



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE  
COMPÓSITOS EXPERIMENTAIS CONTENDO ALICINA**

Niterói  
2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE  
COMPÓSITOS EXPERIMENTAIS CONTENDO ALICINA**

EDUARDA LIMA MUNIZ DE CARVALHO

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Mariote Amaral.

Niterói

2023

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Cristiane Mariote Amaral

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Decisão: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Maria Elisa da Silva Nunes Gomes Miranda

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Decisão: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Luciana Meireles Miragaya

Instituição: Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Decisão: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela força e sabedoria para enfrentar os desafios do caminho, por nunca ter me desamparado e por sua graça infinita.

Aos meus pais, Márcio e Patrícia, por serem meus maiores incentivadores e exemplos na vida. Vocês são meus alicerces e minhas maiores inspirações. Obrigada por todo esforço que fizeram para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

Ao meu irmão, João Pedro, por torcer pelas minhas conquistas e pelo incentivo de sempre. Estaremos sempre juntos.

À minha querida orientadora, Cristiane Mariote, por todas as oportunidades, por fomentar o meu desejo pela pesquisa e pela amizade que criamos ao longo desse tempo juntas. Obrigada por toda dedicação e incentivo.

À Maria Isabel, aluna de iniciação científica, que se dedicou a este trabalho junto comigo. Obrigada pela proatividade e dedicação. Você vai longe.

Aos amigos do mestrado, pela parceria e por terem tornado a jornada mais leve e feliz.

Ao Sr. José Maria, por me auxiliar com as etapas da pesquisa, pela companhia e por todas as dicas no laboratório.

Aos Mestres, que serviram como fonte de inspiração.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.” (Provérbios 16:3)

## RESUMO

Carvalho,ELM. Caracterização e análise do efeito antibacteriano de compósitos experimentais contendo Alicina[dissertação]; Niterói: Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2023.

O objetivo deste estudo foi caracterizar compósitos experimentais contendo a Alicina em diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) e avaliar seu efeito na formação do biofilme de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e na prevenção da perda de dureza do esmalte. Metodologia: Um compósito experimental (matriz polimérica composta de Bis-GMA/TEGDMA (70/30 %p/p) com 40 %p/p de matriz e 60 %p/p de nanopartículas de boro-bario silicato, canforoquinona = 0,5 %p/p e agente redutor etil N,N-dimetil-4aminobenzoato (EDMAB = 1,0 %p/p)) foi manipulado e a Alicina foi incorporada em diferentes concentrações (ALI0,25%, ALI0,5%, ALI1%). O compósito Controle não recebeu adição de nenhuma substância antimicrobiana. No estudo foram avaliados o efeito antibiofilme através da confecção de discos de cada compósito restaurador (n=5) onde foi avaliada a atividade metabólica do biofilme (ensaio de MTT) e a quantificação de células planctônicas (turvação). A inibição da perda de dureza foi avaliada nas margens em esmalte de restaurações realizadas com os compósitos experimentais e controle através da análise de microdureza Knoop (n=5) antes e após exposição ao biofilme de *S. mutans*. Após isso, foi avaliado o grau de conversão de discos dos compósitos (n=5), através de espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier. Discos dos compósitos (n=5) foram produzidos para avaliação da absorção e solubilidade, com base na norma ISO 4049:2000 (E). Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Resultados: A atividade metabólica do biofilme foi menor para ALI1 e ALI0,5. O grupo ALI0,25 apresentou semelhança estatística com os grupos ALI1, ALI0,5 e Controle. Em relação a quantificação de células planctônicas verificou-se que os grupos ALI1 e ALI0,5 apresentaram o número de células planctônicas menor que o Controle. ALI0,25 não diferiu de ALI0,5 e do Controle. Os grupos ALI1, ALI0,5 E ALI0,25 exibiram significativa menor perda de dureza nas margens das restaurações que o grupo controle. No grau de conversão observou-se que todos os grupos foram diferentes estatisticamente entre si e que o grupo controle apresentou o maior grau de conversão. A incorporação da Alicina causou aumento da absorção e da

solubilidade dos compósitos, diferindo do grupo controle. Dessa forma, pode-se concluir que a incorporação de Alicina a um compósito experimental apresenta efeito antibacteriano para *S. mutans* e é capaz de inibir a desmineralização das margens de cavidades em esmalte. Entretanto, mais estudos acerca da composição do compósito devem ser realizados para que se possa melhorar o grau de conversão e controlar a absorção e solubilidade dos compósitos.

Palavras-chave: resina bioativa, agentes antimicrobianos naturais, cárie recorrente, biofilme.

## ABSTRACT

Carvalho, ELM. Characterization and analysis of the antibacterial effect of experimental composites containing allicin [dissertation]; Niterói: Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2023.

The aim of this study was to characterize experimental composites containing Allicin in different concentrations (0.25%, 0.5%, 1%) and evaluate its effect on the formation of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) biofilm and the prevention of loss of enamel hardness. Methodology: An experimental composite (polymer matrix composed of Bis-GMA/TEGDMA (70/30% w/w) with 40% w/w of matrix and 60% w/w of boron-barium silicate nanoparticles, camphorquinone = 0.5% w/w and reducing agent ethyl N,N-dimethyl-4aminobenzoate (EDMAB = 1.0% w/w)) was manipulated and Allicin was incorporated in different concentrations (ALI0.25%, ALI0.5%, ALI1%). The Control composite didn't receive the addition of any antimicrobial substance. In the study, the antibiofilm effect was evaluated by making discs of each restorative composite (n=5) where the metabolic activity of the biofilm was evaluated (MTT assay) and the quantification of planktonic cells (turbidity). Inhibition of hardness loss was evaluated in the enamel margins of restorations made with experimental and control composites through Knoop microhardness analysis (n=5) before and after exposure to *S. mutans* biofilm. After that, the degree of conversion of composite discs (n=5) was evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy. Composite discs (n=5) were produced to evaluate sorption and solubility, based on the ISO 4049:2000 (E) standart. The data were subjected to analysis of variance and Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ). Results: The metabolic activity of the biofilm was lower for ALI1 and ALI0.5. The ALI 0.25 group showed statistical similarity with the ALI1, ALI 0.5 and control groups. Regarding the quantification of planktonic cells, it was found that the ALI1 and ALI0.5 groups had a lower number of planktonic cells than the Control. ALI0.25 didn't differ from ALI0.5 and the control group. The ALI1, ALI 0.5 and ALI 0.25 groups exhibited significantly less loss of hardness at the margins of the restorations than the control group. Regarding the degree of conversion, it was observed that all groups were statistically different from each other and that the control group presented the highest degree of conversion. The incorporation of Allicin caused a increase in the absorption and solubility of the composites, differing from the control group. Thus, it can be concluded that the incorporation



of Allicin into an experimental composite has an antibacterial effect against *S. mutans* and is capable of inhibiting the demineralization of the margins of enamel cavities. However, more studies on the composition of the composite must be carried out to improve the degree of conversion and control the absorption and solubility of the composites.

Keywords: bioactive resin, natural antimicrobial agents, recurrent caries, biofilm.

## **SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4. RESULTADOS.....	20
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da exigência estética, os materiais que mimetizam a estrutura dentária têm sido cada vez mais usados na odontologia. A resina composta apresenta resistência mecânica satisfatória e um efeito estético que mimetiza a estrutura dentária, o que a tornou o material mais comumente empregado em restaurações dentárias.<sup>1</sup> A cárie recorrente, que se refere às lesões de cárie que ocorrem adjacentes a uma restauração existente<sup>2</sup> é considerada como uma das principais razões para a falha da restauração à longo prazo.<sup>3</sup> A prevenção da cárie recorrente foi avaliada como tendo o maior potencial para a melhoria da longevidade do tratamento restaurador, sendo considerada uma propriedade essencial para futuros materiais restauradores.<sup>4</sup> Assim, desenvolver novos compósitos com propriedades anticárie se tornou um ponto importante de pesquisa.

A eliminação de patógenos dentais por agentes antibacterianos é uma prática comum. Assim, uma quantidade significativa de pesquisas foi conduzida acerca da incorporação de agentes antibacterianos em resinas compostas odontológicas.<sup>5-10</sup> Algumas substâncias testadas incluem flúor, clorexidina, amônio quaternário e partículas / íons de óxido de metal, como prata, ouro, titânio e zinco.<sup>5-10</sup> Produtos naturais podem ser fontes inovadoras e importantes de agentes anticárie<sup>11</sup>, e oferecem alternativas promissoras que podem substituir os regimes antibacterianos tradicionais usados atualmente.<sup>12</sup>

O alho (*Allium sativum*), pertencente a família Alliaca, e originado na Ásia Central, é utilizado desde os tempos antigos, devido a suas propriedades terapêuticas e medicinais.<sup>12</sup> Nas últimas décadas, vários estudos demonstraram um notável aspecto biológico das funções do alho, incluindo capacidade antioxidante, proteção cardiovascular, capacidade anticâncer, ação anti-inflamatória, propriedades imunomoduladoras, antidiabéticas, antiobesidade e antibacterianas.<sup>13-20</sup> A Alicina (tio-2-propeno-1-ácido sulfínico S-alil éster) foi vista como sendo o composto mais importante de alho recém-esmagado.<sup>21</sup> Essa substância é produzida instantaneamente quando os dentes de alho são esmagados ou danificados. A enzima aliinase e o composto alliin estão localizados em compartimentos separados em dentes de alho inteiros, e quando

o dente de alho é lesionado, a enzima atua sobre o composto alliin para produzir Alicina.<sup>11</sup> Esta substância é a precursora de compostos contendo enxofre, que são responsáveis pelo o sabor, odor e propriedades farmacológicas. Uma vez exposta ao ar, a Alicina é posteriormente convertida em dialildissulfeto, que tem efeitos antibacterianos, e ocorre uma redução pela cisteína, que romperá a ligação dissulfeto em proteínas microbianas.<sup>22</sup>

A Alicina, já teve suas propriedades antibacterianas comprovadas em trabalhos na odontologia.<sup>12,23-32</sup> Um estudo de Padiyar et al 2018, avaliou o efeito de um enxaguatório bucal contendo extrato de alho na contagem de *S. mutans* salivar e no estado de higiene oral. Foi visto que a substância foi eficiente na redução da contagem de *S. mutans* salivar, bem como na limitação da pontuação da placa <sup>28</sup>, sendo eficaz em sua ação antibacteriana. Entretanto, até o presente momento, não há estudos que incorporam a Alicina em materiais restauradores.

Desta forma, a caracterização de compósitos contendo agentes antimicrobianos e inibidores de biofilme como a Alicina pode ser um caminho para aumentar a longevidade das restaurações e reduzir falhas relacionadas à cárie secundária.

## 2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi caracterizar compósitos experimentais contendo a Alicina em diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) e avaliar seu efeito na inibição da formação do biofilme de *S. mutans* e na prevenção da perda de dureza do esmalte nas margens de restaurações.

Os objetivos específicos foram:

- i)* Avaliar se compósitos experimentais contendo Alicina apresentam efeito antibacteriano contra *S. mutans*;
- ii)* Avaliar se a incorporação de Alicina nos compósitos é capaz de inibir a perda de dureza nas margens em esmalte das restaurações;
- iii)* Avaliar se a incorporação de Alicina pode afetar o grau de conversão, a absorção e a solubilidade dos compósitos.

As hipóteses testadas foram que os compósitos experimentais contendo Alicina:

- (i)* São capazes de inibir a formação de biofilme de *S. mutans*;
- (ii)* Conseguem prevenir a desmineralização das margens das cavidades;
- (iii)* Não afetam o grau de conversão e a sorção e solubilidade.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Síntese dos Compósitos Experimentais

Um compósito experimental foi manipulado, sendo a matriz polimérica composta de Bis-GMA/TEGDMA (70/30 %p/p) (ESSTECH, Inc, EUA). O compósito teve 40 %p/p de matriz e 60 %p/p de nanopartículas de boro-bário silicato (ESSTECH, Inc, EUA). Foi adicionada a substância antimicrobiana testada: Alicina a 0,25%, 0,5%, 1%, formando os seguintes grupos, respectivamente: ALI0,25, ALI0,5 e ALI1. O compósito Controle não recebeu adição de nenhuma substância antimicrobiana. Finalmente, o fotoiniciador (canforoquinona = 0,5 %p/p) e o agente redutor etil N,N-dimetil-4aminobenzoato (EDMAB = 1,0 %p/p) (Aldrich Chemical, Inc., Milwaukee, WI, EUA) foram adicionados e o compósito foi centrifugado usando três ciclos de 1 min de 1500 rpm (DAC 140.1 FVZ SpeedMixer (FlackTek Inc., Herrliberg, Germany). Todos os espécimes no presente estudo foram fotoativados com uma unidade de luz LED (Radii-Cal, SDI, Victoria, Austrália) usando uma irradiância de 1000 mW/cm<sup>2</sup>. A irradiância do fotoativador foi aferida por um radiômetro (Demetron, Kerr, CA, EUA) a cada cinco espécimes confeccionados.

#### 3.2 Avaliação do efeito antibacteriano

A cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175 (American Type Culture Collection, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, BRA) foi utilizada para avaliar a atividade antibacteriana de discos de compósito sem Alicina (controle) e com diferentes concentrações de Alicina. Para isso, discos de cada compósito restaurador (n=5) foram confeccionados em matrizes metálicas de 5 mm de diâmetro por 1 mm de espessura, que foram e fotoativados por 40 segundos.

##### 3.2.1 Avaliação da atividade metabólica do biofilme

Os discos de compósitos experimentais (n=5 por grupo) foram transferidos para placas de 24 poços (TPP, 24 Zellkultur Festplatte, SUI) de fundo chato estéril. O biofilme foi formado a partir da adição de 2 ml de uma suspensão celular de *S. mutans* ATCC 25175 (American Type Culture Collection, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, Sparks, EUA) suplementado com 2% de sacarose por poço.

Previamente, a cepa de *S. mutans* ATCC 25175 foi cultivada durante 24 horas em BHI a 37 °C em condições de baixa tensão de oxigênio. O inóculo bacteriano foi ajustado para o ponto correspondente ao 0,5 da escala de McFarland. Posteriormente, a suspensão celular foi diluída 1: 100, e, em seguida, 10 µl do inóculo foi adicionado em cada poço. O volume final de 2 ml por poço foi atingido pela adição de BHI com 2% de sacarose. As placas de cultura de 24 poços foram incubadas a 37 °C em condições de baixa tensão de oxigênio, durante 48 horas. Durante os 2 dias de formação do biofilme, o meio de cultura foi substituído a cada 24 horas.

A atividade metabólica dos biofilmes de *S. mutans* formados sobre os discos de compósito foi analisada pelo ensaio de redução do brometo demetilotiazolilobrometo de tetrazólio azul (MTT, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). A reação que utiliza o MTT trata-se de um ensaio colorimétrico que mede a redução enzimática de MTT, um tetrazol amarelo, a formazan de coloração púrpura. Para isso, após a lavagem suave com PBS estéril (pH 7,2) dos discos para a remoção das células não aderidas ao biofilme, 1,0 ml de MTT estéril (1 mg / ml em PBS) foi adicionado a cada poço e incubado à 37°C em condições de baixa tensão de oxigênio durante 1 hora. Em seguida, 1,0 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço e a placa, mais uma vez, foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz e com agitação suave. Ao final, as suspensões foram submetidas a um leitor de microplacas com comprimento de onda de 540 nm. Uma absorbância maior é indicativa de uma concentração maior de formazan, o que, por sua vez, indica uma maior atividade metabólica do biofilme.

### 3.2.2 Quantificação de células planctônicas (turvação)

O crescimento celular de *S. mutans* também foi avaliado através da quantificação das células planctônicas no meio de cultura onde ocorreu a indução do biofilme bacteriano. Para isso, após as 48 h de indução do biofilme sobre os discos de compósito, 100 µl da suspensão celular de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços e essas submetidas a leitor de microplacas com comprimento de onda de 660 nm para avaliação da turvação do meio e

assim avaliar o crescimento celular, já que quanto mais turvo, maior é o número de células.

### 3.3 Avaliação da desmineralização do esmalte nas margens de cavidades

#### 3.3.1 Preparo das cavidades

Nesta etapa foram utilizados 10 molares humanos livres de cárie (aprovação pelo Comitê de Ética CEP – FMUFF – CAAE: 65621822.8.0000.5243), que foram imersos em cloramina a 0,5% (cloramina T - P.A., Vetec Química Fina Ltda., RJ, Brasil) durante 7 dias, e posteriormente lavados e armazenados em água destilada.

As raízes dos dentes foram removidas na altura da junção cimento-esmalte, utilizando pontas diamantadas em alta rotação. Posteriormente as coroas foram seccionadas no sentido vestibulo-lingual, separando-as em duas metades para formar 2 fragmentos de cada dente com 4mm x 4mm. Assim, foram obtidos 20 fragmentos com superfície em esmalte, que foram planificados em politriz. Foi realizada uma avaliação prévia da dureza (Knoop, 50 g, 10 s) dos espécimes (2 linhas com 3 indentações em cada, separadas por uma distância de 1000 µm) para a distribuição entre os 4 grupos (n=5) de acordo com os compósitos experimentais testadas: ALI0, ALI0,25%, ALI0,5% e ALI 1%. A variação da dureza dentro de cada grupo não poderia ser superior a 10%.

Cavidades padronizadas (2 mm x 2 mm; 1,5 mm de profundidade) foram confeccionadas nos fragmentos coronários, utilizando uma ponta diamantada (1092 KG Sorensen) em alta rotação, fixada em uma máquina padronizadora de preparos.

Em todos os grupos foi realizado o condicionamento do esmalte e dentina com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos, lavagem com água por 30 segundos e secagem com papel absorvente. O sistema adesivo Adper Single Bond 2 (3M Espe, EUA) foi aplicado ativamente por 20 segundos, seguido por secagem com ar por 5 segundos a 15 cm de distância e fotoativado (Ratii-Cal SDI, Bayswater, Victoria, Australia) por 20 segundos. O compósito experimental contendo Alicina nas concentrações selecionadas foi inserido em 1 incremento na cavidade e fotoativado por 40s (Ratii-Cal SDI, Bayswater, Victoria, Australia). O polimento



das restaurações foi realizado em politriz elétrica rotativa com lixas 1200 e 4000. Um esquema do preparo dos espécimes e das cavidades estão representados na figura 1 e 2.

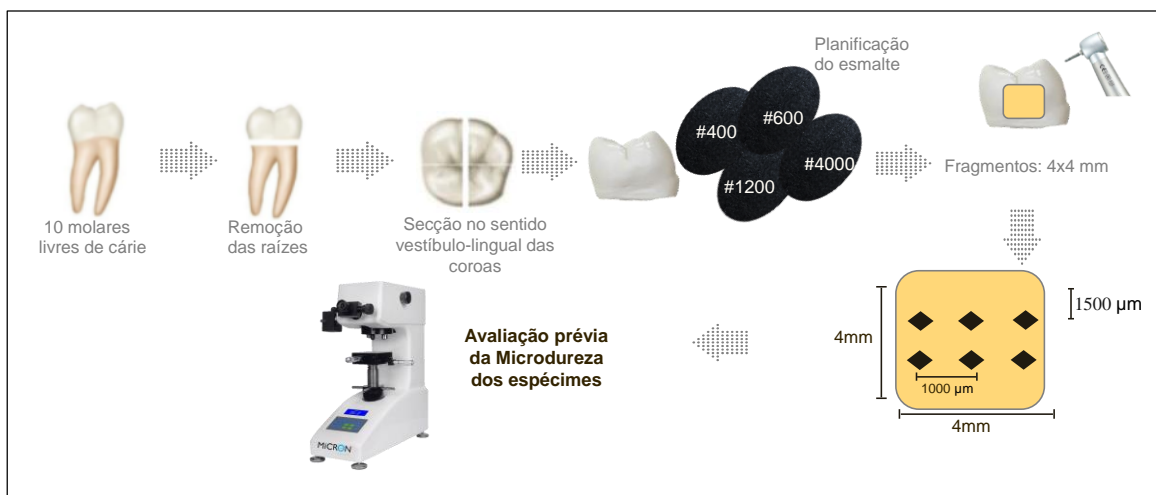


Figura 1 - Esquema representativo do preparo dos espécimes para avaliação da microdureza prévia.

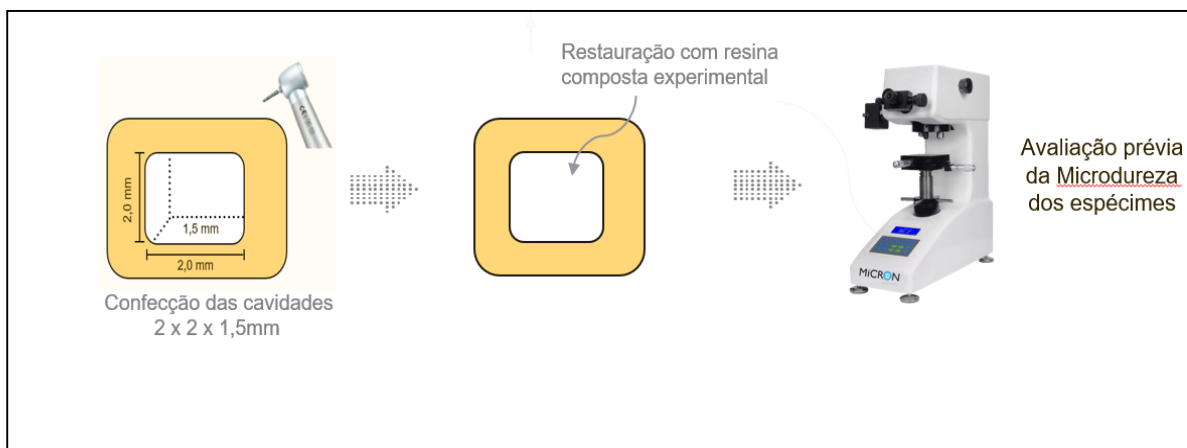


Figura 2. Esquema representativo do preparo das cavidades e avaliação inicial da microdureza.

### 3.3.2. Análise da dureza inicial do esmalte

Foi feita a análise da microdureza inicial (SMH) (Knoop, 50 g, 10 s) no esmalte em 5 linhas com 5 indentações em cada, com uma distância de 300 µm

entre cada indentação na mesma linha, localizadas a 50 $\mu$ m, 100 $\mu$ m, 150 $\mu$ m, 200 $\mu$ m e 250 $\mu$ m da margem da restauração (Figura 3).

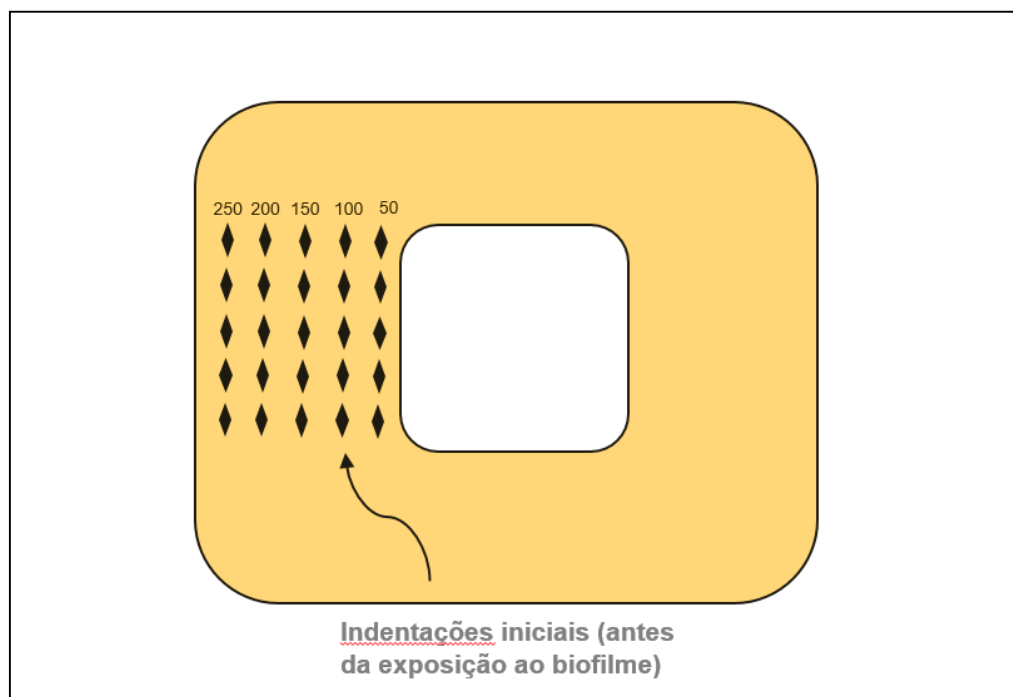


Figura 3. Esquema representativo da localização das indentações no ensaio de microdureza.

### 3.3.3 Indução do biofilme nos espécimes

Em seguida, os espécimes foram esterilizados com óxido de etileno por 1 hora, fixados em placas de 24 poços (24 Zellkultur Festplatte F, TPP, Suíça). Foram adicionados a cada poço 2,0 mL de suspensão celular de *S. mutans* em infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion* - BHI, Difco, Sparks, EUA) suplementado com 2% de sacarose. O biofilme maduro foi formado por *S. mutans* (cepa ATCC 25175 - American Type Culture Collection, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) cultivado durante 24 horas a 37°C em condições de baixa tensão de oxigênio. O inóculo bacteriano foi ajustado para uma densidade óptica de 0,5 a 550 nm utilizando um espectrofotômetro UV/Vis (Beckman Coulter DU® 530, LifeScience, San Diego, CA, EUA) de acordo com a escala McFarland (Biomérieux Brazil AS, RJ, Brasil). A suspensão bacteriana foi diluída a 1:100 e, em seguida, 10  $\mu$ L do inóculo foram adicionados em cada poço contendo um

fragmento e 2 mL de caldo BHI suplementado com 2% de sacarose. As placas de cultura de 24 poços foram incubadas a 37°C em uma condição de baixa tensão de oxigênio por 48 horas. Durante os dois dias de formação do biofilme, o meio de cultura foi substituído a cada 24 horas.

### 3.3.4 Análise de microdureza final do esmalte

Após a exposição do biofilme, foram realizadas novas análises (SMH1), nas mesmas regiões descritas acima, a 150 µm das indentações iniciais (Figura 3).

A porcentagem da mudança da dureza foi calculada através da equação:

$$\% \text{ Perda de Dureza} = \frac{100(\text{SMH1} - \text{SMH})}{\text{SMH}}$$

### 3.4 Avaliação do grau de conversão

Os incrementos de cada compósito foram inseridos em um molde de teflon (0,785 mm<sup>3</sup>) posicionado sobre um cristal ATR do espectrómetro FT-IR (Alpha-P/ Platinum ATR Module, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemanha) e os espectros entre 1600 e 1800 cm<sup>-1</sup> foram registados com 120 scans a uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Posteriormente, os incrementos foram fotopolimerizados e os espectros foram novamente registados (n = 5). O GC% foi calculado a partir da razão entre a área integral das bandas de absorção da ligação C = C alifática (1638 cm<sup>-1</sup>) e da ligação aromática C = C (1608 cm<sup>-1</sup>), utilizada como padrão interno, que foram obtidos a partir dos incrementos fotopolimerizados e não fotopolimerizados, utilizando a seguinte equação:

$$GC\% = 100 \times \{1 - (R_{\text{filme polimerizado}} / R_{\text{filme não polimerizado}})\}$$

onde R = altura da banda em 1639 cm<sup>-1</sup> / altura da banda em 1609 cm<sup>-1</sup>

### 3.5 Absorção (A) e solubilidade (S)

Cinco discos para cada compósito experimental foram confeccionados como descrito anteriormente, para o teste de sorção e a solubilidade, que foi conduzido com base na norma ISO 4049:2000 (E). Primeiramente, os discos foram colocados em um dessecador com sílica gel azul, mantidos em estufa a 37°C e pesados com precisão de 0,01 mg, em intervalos de 24 h, até a obtenção de uma massa constante ( $m_1$ ). Após a secagem, o diâmetro e a espessura dos espécimes foram mensurados com um paquímetro digital (MPI/E-101), e o volume ( $V$ ) calculado em  $\text{mm}^3$ . A seguir, os espécimes foram individualmente imersos em 10 ml de água destilada a 37°C por 7 dias e pesados com precisão de 0,01 mg ( $m_2$ ). Finalmente, os espécimes foram submetidos ao mesmo processo de secagem descrito para  $m_1$ , até a obtenção de nova massa constante ( $m_3$ ). A absorção e a solubilidade ( $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ ) foram obtidas através das seguintes equações:

$$A = (m_2 - m_3)/V$$

$$S = (m_1 - m_3)/V$$

### 3.6 Análise Estatística

Os valores originais foram submetidos, separadamente, ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade e ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. A análise de variância de 2 fatores foi realizada para os dados de perda de dureza. A análise de Variância (1 fator) foi realizada para os dados de atividade metabólica do biofilme, quantificação de células planctônicas, grau de conversão, sorção e solubilidade. Em seguida, os dados foram submetidos ao Teste Tukey. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do efeito antibacteriano do compósito experimental

Os resultados da avaliação da atividade metabólica do biofilme e quantificação de células planctônicas (turvação) estão apresentados na Tabela 1. A Análise de Variância mostrou que os resultados da atividade metabólica do biofilme foram estatisticamente diferentes ( $p=0,0010$ ). Após o teste Tukey, verificou-se que os grupos ALI1 e ALI0,5 não apresentaram diferença estatística entre si, e que obtiveram menor atividade metabólica do biofilme. O grupo ALI 0,25% apresentou semelhança estatística com os grupos ALI1, ALI0,5 e com o grupo controle. O grupo controle apresentou maior atividade metabólica do biofilme que ALI0,5 e ALI1.

Tabela 1: Valores médios ( $\pm$ DP) da atividade metabólica do biofilme e da quantificação de células planctônicas (turvação)

<b>Grupo</b>	<b>Atividade metabólica do biofilme</b>	<b>Turvação – células planctônicas (660nm)</b>
Controle	0,4766 (0,029) A	0,5868 (0,05) A
ALI0,25	0,3974 (0,054) AB	0,5235 (0,04) AB
ALI0,5	0,3557 (0,052) B	0,4550 (0,05) BC
ALI1	0,3182 (0,058) B	0,3806 (0,06) C

Valores com a mesma letra nas colunas são estatisticamente similares (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Em relação a quantificação de células planctônicas, a Análise de Variância mostrou que os resultados foram estatisticamente diferentes ( $p=0,0001$ ). Após o teste Tukey, verificou-se que o grupo ALI1 e ALI0,5 apresentaram o menor número de células planctônicas que grupo controle. ALI0,25 não diferiu de ALI0,5 e do grupo controle.

#### 4.2 Inibição da perda de dureza em margens de esmalte

Os resultados da análise de perda de dureza do esmalte estão apresentados na Tabela 3. A Análise de Variância de 2 fatores mostrou que o fator antibacteriano ( $p=0,000$ ) foi significativo. O fator distância ( $p=0,7010$ ) e a interação antibacteriano versus distância não foram significantes ( $p=0,8827$ ). Após o teste Tukey, verificou-se que o grupo controle foi diferente estatisticamente de outros os outros grupos, em todas as distâncias, tendo o maior valor de perda de dureza. Os grupos ALI0,25, ALI0,5 e ALI1 não apresentaram diferença estatística entre si.

Tabela 3: Médias de perda de dureza do esmalte (%) adjacente à restauração após exposição ao biofilme.

Grupo	Perda de dureza do esmalte (%)					Média
	50 $\mu$ m	100 $\mu$ m	150 $\mu$ m	200 $\mu$ m	250 $\mu$ m	
Controle	23,12 (5,4)	26,26 (2,4)	23,22(2,0)	22,51(4,7)	26,46 (3,2)	24,21A
ALI0,25	9,02 (5,8)	9,22 (4,4)	9,13 (4,6)	8,40 (3,0)	10,47 (7,4)	9,24 B
ALI0,5	8,94 (1,8)	10,12 (3,7)	6,67 (2,6)	8,30 (3,1)	6,14 (1,8)	8,03 B
ALI1	12,00 (6,5)	9,44 (5,4)	9,91 (7,3)	9,14 (3,4)	9,45 (6,1)	9,98 B

Valores com a mesma letra são estatisticamente similares (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

#### 4.3 Análise do grau de conversão

Os resultados do grau de conversão estão apresentados na tabela 4. A Análise de Variância de 2 fatores mostrou que os resultados foram significativos ( $p=0,000$ ). Após o teste de Tukey, observou-se que todos os grupos foram diferentes estatisticamente entre si e que o grupo controle apresentou o maior valor de grau de conversão dos grupos testados.

Tabela 4: Valores médios ( $\pm$ DP) do grau de conversão dos compósitos.

<b>Grupo</b>	<b>Grau de conversão</b>
Controle	57,9 (1,45) A
ALI0,25	55,6 (0,47) B
ALI0,5	50,4 (0,60) C
ALI1	43,2 (0,22) D

Valores com a letra diferente são estatisticamente diferentes (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

#### 4.4 Análise da absorção e solubilidade

Com relação aos dados de absorção e solubilidade a Análise de Variância mostrou diferença significativa entre os grupos ( $p=0,0000$ ) para absorção e para solubilidade ( $p=0,0000$ ). A incorporação da Alicina afetou significativamente a absorção e a solubilidade dos grupos testados e todos diferiram do grupo controle. Na tabela 5, estão resumidos os resultados.

Tabela 5: Resultados de absorção (unidade) e solubilidade (unidade) ( $\pm$ DP) dos compósitos.

<b>Grupo</b>	<b>Absorção</b>	<b>Solubilidade</b>
Controle	68,0 (3,9) A	4,2 (1,9) A
ALI0,25	83,9 (10,3) B	35,7 (9,6) B
ALI0,5	92,5 (6,8) B	90,3 (16,2) C
ALI1	118,7 (9,5) C	167,9 (22,3) D

Valores com a mesma letra são estatisticamente similares em cada coluna (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

**AVALIAR ESSA QUESTÃO DA LIBERAÇÃO: É PREJUDICIAL COM GRAU DE CONVERSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo realizou-se a adição de uma substância antimicrobiana de origem natural em um compósito experimental, no intuito de analisar os efeitos sobre a dureza do esmalte e sobre as propriedades físico-químicas do compósito experimental. A Alicina foi selecionada porque estudos prévios demonstram que essa substância atua como um antimicrobiano natural.<sup>33</sup> Entretanto, nenhum estudo prévio incorporou essa substância em um compósito. Com base nisso, a primeira investigação do presente estudo foi a avaliação do efeito antimicrobiano. A justificativa para isso foi que se o compósito com Alicina não apresentasse resposta sobre as bactérias, não faria sentido avaliar as outras propriedades do material restaurador.

Na avaliação da atividade metabólica do biofilme, observou-se que as maiores concentrações de Alicina (Ali0,5 e Ali1) diminuíram a atividade metabólica do biofilme, enquanto a menor concentração foi semelhante a todos os grupos. Além disso, a incorporação da Alicina provocou uma diminuição na quantificação de células planctônicas, ou seja, menor foi o crescimento celular. E neste caso, aumentando a concentração de Alicina, observou-se um menor crescimento celular. Um estudo prévio já demonstrou esta relação dose-efeito entre o efeito antimicrobiano e a concentração de Alicina.<sup>33</sup> O estudo de Guo et al., 2014 mostrou que diferentes concentrações de Alicina (20, 40 e 60%) em solução poderiam inibir o crescimento bacteriano de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. O número de colônias bacterianas foi registrado e foi visto que nas três cepas bacterianas testadas, a maior concentração de Alicina provocou maior inibição do crescimento bacteriano.<sup>33</sup>

Um estudo de Bachrach et al., (2011) mostrou que a exposição do biofilme de *S. mutans* por 1 hora a 2.200 µg/mL de uma solução aquosa de Alicina resultou em morte bacteriana significativa, e essa redução bacteriana foi mais evidente nas camadas mais externas do biofilme. Aumentando a concentração de Alicina para 4.500 µg/mL e 9.800 µg/mL houve um aumento na taxa de mortalidade bacteriana e uma maior penetração da Alicina para



camadas mais profundas do biofilme<sup>34</sup>. Esses resultados coincidem com um estudo de Jiménez-García et al., (2017)<sup>35</sup>, que mostrou que a Alicina a 10, 20, 40 e 80% apresentou um bom efeito antibacteriano contra cepas de *S. mutans*, com halos de inibição de 10 a 23mm, e que houve influência da concentração, já que os maiores halos de inibição foram apresentados nos extratos com 80% de concentração.<sup>35</sup> Um outro estudo, de Oliveira MF (2022), testou a adição de Alicina em um sistema adesivo de condicionamento ácido total, contendo diferentes concentrações de alicina (0,5%, 1%, 2% e 4%). Os resultados de crescimento de células planctônicas (turvação) e do MTT mostraram um efeito antibacteriano dos sistemas adesivos com todas as concentrações de alicina, diferentemente do grupo controle, assim como no presente estudo.<sup>36</sup> O modo de ação exibido pela Alicina tem sido associado ao seu direcionamento seletivo nas proteínas e enzimas contendo tiol dos microrganismos, inibindo e/ou interrompendo suas vias metabólicas essenciais.<sup>37</sup> Um estudo prévio mostrou que a Alicina difunde-se facilmente através das membranas fosfolipídicas e quando está dentro da célula e sua eficiência antimicrobiana consiste em alcançar e reagir com seus alvos celulares.<sup>38</sup> Isso pode justificar o efeito antibacteriano sobre a cepa de *S. mutans* testada no presente trabalho.

Os testes de microdureza fornecem informações sobre as propriedades físicas do esmalte superficial em resposta à situações de desmineralização, e observa-se que ocorre um aumento da perda mineral com o processo de desmineralização.<sup>39</sup> Segundo o presente estudo, a Alicina foi capaz diminuir a perda de dureza no esmalte em todas as concentrações testadas, quando comparada ao grupo controle. Isto mostra que a substância incorporada ao compósito experimental foi capaz de inibir a desmineralização nas margens da restauração quando a superfície foi exposta ao biofilme. Outro dado importante é que a inibição da desmineralização do esmalte ocorreu em todas as distâncias avaliadas. Esse resultado coincide com um estudo de Firoozmand et al., (2022) que tinha como objetivo desenvolver resinas contendo agentes bioativos naturais (proantocianidinas de *Vitis vinifera* e cálcio silicato) e avaliar seu papel protetor na dentina e margens de esmalte de restaurações cervicais contra desmineralização simulada com indução de

baixa e alta atividade de cárie. Nesse estudo, foi observado que a resina bioativa auxiliou na preservação da microdureza da dentina e esmalte circundante à restauração visto que valores mais altos de microdureza adjacente as restaurações foram observadas com os grupos de compósitos bioativos, independentemente do agente utilizado. Além disso, também foi observado que os grupos contendo os agentes bioativos resultaram em menor micropermeabilidade, menor extensão da desmineralização e menor área de desmineralização em comparação com o grupo controle.<sup>40</sup> O estudo de Oliveira MF (2022), descrito anteriormente, mostrou que os sistemas adesivos com Alicina nas concentrações de 0,5% e 1% apresentaram menor perda de dureza nas distâncias de 50, 100 e 150  $\mu\text{m}$ , medidas a partir da interface adesiva, quando comparadas ao grupo controle. Isso foi compatível com a resposta encontrada com a adição da Alicina em um compósito experimental.<sup>36</sup> Ao relacionar esses resultados com o presente estudo e com a clínica diária, pode-se perceber que o uso da substância testada pode minimizar a desmineralização da superfície de esmalte e o desenvolvimento de cárie recorrente nas margens das restaurações adesivas.

Durante a reação de polimerização, os compósito resinosos passam de um estado viscoso para um estado rígido por uma polimerização dos monômeros de dimetacrilato presentes em suas matrizes poliméricas.<sup>41</sup> Essa reação é medida através do grau de conversão. No presente estudo, observou-se que o grau de conversão de todos os grupos foi diferente estatisticamente entre si e que o grupo controle apresentou o maior valor de grau de conversão. A diminuição do grau de conversão em resinas bioativas já foi descrita em estudos prévios.<sup>42,43</sup> Um estudo de Parr et al. (2018), caracterizou uma resina composta experimental com a quantidade sistematicamente variável de vidro bioativo 45S5. Foi observado que o grau de conversão e a profundidade da cura foram diminuídos pelo vidro bioativo de maneira dose dependente, comportamento similar ao que ocorreu na presente pesquisa. A hipótese explicativa é que as partículas bioativas tenham exercido algum tipo de efeito inibitório na polimerização, o que também pode ter acontecido com a adição de Alicina, justificando os resultados desse estudo.<sup>42</sup> Um outro estudo, de Brandão et al., (2018) avaliou

a atividade contra o biofilme de *S. mutans* de modelos de resinas compostas incorporadas com diferentes concentrações de nanopartículas de ZnO (ZnO-NP). Foi visto que houve uma relação inversamente proporcional de ZnO-NP% em peso com o grau de conversão, mostrando que quanto maior a concentração de ZnO-NP, menor o grau de conversão dos compósitos testados, o que foi compatível aos nossos resultados. Os autores relataram que essa diminuição do grau de conversão pode estar associada a diminuição da translucidez dos compósitos com maior teor de ZnO-NP, devido à dissimilaridade entre o índice de refração da mistura Bis-GMA:TEGDMA (70:30) (1,52), e a do ZnO-NP (2.02).<sup>44</sup> Além disso, o estudo de Oliveira MF (2022), também mostrou que a adição de Alicina interferiu no processo de polimerização. Os grupos com incorporação de Alicina apresentaram menor GC% que o grupo Controle, e os grupos Alicina 2% e Alicina 4% apresentaram GC% significativamente menor que os grupos Alicina 0,5% e Alicina 1%.<sup>36</sup> Com base nestes estudos, uma hipótese para solucionar esta diminuição do grau de conversão seria alterar a concentração e os tipos de fotoiniciadores ou a concentração de Alicina. Entretanto, para a confirmação, mais pesquisas são necessárias.

Durante a progressão da reação de polimerização, a taxa de difusão dos radicais livres em propagação sofre uma redução, isto é, a conversão dos monômeros em polímeros não é completa, e ao final da reação, parte dos monômeros permanece como ligações duplas pendentes ou como monômeros não reagidos presos na matriz polimérica.<sup>45</sup> Segundo Sideridou et al., (2003), a solubilidade depende da quantidade de monômeros não reagidos aprisionados na matriz polimérica<sup>46</sup> e presença de monômeros que não reagiram está diretamente relacionada com do grau de conversão da resina.<sup>47</sup> No presente estudo, a incorporação da Alicina afetou significativamente a absorção e a solubilidade dos grupos testados e todos diferiram do grupo controle, que obteve menor valor nas duas propriedades.

No estudo de Epasinghe et al. (2017), foi avaliado o efeito da incorporação do extrato de semente de uva (GSE) nas propriedades mecânicas, absorção de água, solubilidade e liberação de GSE das resinas experimentais. A solubilidade das resinas incorporadas com GSE foi afetada negativamente pela adição de 1,5

e 2% da substância testada. Segundo o autor, uma solubilidade mais elevada é uma indicação indireta do menor grau de conversão da resina. Da mesma forma, no presente estudo, foi observado menor grau de conversão e maior solubilidade dos grupos com o aumento da concentração de Alicina. Por outro lado, os autores não encontraram diferença significativa na absorção de água das diferentes resinas incorporadas com GSE, enquanto no presente estudo aumentando a concentração de Alicina aumentou a absorção de água.<sup>47</sup>

Dessa forma, pode-se destacar que a incorporação de Alicina a um compósito experimental apresenta efeito antibacteriano para *S. mutans* e é capaz de inibir a desmineralização das margens de cavidades em esmalte. Entretanto, mais estudos acerca da composição do compósito devem ser realizados para que se possa melhorar o grau de conversão e controlar a absorção e solubilidade dos compósitos.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

- (i) Os compósitos experimentais com concentrações de 0,5% e 1% de Alicina apresentaram efeito antimicrobiano para *S. mutans* e redução da atividade metabólica do biofilme;
- (ii) Os compósitos experimentais reduziram a perda de dureza do esmalte nas margens de restaurações em todas as distâncias avaliadas, com todas as concentrações de Alicina (0,25%, 0,5% e 1%);
- (iii) A incorporação de Alicina (em todas as concentrações) reduziu o grau de conversão, aumentou a absorção e aumentou a solubilidade dos compósitos experimentais, interferindo nessas propriedades com o aumento da concentração.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zheng L, Li K, Ning C, Sun J. Study on antibacterial and fluoride-releasing properties of a novel composite resin with fluorine-doped nano-zirconia fillers. *J Dent.* 2021 Oct;113:103772.
2. Askar H, Krois J, Göstemeyer G, Schwendicke F. Secondary caries risk of different adhesive strategies and restorative materials in permanent teeth: Systematic review and network meta-analysis. *J Dent.* 2021 Jan;104:103541.
3. Eltahlah D, Lynch CD, Chadwick BL, Blum IR, Wilson NHF. An update on the reasons for placement and replacement of direct restorations. *J Dent.* 2018 May;72:1-7.
4. Seemann R, Flury S, Pfefferkorn F, Lussi A, Noack MJ. Restorative dentistry and restorative materials over the next 20 years: a Delphi survey. *Dent Mater.* 2014 Apr;30(4):442-8.
5. Farrugia C, Camilleri J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review. *Dent Mater.* 2015 Apr;31(4):e89-99.
6. Zhang JF, Wu R, Fan Y, Liao S, Wang Y, Wen ZT, Xu X. Antibacterial dental composites with chlorhexidine and mesoporous silica. *J Dent Res.* 2014 Dec;93(12):1283-9.
7. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2012 May;28(5):561-72.
8. Glasspoole EA, Erickson RL, Davidson CL. A fluoride-releasing composite for dental applications. *Dent Mater.* 2001 Mar;17(2):127-33.
9. ŁSokołowski J, Szykowska MI, Kleczewska J, Kowalski Z, Sobczak-Kupiec A, Pawlaczyk A, Sokołowski K, Łukomska-Szymańska M. Evaluation of resin composites modified with nanogold and nanosilver. *Acta Bioeng Biomech.* 2014;16(1):51-6.
10. Schnaider L, Ghosh M, Bychenko D, Grigoriants I, Ya'ari S, Shalev Antsel T, Matalon S, Sarig R, Brosh T, Pilo R, Gazit E, Adler-Abramovich L. Enhanced

Nanoassembly-Incorporated Antibacterial Composite Materials. ACS Appl Mater Interfaces. 2019 Jun 19;11(24):21334-21342.

11. Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. Adv Dent Res. 2009;21(1):63-8.

12. Bachrach G, Jamil A, Naor R, Tal G, Ludmer Z, Steinberg D. Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. J Med Food. 2011 Nov;14(11):1338-43..

13. Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, Mavumengwana V, Li HB. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). Foods. 2019 Jul 5;8(7):246.

14. Boonpeng S, Siripongvutikorn S, Sae-Wong C, Sutthirak P. The antioxidant and anti-cadmium toxicity properties of garlic extracts. Food Sci Nutr. 2014 Nov;2(6):792-801.

15. Lee DY, Li H, Lim HJ, Lee HJ, Jeon R, Ryu JH. Anti-inflammatory activity of sulfur-containing compounds from garlic. J Med Food. 2012 Nov;15(11):992-9.

16. Hayat S, Cheng Z, Ahmad H, Ali M, Chen X, Wang M. Garlic, from Remedy to Stimulant: Evaluation of Antifungal Potential Reveals Diversity in Phytoalexin Allicin Content among Garlic Cultivars; Allicin Containing Aqueous Garlic Extracts Trigger Antioxidants in Cucumber. Front Plant Sci. 2016 Aug 25;7:1235.

17. Percival SS. Aged Garlic Extract Modifies Human Immunity. J Nutr. 2016 Feb;146(2):433S-436S.

18. Lee HS, Lim WC, Lee SJ, Lee SH, Lee JH, Cho HY. Antiobesity Effect of Garlic Extract Fermented by *Lactobacillus plantarum* BL2 in Diet-Induced Obese Mice. J Med Food. 2016 Sep;19(9):823-9.

19. Seckiner I, Bayrak O, Can M, Mungan AG, Mungan NA. Garlic supplemented diet attenuates gentamicin nephrotoxicity in rats. Int Braz J Urol. 2014 Jul-Aug;40(4):562-7.

20. Yun HM, Ban JO, Park KR, Lee CK, Jeong HS, Han SB, Hong JT. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. Pharmacol Ther. 2014 May;142(2):183-95..

21. Cavallito CJ, Bailey JH. Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. J Am Chem Soc. 1944; 66(11): 1950–51.

22. Groppo FC, Ramacciato JC, Motta RH, Ferraresi PM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. *Int J Dent Hyg*. 2007 May;5(2):109-15.
23. Jiang XW, Zhang Y, Song GD, Li FF, Peng HY, Yang SK, Sun GL. Clinical evaluation of allicin oral adhesive tablets in the treatment of recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Apr;113(4):500-4.
24. Banavar Ravi S, Nirupad S, Chippagiri P, Pandurangappa R. Antibacterial Effects of Natural Herbal Extracts on *Streptococcus mutans*: Can They Be Potential Additives in Dentifrices? *Int J Dent*. 2017;2017:4921614.
25. Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J*. 2002 Dec;52(6):433-7.
26. Mathai K, Anand S, Aravind A, Dinatius P, Krishnan AV, Mathai M. Antimicrobial Effect of Ginger, Garlic, Honey, and Lemon Extracts on *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*. 2017 Nov 1;18(11):1004-08.
27. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B, Gupta N. Comparative Evaluation of Antibacterial Efficacy of Six Indian Plant Extracts against *Streptococcus Mutans*. *J Clin Diagn Res*. 2015 Feb;9(2):ZC50-3.
28. Padiyar B, Marwah N, Gupta S, Padiyar N. Comparative Evaluation of Effects of Triphala, Garlic Extracts, and Chlorhexidine Mouthwashes on Salivary *Streptococcus mutans* Counts and Oral Hygiene Status. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018 Jul-Aug;11(4):299-306.
29. Thomas A, Thakur S, Habib R. Comparison of Antimicrobial Efficacy of Green Tea, Garlic with Lime, and Sodium Fluoride Mouth Rinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* species, and *Candida albicans* in Children: A Randomized Double-blind Controlled Clinical Trial. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2017: 234–239.
30. Thomas A, Thakur S, Mhambrey S. Comparison of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine, sodium fluoride, fluoride with essential oils, alum, greentea, and garlic with lime mouthrinses on cariogenic microbes. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015: 302–08.
31. Kanth MR, Prakash AR, Sreenath G, Reddy VS, Huldah S. Efficacy of Specific Plant Products on Microorganisms Causing Dental Caries. *J Clin Diagn Res*. 2016 Dec;10(12):ZM01-ZM03.



32. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B, Gupta N. Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria--*Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2015 Mar-Apr;26(2):110-5
33. Guo Y. Experimental study on the optimization of extraction process of garlic oil and its antibacterial effects. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014 Jan 28;11(2):411-4.
34. Bachrach G, Jamil A, Naor R, Tal G, Ludmer Z, Steinberg D. Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. *J Med Food*. 2011 Nov;14(11):1338-43.
35. Jiménez-García AF, Zambrano-Gutiérrez MI. Efecto antibacteriano del extracto de *Allium sativum* (ajo) blanco, púrpura y Clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans*. *Dominio De Las Ciencias*. (2017) 3(1), 234–247.
36. Oliveira MF. Incorporação da alicina em um sistema adesivo experimental: avaliação do efeito anticárie e na adesão à dentina. Niterói, 2022. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica AC Dentística). Universidade Federal Fluminense.
37. Strehlow B, Bakowsky U, Pinnapir SR. A novel microparticulate formulation with allicin in situ synthesis. *J Pharm Drug Deliv*. 2016 Res 5: 1–6.
38. Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000 1463(1), 20–30.
39. Alkattan R, Lippert F, Tang Q, Eckert GJ, Ando M. The influence of hardness and chemical composition on enamel demineralization and subsequent remineralization. *J Dent*. 2018 Aug;75:34-40
40. Firoozmand LM, Alania Y, Bedran-Russo AK. Development and Assessment of Bioactive Coatings for the Prevention of Recurrent Caries Around Resin Composite Restorations. *Oper Dent*. 2022 May 1;47(3):E152-E161.
41. Gonçalves L, Filho JD, Guimarães JG, Poskus LT, Silva EM. Solubility, salivary sorption and degree of conversion of dimethacrylate-based polymeric matrixes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 May;85(2):320-5.
42. Par M, Spanovic N, Bjelovucic R, Skenderovic H, Gamulin O, Tarle Z. Curing potential of experimental resin composites with systematically varying amount of

bioactive glass: Degree of conversion, light transmittance and depth of cure. *J Dent.* 2018 Aug;75:113-20.

43. Par M, Tarle Z, Hickel R, Ilie N. Polymerization kinetics of experimental bioactive composites containing bioactive glass. *J Dent.* 2018 Sep;76:83-8.

44. Brandão NL, Portela MB, Maia LC, Antônio A, Silva VLME, Silva EMD. Model resin composites incorporating ZnO-NP: activity against *S. mutans* and physicochemical properties characterization. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170270.

45. Ferracane JL, Greener EH. The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. *J Biomed Mater Res* 1986;20:121–31.

46. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2003;24:655–65.

47. Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF. Mechanical properties, water sorption characteristics, and compound release of grape seed extract-incorporated resins. *J Appl Oral Sci.* 2017 Jul-Aug;25(4):412-19.