1: Valores médios da zona de inibição dos grupos testados.



Fonte: Da autora (2016).

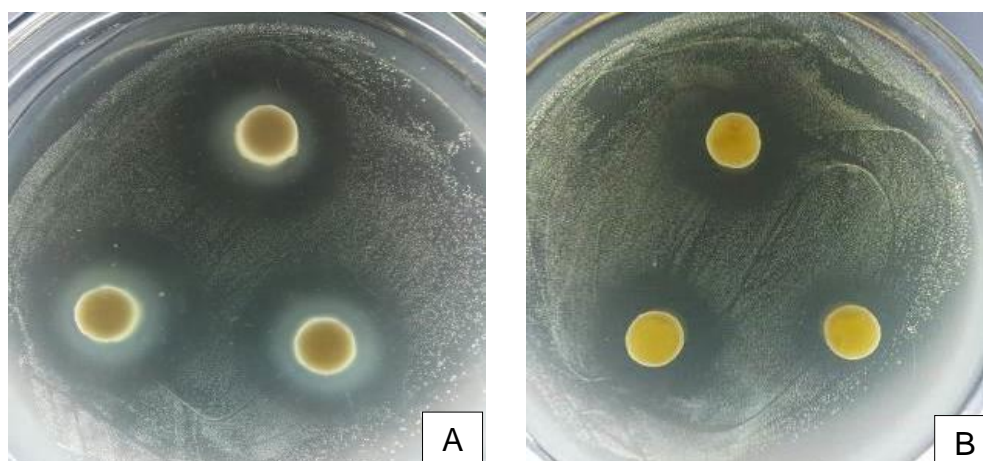
Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores médios da zona de inibição para as combinações material, adição de extrato de semente de uva e tempo ou combinações duplas ( $p > 0,05$ ). Para o fator material, o cimento de ionômero de vidro convencional (Maxxion R) apresentou valor superior de zona de inibição quando comparado ao cimento de ionômero de vidro modificado por resina composta Vitremer ( $p = 0,031$ ; Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3: Razão médios da zona de inibição dos materiais.

Material	Zona de inibição (mm)
Maxxion R	2,35 (0,28) A
Vitremer	2,17 (0,24) B

Os valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey. Desvios-padrão estão entre parênteses. Fonte: Da autora (2016).

Figura 4: A- Maxxion R com GSE. B- Vitremer com GSE.



Fonte: Da autora (2016).

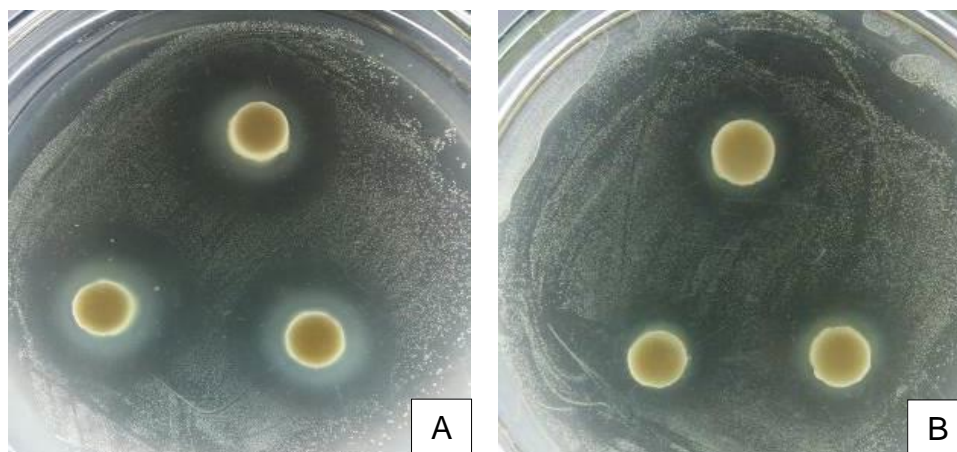
Para o fator adição de extrato de semente de uva, os materiais nos quais foram adicionados GSE apresentaram valor superior de zona de inibição quando comparado aos que não tiveram adição de GSE ( $p < 0,0001$ ; Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4: Razão médios da zona de inibição dos materiais.

Adição de extrato de uva	Zona de inibição (mm)
Com GSE	2,65 (0,42) A
Sem GSE	1,87 (0,28) B

Os valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey. Desvios-padrão estão entre parênteses. Fonte: Da autora (2016).

Figura 5: A- Maxxion R com GSE. B- Maxxion R sem GSE.



Fonte: Da autora (2016).

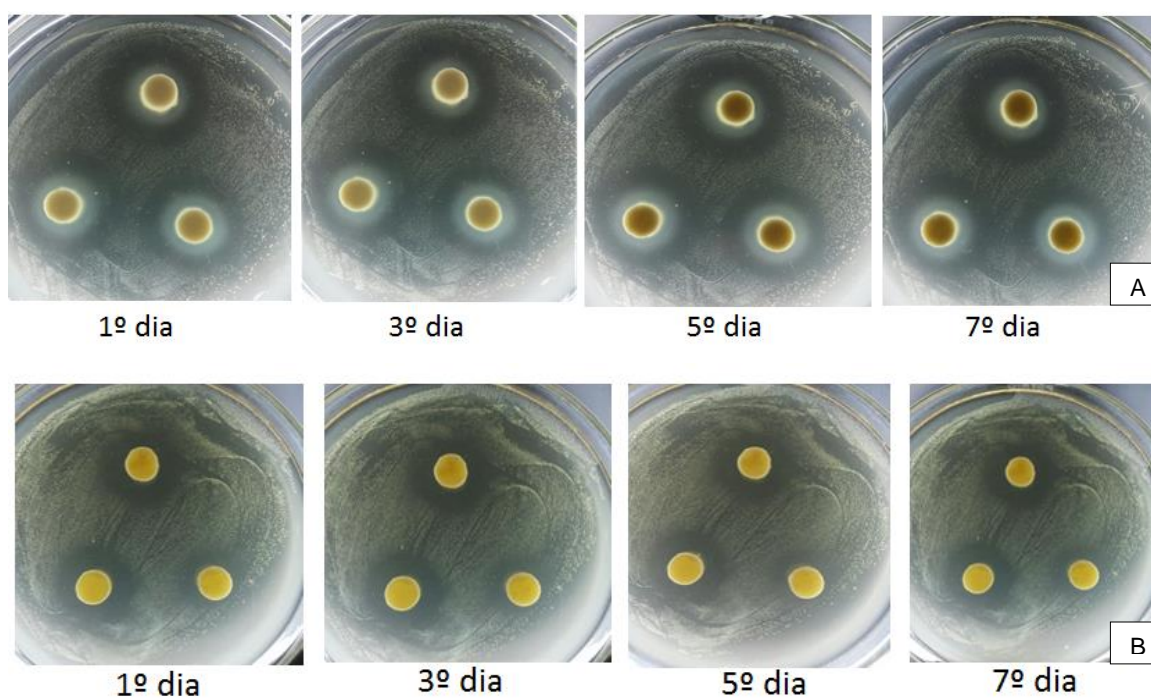
Para o fator tempo, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores médios da zona de inibição ( $p=0,215$ ; Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5: Razão médios da zona de inibição dos materiais.

Tempo (Dia)	Zona de inibição (mm)
1	2,39 (0,22)
3	2,26 (0,31)
5	2,22 (0,33)
7	2,16 (0,28)

Desvios-padrão estão entre parênteses.

Figura 6: A- Maxxion com GSE. B- Vitremer com GSE.



## DISCUSSÃO

A busca por melhores condições de saúde bucal levou ao desenvolvimento de novos materiais e técnicas restauradoras, visando restabelecer a função mastigatória do indivíduo. Nesse contexto, nos anos 80, Frenck introduziu o ART, cuja abordagem é simples e eficaz no tratamento da cárie dentária e o material utilizado é o cimento de ionômero de vidro.<sup>3</sup> Nesta técnica, a fim de eliminar a microbiota remanescente em procedimentos de remoção parcial de tecido cariado, como o ART, estão sendo incorporados agentes antimicrobianos nos materiais restauradores para minimizar o risco de recidiva de lesões de cárie.<sup>6-9</sup> Dentro deste contexto, com a finalidade de melhorar a propriedade bacteriana do material restaurador para o ART, o presente estudo avaliou a atividade antibacteriana do CIV após a adição do GSE contra uma estirpe de *S. mutans*.

Neste trabalho foram testada duas categorias de CIV: um convencional quimicamente ativado (Maxxion R) e um modificado por resina composta (Vitremmer). Os resultados do presente estudo suportam estudos anteriores em que relataram que o CIV apresenta atividade antibacteriana sobre o *S. mutans*.<sup>22,23</sup> Os efeitos bactericidas são frequentemente atribuído à composição química,<sup>22</sup> liberação de flúor<sup>4,22</sup> e baixo pH.<sup>22</sup> O flúor muda o ecossistema da placa bacteriana, afeta uma variedade de funções enzimáticas vitais da célula bacteriana interferindo em alguma etapa do metabolismo ou até levando à morte celular, e a queda de pH do CIV ocorre pela reação ácido-base durante o processo de geleificação, promovendo a acidez no meio, criando condições insustentáveis para o crescimento bacteriano.<sup>24</sup>

Os resultados desta pesquisa demonstraram que a incorporação de 10% do GSE no CIV aumentou a atividade antibacteriana contra *S. mutans*. (Tabela 4) comprovando que o GSE possui propriedades medicinais e terapêuticas devidos à sua alta concentração de polifenóis,<sup>12</sup> que é responsável pela atividade antibacteriana contra diversas bactérias patogênicas.<sup>11,13-17</sup> E pesquisas comprovaram que o GSE é bacteriostática e inibiu a produção de ácido para culturas de *S. mutans*.<sup>18-20</sup>

Freitas *et al.*<sup>23</sup> concluíram que o CIV modificado por resina apresentou halos de inibição de crescimento bacteriano, nas primeiras 24

horas, estatisticamente superior ao CIV convencional. Boeckh et al.<sup>24</sup> avaliaram os efeitos de alguns materiais restauradores sobre o crescimento de *S. mutans* e observaram que CIV convencional exibiu maior efeito de inibição no crescimento bacteriano quando comparado com CIV modificado por resina. Nesta pesquisa o CIV convencional também apresentou efeito inibitório no crescimento bacteriano superior ao CIV modificado por resina. Este fato pode ser explicado pela razão do presente estudo, o material CIV modificado por resina composta ter sido utilizado somente na presa química. A maior concentração na liberação de flúor dos CIVs convencionais com relação aos cimentos modificados com resina e aos de alta viscosidade, está associada ao fato desses materiais serem mais solúveis, apresentarem uma reação de presa mais lenta e serem mais porosos, em decorrência, provavelmente, de partículas maiores, mais irregulares, maior relação líquido/pó e, conseqüentemente, maior fluidez.<sup>25</sup> Portanto, outra explicação para melhor propriedade antibacteriana do CIV convencional poderia ser que a porosidade do material possa ter uma grande influência sobre a quantidade de liberação de fluoreto.

As comparações das médias das zonas de inibição obtida em intervalos de tempo diferentes não indicaram qualquer diferença estatisticamente significativa, sendo assim a atividade antibacteriana dos materiais foi eficaz no período de sete dias. Estudos demonstraram que a liberação acentuada de flúor ocorre nos primeiros dias e depois ocorre um decréscimo lento<sup>25</sup> e isto ocorre provavelmente porque o nível elevado da liberação do fluoreto no primeiro dia pode ser causado pelo efeito da liberação da superfície e liberação constante do fluoreto durante os dias seguintes ocorra devido à capacidade do fluoreto difundir através dos poros do CIV.<sup>22</sup>

Esta pesquisa demonstrou que a incorporação do GSE melhorou a propriedade antibacteriana do CIV, indicando a capacidade destes materiais de inibir o desenvolvimento do *S. mutans*. Pode-se concluir que é um material promissor para ser utilizado no ART. No entanto, novos estudos devem ser realizados em seus aspectos físico-químicos para avaliar se a incorporação do GSE interfere nas propriedades mecânicas e adesivas do CIV.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados analisados e discutidos, podem-se extrair as seguintes conclusões:

1- Cimento de ionômero de vidro convencional demonstrou maior atividade antibacteriana sobre o *S. mutans* em comparação com o cimento de ionômero de vidro modificado por resina composta.

2- A incorporação do extrato de semente de uva aumentou a propriedade antibacteriana em ambos materiais.

3- A atividade antibacteriana mostrou-se eficaz por um período de sete dias.



## REFERÊNCIAS

1. [http://www.who.int/oral\\_health/policy/en/](http://www.who.int/oral_health/policy/en/)
2. Gupta P, Gupta N, Pawar AP, Birajdar SS, Natt AS, Singh HP. Role of Sugar and Sugar Substitutes in Dental Caries: A Review. *ISRN Dent.* 2013;2013:519421.
3. Frencken JE, Holmgren CJ. Caries management through the Atraumatic Restorative Treatment (ART) approach and glass-ionomers: update 2013. *Braz Oral Res.* 2014;28:5-8.
4. Wilson AD, Kent BE. The glass ionomer cement, a new translucent dental filling material. *J Chem Appl Technol Biotechnol.* 1971;21:313.
5. Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE. Bacterial Counts in Carious Dentine under Restorations: 2–Year in vivo Effects. *Caries Res.* 1999;33:130-4.
6. Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent.* 2009;34:18-23.
7. Marti LM, Mata Md, 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;25:33-7.
8. Hatunoğlu E, Oztürk F, Bilenler T, Aksakallı S, Simşek N. Antibacterial and mechanical properties of propolis added to glass ionomer cement. *Angle Orthod.* 2014;84:368-73.

9. Altunsoy M, Tanriver M, Türkan 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;40:136-40.
10. Torres CR, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Braz Dent Sci.* 2010;3:43-52.
11. Adámez JD, Samino EG, Sánchez EV, González-Gómez D. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control.* 2012;24:136-141.
12. Dhillon J, Batra M, Singh H, Kaur R. Antibacterial effect of grape seed extract against streptococcus mutans. *Asia Pac Dent J.* 2015;2:9-12.
13. Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Int.* 2003;36:117-22.
14. Rotava R, Zanella I, da Silva LP, Manfron MP, Ceron CS, Alves SH, Karkow AK, Santos JP. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. *Cienc Rural.* 2009;39:941-4.
15. Furiga A, Lonvaud-Funel A, Badet C. In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chem.* 2009;113:1037-40.
16. Shrestha B, Theerathavaj MS, Thaweboon S, Thaweboon B. In vitro antimicrobial effects of grape seed extract on peri-implantitis microflora in craniofacial implants. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2:822-5.
17. Mirkarimi M, Amin-Marashi SM, Bargrizan M, Abtahi A, Fooladi I, Ali A. The antimicrobial activity of Grape Seed Extract against two important

- oral Pathogens. Zahedan J Res Med Sci. 2013;15:43-6.
18. Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, Koo H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. FEMS Microbiol Lett. 2006;257:50-6.
  19. Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbé A, Storey DM. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. Caries Res. 2007;41:342-9.
  20. El-Adawi H. Inhibitory effect of grape seed extract (GSE) on cariogenic bacteria. J Med Plants Res. 2012;6:4883-91.
  21. Bozza A, Oliveira LP, Camargo DG, Poletto D, Dallazen E, Corrêa GO, Hoepfner MG, Almeida RS. In Vitro Evaluation of the antimicrobial activity of dental materials against *Streptococcus mutans*. J Surg Clin Dent. 2016;8:5-9.
  22. Hotwani K, Thosar N, Baliga S, Bundale S, Sharma K. Antibacterial effects of hybrid tooth colored restorative materials against *Streptococcus mutans*: An in vitro analysis. J Conserv Dent. 2013;16:319-22.
  23. Freitas AB, Soares D, Fiorini JE, Swerts MS, Barros LM. In vitro effect of restorative, cementing and lining materials on *Streptococcus mutans*. RFO. 2008;13:33-8.
  24. Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. Caries Res. 2002;36:101-7.
  25. Silva FD, Duarte RM, Sampaio FC. Fluoride release and uptake by glass ionomer cements. RGO. 2010;58:437-43.