

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/03/2020.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Luciana Guilherme Navarro

Avaliação das propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade e atividade antimicrobiana de novos cimentos obturadores

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Luciana Guilherme Navarro

Avaliação das propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade e atividade antimicrobiana de novos cimentos obturadores

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2018

Navarro, Luciana Guilherme

Avaliação das propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade e atividade antimicrobiana de novos cimentos obturadores / Luciana Guilherme Navarro. – Araraquara: [s.n.], 2018
88 f ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Cimentos dentários 2. Endodontia 3. Obtenção do canal radicular I. Título

Luciana Guilherme Navarro

Avaliação das propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade e atividade antimicrobiana de novos cimentos obturadores

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de mestre em Odontologia

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1º Examinador: Prof. Dr. Norberto Batista de Faria Junior

2º Examinador: Prof. Dr. Bruno Cavalini Cavenago

Araraquara, 15 de Março de 2018

DADOS CURRICULARES

Luciana Guilherme Navarro

NASCIMENTO: 24/02/1992 - Franca- SP

FILIAÇÃO: Edna Lúcia Guilherme Navarro

Eduardo Maura Navarro

2011 - 2015: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara
FOAR– UNESP.

2014 - 2014: Curso de extensão e atualização em Endodontia – FAEPO

2017 - 2017: Curso de Cirurgia Oral Menor- ABO Araraquara

2016 - 2018: Mestrado em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara
FOAR– UNESP

2017 - atual: Especialização em Endodontia- FAEPO / Herrero, Araraquara

Associação: SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia

Aos *meus pais* **Edna Lúcia Guilherme Navarro e Eduardo Maura Navarro**, que me deram todo apoio para que eu pudesse chegar até aqui e concluir mais uma etapa na minha formação profissional.

Ao *meu namorado*, **Rafael Sanvezzo Delfim** que sempre esteve ao meu lado me incentivando e apoiando.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)*, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Vice-Reitor Prof. Dr. Sérgio Roberto Nobre.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, na pessoa da sua Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e Vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves Campos.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia*, coordenado pelo Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli.

À minha orientadora, *Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru* pela oportunidade, dedicação, apoio e todo aprendizado que me proporcionou ao longo da minha formação.

Ao *Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho*, por todo aprendizado durante o desenvolvimento desta tese e por me incentivar e apoiar a cada passo e tomada de decisões.

À *Dra. Gisselle Moraima Chávez Andrade* pela amizade, carinho e disposição que sempre recebi. Agradeço também por todo aprendizado e por sempre me incentivar e apoiar.

À *Profa. Dra. Gisele Faria*, pelos ensinamentos, apoio e colaboração neste trabalho.

À *Dra. Elisandra Márcia Rodrigues*, pela amizade, apoio e todo auxílio prestado durante o desenvolvimento desta tese.

À doutoranda *Fernanda Ferrari Esteves Torres* pelo auxílio durante a pesquisa e apoio e disposição.

Aos *funcionários da Seção de Pós-Graduação* Alexandre e Cristiano, pela ajuda e auxílio prestado.

Aos *funcionários da Biblioteca*, Ceres, Marley, Adriano, Inês, Cristina, Silvia, Eliane e Disleide, pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas e na documentação.

Aos *colegas da Pós-Graduação*, Cristiane, Ariel, Marcela, Jáder, Hernán, Giovana, Lívia, Patrícia e Rafaela pela amizade e companheirismo.

À *CAPES* pela concessão da bolsa de estudo.

A *todos* que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

Navarro LG. Avaliação das propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade e atividade antimicrobiana de novos cimentos obturadores [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Cimentos endodônticos devem apresentar propriedades físico-químicas e biológicas adequadas. **Publicação 1-** Avaliação da citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana dos cimentos GuttaFlow bioseal (GFB) e TotalFill BC (TF), comparados ao AH Plus (AHP). A citotoxicidade e bioatividade celular (Saos-2) foram avaliadas por meio dos ensaios de metil tetrazólio (MTT), vermelho neutro (VN), atividade da fosfatase alcalina (ALP) e vermelho de alizarina (ARS). O potencial bioativo foi avaliado em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para avaliação da eficácia antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans* foram realizados os testes de contato direto sobre células planctônicas ou biofilme. Dados da viabilidade celular e atividade de ALP foram submetidos aos testes *two-way* ANOVA e Bonferroni *post-test*. ANOVA e Tukey foram usados para análise do ARS e da atividade antimicrobiana ($\alpha=0,05$). GFB e TF não mostraram efeitos citotóxicos. GFB mostrou maior atividade de ALP aos 7 dias e foi efetivo sobre biofilme de *C. albicans* e dual-espécies. TF induziu maior deposição de nódulos mineralizados no ensaio ARS, mostrou maior potencial bioativo em MEV e maior atividade antimicrobiana sobre células planctônicas e biofilme de *E. faecalis*. **Publicação 2-** Avaliação dos cimentos NeoMTA Plus (NMTAP) e MTA Fillapex (MTAF) em comparação ao AHP. Foram avaliadas as propriedades de alteração volumétrica (AV), citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana. O tempo de presa (TP) e escoamento foram avaliados segundo normas ISO-6876. O pH foi avaliado em diferentes períodos. A solubilidade foi avaliada após 7 dias de imersão em água destilada e expressa em porcentagem de perda de massa. A radiopacidade foi avaliada usando discos dos cimentos e radiografias para determinar valores em milímetros de alumínio (mmAl). AV foi avaliada em microtomografia computadorizada (Micro-CT). Os testes para avaliar a citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana foram realizados como descrito na Publicação 1. Dados das análises físico-químicas, AV, atividade antimicrobiana e bioatividade celular (ARS) foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey; e de viabilidade celular e ALP aos testes *two-way* ANOVA e Bonferroni *post-test* ($\alpha=0,05$). MTAF mostrou maior TP, solubilidade e escoamento. NMTAP e MTAF mostraram menor radiopacidade. NMTAP mostrou maiores valores de pH em todos os períodos, seguido por MTAF. MTAF mostrou maior AV nos dois períodos avaliados e maior atividade antimicrobiana sobre células planctônicas de *C. albicans*. NMTAP mostrou valores de viabilidade celular, maior atividade de ALP, maior indução de nódulos mineralizados no ensaio ARS, maior potencial bioativo em MEV e maior atividade antibiofilme sobre *C. albicans* e dual-espécies. **Conclusão:** Conclui-se que GFB, TF e AHP apresentam citocompatibilidade, enquanto GFB e TF mostraram bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana. NMTAP e AHP apresentam adequadas propriedades físico-químicas (TP, solubilidade e AV), citocompatibilidade e bioatividade celular. NMTAP mostrou potencial bioativo e atividade antimicrobiana sobre biofilme de *C. albicans* e dual-espécies, porém apresenta menor escoamento e radiopacidade. A nova formulação de MTAF demonstra redução volumétrica, alta solubilidade, menor radiopacidade, maior citotoxicidade, baixa bioatividade celular, e atividade antimicrobiana sobre células planctônicas de *C. albicans*. GFB, TF e NMTAP apresentam potencial para serem usadas na obturação dos canais radiculares.

Palavras-chave: Cimentos dentários. Endodontia. Obturação do canal radicular.

Navarro LG. Evaluation of the physico-chemical properties, cytotoxicity, bioactivity and antimicrobial activity of new endodontic sealers [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Endodontic sealers have to show adequate physico-chemical and biological properties. **Publication 1-** aims to evaluate the cytotoxicity, cell bioactivity, bioactive potential and antimicrobial activity of GuttaFlow bioseal (GFB) and TotalFill BC (TF), compared to AH Plus sealer (AHP). Cytotoxicity and cell bioactivity (Saos-2) were evaluated by methyl tetrazolium (MTT), neutral red (VN), alkaline phosphatase (ALP) and alizarin red (ARS) assays. The bioactive potential was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). To evaluate the antimicrobial and/or antibiofilm efficacy against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* were realized direct contact test on planktonic cells or biofilm. Cell viability data and ALP activity were submitted to two-way ANOVA and Bonferroni post-test. ANOVA and Tukey were used for ARS analysis ($\alpha=0.05$). GFB and TF showed no cytotoxic effects. GFB showed higher ALP activity at 7 days and was effective against biofilms of *C. albicans* and dual-species. TF induced higher deposition of mineralized nodules with ARS assay and higher bioactive potential in SEM and higher antimicrobial activity on planktonic cells and biofilm of *E. faecalis*. **Publication 2-** aims to evaluate the MTA Fillapex (MTAF) and NeoMTA Plus (NMTAP) sealers in comparison to the AHP. The physicochemical properties, volumetric alteration (VA), cytotoxicity, cell bioactivity, bioactive potential and antimicrobial activity were evaluated. Setting time (ST) and flow were evaluated according to ISO-6876 standards. pH was evaluated in different periods. Solubility was evaluated after 7 days of immersion in distilled water and expressed as percentage of mass loss. Radiopacity was evaluated using sealers discs and x-rays to determine values in millimeters of aluminum (mmAl). VA was evaluated in micro-computed tomography (Micro-CT) in periods of 7 and 30 days. The tests to evaluate the cytotoxicity, cell bioactivity, bioactive potential and antimicrobial activity were performed as described in Publication 1. Physicochemical, VA and cell bioactivity (ARS) were submitted to the ANOVA and Tukey tests; and cell viability and ALP to two-way ANOVA and Bonferroni post-test ($\alpha = 0.05$). MTAF showed higher TP, solubility and flow. NMTAP and MTAF showed lower radiopacity. NMTAP showed higher pH values at all periods, followed by MTAF. MTAF showed higher VA in both periods evaluated and higher antimicrobial activity on planktonic cells of *C. albicans*. NMTAP showed values of cellular viability, and higher ALP, higher induction of mineralized nodules in the ARS, higher bioactive potential in SEM and higher antibiofilm activity against *C. albicans* and dual-species. **Conclusion:** It is concluded that GFB, TF and AHP showed cytocompatibility, while GFB and TF showed cell bioactivity, bioactive potential and antimicrobial activity. NMTAP and AHP showed proper physicochemical properties (ST, solubility and VA), cytocompatibility, and cell bioactivity. NMTAP showed bioactive potential and antimicrobial activity on biofilms of *C. albicans* and dual-species, however, showed lower flow and radiopacity. The new formulation of MTAF shows volumetric reduction, high solubility, lower radiopacity, higher cytotoxicity, low cell bioactivity, and antimicrobial efficacy on planktonic cells of *C. albicans*. GFB, TF and NMTAP showed potential to be used as root canal filling materials.

Keywords: Dental cements. Endodontics. Root canal obturation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Cimentos Obturadores à Base de Silicone e Guta-percha.....	12
1.2	Novos Cimentos Obturadores à Base de Silicato de Cálcio.....	13
2	PROPOSIÇÃO.....	16
2.1	Proposição Geral.....	16
2.2	Proposição Específica.....	16
3	PUBLICAÇÕES	17
3.1	Publicação 1.....	17
3.2	Publicação 2.....	34
3	DISCUSSÃO.....	57
4	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA CORRESPONDENTE ÀS PUBLICAÇÕES 1 E 2.....	69
	APÊNDICE B – METODOLOGIA DETALHADA CORRESPONDENTE À PUBLICAÇÃO 2.....	78

1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende do preparo biomecânico e da obturação tridimensional do sistema de canais radiculares (SCR)^{1,2}. A terapia endodôntica visa limpeza, modelagem e desinfecção do SCR, além da obtenção de selamento adequado³. Tradicionalmente a obturação consiste na associação da gutta-percha à um cimento endodôntico, visando o preenchimento dos espaços entre a gutta-percha e paredes do canal radicular⁴ e eliminação dos espaços vazios que podem permitir a reinfecção⁵. Ainda, o cimento endodôntico pode auxiliar no controle da infecção residual, por meio de atividade antimicrobiana⁶.

Os cimentos endodônticos são classificados de acordo com os seus componentes principais, proporcionando a classificação em cimentos de óxido de zinco e eugenol, cimentos à base de hidróxido de cálcio, resinas, ionômero de vidro, silicone e os biocerâmicos, com composição à base de silicato de cálcio^{1,2,7,8}.

Micro-organismos no sistema de canais radiculares podem sobreviver após o preparo biomecânico⁹ matendo a infecção após o tratamento endodôntico¹⁰⁻¹². Cimentos endodônticos podem favorecer o controle da infecção residual, por meio do seu pH alcalino^{6,13,14} e atividade antimicrobiana¹⁵.

Enterococcus faecalis e *Candida albicans* são micro-organismos persistentes nas infecções residuais devido à sua capacidade de penetração nos túbulos dentinários mantendo o processo infeccioso endodôntico^{11,16-18}. *C. albicans* é a espécie fúngica mais comumente encontrada em lesões endodônticas primárias¹⁹ e *E. faecalis*, é a espécie bacteriana mais usada na avaliação da atividade antibacteriana dos cimentos obturadores por estar presente nas lesões periapicais resistentes¹¹.

A biocompatibilidade dos diferentes cimentos endodônticos varia de acordo com a composição, podendo influenciar o sucesso do tratamento^{4,20}, e o processo de reparo da região periapical²¹⁻²⁵. Materiais tóxicos afetam o metabolismo e processo de reparo^{26,27}. Testes de citotoxicidade são realizados para avaliação inicial da biocompatibilidade dos materiais^{23,28}. Testes in vitro, tais como o ensaio de metil tretazólio-MTT e vermelho neutro (Neutral Red-NR) são comumente utilizados na avaliação da citotoxicidade dos cimentos endodônticos devido a sua simplicidade, acurácia e reprodutibilidade²⁸⁻³⁰. Além dos estudos de citotoxicidade, o estudo da bioatividade celular por meio da avaliação da atividade da fosfatase alcalina-ALP e coloração com vermelho de alizarina (Alizarin Red Staining-ARS), permite avaliar o potencial de induzir formação de tecido mineralizado³⁰. A linhagem de

osteoblastos humanos Saos-2 é comumente utilizada em testes *in vitro* de citotoxicidade e bioatividade celular³⁰⁻³². A citocompatibilidade pode ser avaliada com células fibroblásticas de camundongos da linhagem L929, células pulpares de ratos RPC-C2A, osteoblastos e células dérmicas e do ligamento periodontal humano^{23,29,33,34}.

AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) é um cimento endodôntico à base de resina epóxica, utilizado como padrão-ouro para comparações com outros cimentos devido as suas propriedades físico-químicas adequadas^{1,7,35-39}. Com relação ao tempo de presa, radiopacidade, escoamento, alteração dimensional, solubilidade e espessura de película, AH Plus (AHP) está de acordo com as normas ISO 6876 e ANSI/ADA 57^{6,37,38,40,41}. Estudos em cultura de células de fibroblastos humanos, AHP não mostrou efeito citotóxico, sendo considerado biocompatível^{4,42,43}.

1.1 Cimentos Obturadores à Base de Silicone e Guta-percha

GuttaFlow (Coltene Whaledent, GmbH + Co KG, Langenau, Suíça) é um sistema de obturação de canais radiculares associando silicone e gutta-percha na forma de pó, com tamanho de partícula inferior a 30 µm. Os dois componentes são automaticamente misturados numa proporção de 4:1²⁰. O cimento GuttaFlow convencional e sua formulação anterior RoekoSeal mostraram biocompatibilidade aceitável^{20,44,45} e toxicidade baixa quando comparado com outros cimentos, tanto em estudos *in vitro* e *in vivo*⁴⁶. GuttaFlow não apresentou citotoxicidade quando em contato com cultura celular de fibroblastos gengivais humanos, não demonstrou resposta citotóxica, sendo similar ao AHP⁴.

GuttaFlow e GuttaFlow 2 são cimentos à base de silicone que diferem basicamente na forma de partícula de prata utilizada como componente antibacteriano, nanopartícula e micropartícula, respectivamente²⁰. GuttaFlow 2 contém componentes semelhantes, mas em proporções alteradas⁴⁶, não especificadas pelo fabricante. GuttaFlow 2 demonstra biocompatibilidade em cultura primária de fibroblastos gengivais humanos por meio do ensaio CCK-8²⁰. Apesar de GuttaFlow 2 ter sido modificado com a adição de micropartículas de prata para melhorar sua atividade antimicrobiana, este cimento não mostrou efeito sobre *E. faecalis*^{47,48}.

Recentemente, o mesmo fabricante lançou um novo cimento bioativo, GuttaFlow bioseal (GFB). Este novo material é composto de gutta-percha em pó, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zircônio e vidro cerâmico bioativo. Este último componente

visa proporcionar bioatividade ao material. GFB é apresentado na forma de seringa dupla e pontas misturadoras que permitem a manipulação do cimento na proporção de 1:1.

Dentre os poucos estudos na literatura sobre o GFB, o cimento apresenta citocompatibilidade quando em contato com fibroblastos humanos em comparação aos cimentos GuttaFlow 2, MTA Fillapex e AH Plus²⁹ e apresenta também adequadas propriedades físico-químicas como radiopacidade, escoamento, solubilidade e estabilidade volumétrica⁴⁹. No entanto, há pouca informação sobre as propriedades biológicas, físico-químicas e antimicrobianas deste novo cimento. De esta maneira, estudos sobre o GFB são necessários para possibilitar a indicação clínica deste material.

1.2 Novos Cimentos Obturadores à Base de Silicato de Cálcio

Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um biomaterial com várias indicações na Endodontia, devido as suas adequadas propriedades físico-químicas (radiopacidade, pH e tempo de presa)⁵⁰ e biológicas (atividade antibacteriana e capacidade de reparo dos tecidos periapicais)^{51,52}. MTA é composto basicamente por silicato dicálcio e tricálcico, aluminato tricálcio e aluminoferrita tetracálcio⁵³. Cimentos à base de silicato de cálcio apresentam biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas. MTA é indicado como cimento retrobturador e para capeamento pulpar, pulpotomia, barreira apical em dentes com ápices abertos e selamento de perfurações radiculares⁵⁴. Suas principais limitações são tempo de presa longo e difícil manuseio⁵⁵.

MTA Fillapex (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brasil) é um cimento endodôntico que contém silicato de cálcio⁷. A primeira formulação composta por resina salicilato, resina natural, óxido de bismuto, nanopartículas de sílica e MTA^{56,57} foi desenvolvida para associar propriedades do MTA e propriedades físico-químicas de um cimento endodôntico. Biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, capacidade de selamento^{1,58} e escoamento adequado foram descritas para o material^{33,55,59,60}. MTA Fillapex (MTAF) foi comparado com outros cimentos, tais como AHP, mostrando valores altos de escoamento e baixa radiopacidade, porém de acordo com as recomendações ADA, ISO e ANSI^{61,62}. MTAF mostrou pouca atividade antibacteriana sobre *E. faecalis*^{43,48}. MTAF mostrou atividade antibacteriana sobre *E. faecalis* em teste de contato direto⁶³.

Várias propriedades do MTAF, tais como biocompatibilidade^{64,65}, bioatividade⁶⁶, citotoxicidade^{23,67-72}, solubilidade^{59,62,73}, capacidade de selamento⁴¹ e atividade

antibacteriana^{48,63,74,75} foram investigados, porém a sua formulação foi alterada. O agente radiopacificador óxido de bismuto foi substituído pelo tungstato de cálcio. As propriedades descritas na maioria dos estudos correspondem à formulação anterior com presença do óxido de bismuto. A nova formulação do MTAF apresenta pH alcalino, tempo de presa longo e solubilidade elevada quando comparado ao AHP, e demonstrou potencial bioativo por análise em microscopia eletrônica de varredura - MEV⁷⁶. Porém, novos estudos são importantes para avaliação das propriedades do cimento MTAF em sua nova formulação.

TotalFill BC (TF) e EndoSequence BC são cimentos endodônticos biocerâmicos semelhantes pré-misturados compostos de óxido de zircônio, silicato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, agente de preenchimento e agentes espessantes⁷⁷. Biocerâmicos são o resultado da combinação de silicato de cálcio e fosfato de cálcio que são aplicáveis para utilização biomédica e dental⁷⁸; são materiais biocompatíveis, não tóxicos, e quimicamente estáveis no ambiente biológico, e são hidrofílicos, que utilizam a umidade dos túbulos dentinários para iniciar e completar a reação de presa^{41,78,79}. Os cimentos biocerâmicos são considerados biocompatíveis e apresentam atividade antimicrobiana frente a alguns micro-organismos, tais como *E. faecalis*^{6,14,34,75,80}.

A citotoxicidade em cultura celular do cimento EndoSequence BC foi avaliada em comparação aos cimentos MTAF e AH Plus. Fibroblastos gengivais humanos foram incubados durante 3 dias com os eluídos dos materiais frescos e também foi avaliada a adesão das células na superfície dos cimentos após presa. Os autores concluíram que EndoSequence BC, recém manipulado e após presa, apresentou maior biocompatibilidade quando comparado ao MTAF. AHP foi citotóxico quando fresco, mas permitiu a adesão e crescimento de células sobre a superfície do material após presa⁶⁹. Estudo recente também observou que EndoSequence BC apresentou maior biocompatibilidade quando comparado ao MTAF⁷¹. Por outro lado, em outro estudo, ambos cimentos tiveram efeito citotóxico em fibroblastos de ratos⁷⁰. EndoSequence BC tem a habilidade de formar hidroxiapatita através do pó de silicato de cálcio, que numa reação de hidratação produz gel de silicato de cálcio hidratado e hidróxido de cálcio (HC), que por sua vez reage com íons fosfato e precipita hidroxiapatita e água^{70,81}. Endosequence BC apresenta baixa citotoxicidade^{14,80} e atividade antibacteriana sobre *E. faecalis*⁸². São poucos os estudos que avaliaram esse cimento com a denominação de TotalFill BC (TF), mostrando maior biocompatibilidade quando comparado ao cimento AHP³³, sendo citotóxico nas primeiras 24 horas em contato com fibroblastos humanos⁴³.

Recentemente, outro cimento à base de silicato de cálcio foi desenvolvido, o NeoMTA Plus (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL, USA). Este material se apresenta como pó e gel à

base de água e sua formulação é semelhante ao do MTA^{83,84}. Segundo o fabricante, o pó contém silicato tricálcio, silicato dicálcio, aluminato tricálcio, sulfato de cálcio, gesso e óxido de tântalo como radiopacificador, e o gel contém agentes espessantes e polímeros solúveis em água. NeoMTA Plus (NMTAP) é indicado para obturação, pulpotomia, apacificação, reparo de perfurações e capeamento pulpar. Estes novos materiais à base de silicato de cálcio, tais como Endosequence BC, TF e NMTAP apresentam melhores características de manipulação, estabilidade de cor e propriedades físico-químicas comparáveis ao MTA. Ainda, estes cimentos têm mostrado capacidade de liberar íons cálcio e fosfato essenciais para a deposição de hidroxiapatita⁸⁵.

NMTAP como material reparador demonstra ser biocompatível, e induz significativa produção de nódulos de mineralização quando comparado ao MTA Angelus branco³⁰. Este material apresenta também elevada capacidade de liberar íons cálcio e hidroxila que mantém a formação de fosfato de cálcio⁸⁶, importante para a deposição de hidroxiapatita⁸⁵. Além disso, como cimento obturador, NMTAP mostrou adequadas propriedades físico-químicas de radiopacidade, pH, tempo de presa, porosidade e solubilidade similar ao MTA⁸⁶.

Algumas propriedades dos cimentos obturadores avaliados não foram relatadas anteriormente, como a atividade antimicrobiana dos cimentos GFB e NMTAP, o potencial bioativo dos cimentos TF e NMTAP e alteração volumétrica do cimento NMTAP. Desta maneira, o presente estudo visa avaliar essas propriedades, bem como as propriedades físico-químicas de tempo de presa, pH, radiopacidade, escoamento e solubilidade; assim como alteração volumétrica, citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e efeito antimicrobiano de novos cimentos (GFB, TF, NMTAP e MTA na sua nova formulação) comparados ao cimento AHP. O estudo das propriedades dos cimentos obturadores de canais radiculares é importante para indicação clínica, contribuindo com o sucesso do tratamento endodôntico.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que os cimentos GFB, TF e AHP apresentam citocompatibilidade. TF apresenta maior bioatividade celular, potencial bioativo e efetividade contra *E. faecalis* e *C. albicans*, enquanto GFB mostrou maior atividade antibiofilme sobre *C. albicans*. NMTAP e AHP apresentam adequadas propriedades físico-químicas de tempo de presa, solubilidade e alteração volumétrica. Porém, NMTAP mostrou menor escoamento e radiopacidade, segundo as normas ISO 6876. A nova formulação do MTAF demonstra perda volumétrica, alta solubilidade e também valores inferiores de radiopacidade conforme recomendações da norma ISO 6876. MTAF apresentou maior citotoxicidade e baixa bioatividade celular quando comparado aos outros cimentos avaliados, porém foi eficaz sobre células planctônicas de *C. albicans*. NMTAP apresentou citocompatibilidade, bioatividade celular, potencial bioativo e maior atividade antibiofilme, quando comparado aos outros materiais. Cimento à base de silicone (GFB), e cimentos à base de silicato de cálcio (TF e NMTAP) apresentam biocompatibilidade, bioatividade, potencial bioativo e atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS*

1. Akcay M, Arslan H, Durmus N, Mese M, Capar ID. Dentinal tubule penetration of AH Plus, iRoot SP, MTA fillapex, and guttaflow bioseal root canal sealers after different final irrigation procedures: a confocal microscopic study. *Lasers Surg Med.* 2016; 48(1): 70-6.
2. Caron G, Nham K, Bronnec F, Machtou P. Effectiveness of different final irrigant activation protocols on smear layer removal in curved canals. *J Endod.* 2010; 36(8): 1361-6.
3. Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007; 40(5): 329-37.
4. Konjhodzic-Prcic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A. In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Med Arch.* 2015; 69(1): 24-7.
5. Thom DC, Davies JE, Santerre JP, Friedman S. The hemolytic and cytotoxic properties of a zeolite-containing root filling material in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(1): 101-8.
6. Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J Endod.* 2012; 38(6): 842-5.
7. Borges AH, Orcati Dorileo MC, Dalla Villa R, Borba AM, Semenoff TA, Guedes OA, et al. Physicochemical properties and surfaces morphologies evaluation of MTA FillApex and AH plus. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014: 589732.
8. Capar ID, Aydinbelge HA. Effectiveness of various irrigation activation protocols and the self-adjusting file system on smear layer and debris removal. *Scanning.* 2014; 36(6): 640-7.
9. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983; 55(3): 307-12.
10. Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J.* 1994; 27(4): 218-22.
11. AlShwaimi E, Bogari D, Ajaj R, Al-Shahrani S, Almas K, Majeed A. In vitro antimicrobial effectiveness of root canal sealers against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *J Endod.* 2016; 42(11): 1588-97.
12. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009; 35(7): 1051-5.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

13. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2004; 30(4): 218-9.
14. Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 657-61.
15. Siqueira JF, Jr., Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod.* 2000; 26(5): 274-7.
16. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32(2): 93-8.
17. O'Donnell LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, et al. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15(7): 1-14.
18. Tonea A, Badea M, Oana L, Sava S, Vodnar D. Antibacterial and antifungal activity of endodontic intracanal medications. *Clujul Med.* 2017; 90(3): 344-7.
19. Jafari F, Jafari S, Samadi Kafil H, Momeni T, Jamloo H. Antifungal activity of two root canal sealers against different strains of *Candida*. *Iran Endod J.* 2017; 12(1): 98-102.
20. Mandal P, Zhao J, Sah SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2014; 40(8): 1156-9.
21. Bueno CR, Valentim D, Marques VA, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Jacinto RC, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1):
22. Christian Gomes Moura C, Cristina Cunha T, Oliveira Crema V, Dechichi P, Carlos Gabrielli Biffi J. A study on biocompatibility of three endodontic sealers: intensity and duration of tissue irritation. *Iran Endod J.* 2014; 9(2): 137-43.
23. Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, et al. Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int Endod J.* 2017; 50(9): 875-84.
24. Farhad AR, Hasheminia S, Razavi S, Feizi M. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rats. *J Oral Sci.* 2011; 53(1): 15-21.
25. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba K, Yoshiba N, Okiji T. Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44(7): 669-75.
26. Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J.* 2003; 36(10): 660-9.
27. Victoria-Escandell A, Ibanez-Cabellos JS, de Cutanda SB, Berenguer-Pascual E, Beltran-Garcia J, Garcia-Lopez E, et al. Cellular responses in human dental pulp stem cells treated with three endodontic materials. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 8920356.

28. Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013; 46(3): 195-7.
29. Collado-Gonzalez M, Tomas-Catala CJ, Onate-Sanchez RE, Moraleda JM, Rodriguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of GuttaFlow bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on human periodontal ligament stem cells. *J Endod.* 2017; 43(5): 816-22.
30. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J.* 2017; 50 (Suppl 2): e31-e9.
31. Gomes-Cornelio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2017; 50(1): 39-47.
32. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. *J Endod.* 2008; 34(1): 39-44.
33. Rodriguez-Lozano FJ, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J.* 2017; 50(1): 67-76.
34. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *J Endod.* 2011; 37(3): 372-5.
35. Garrido AD, Lia RC, Franca SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *Int Endod J.* 2010; 43(4): 283-91.
36. Marciano MA, Guimaraes BM, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago BC, Garcia RB, et al. Physical properties and interfacial adaptation of three epoxy resin-based sealers. *J Endod.* 2011; 37(10): 1417-21.
37. Marin-Bauza GA, Rached-Junior FJ, Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD, Miranda CE, Silva-Sousa YT. Physicochemical properties of methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod.* 2010; 36(9): 1531-6.
38. Prullage RK, Urban K, Schafer E, Dammaschke T. Material properties of a tricalcium silicate-containing, a mineral trioxide aggregate-containing, and an epoxy resin-based root canal sealer. *J Endod.* 2016; 42(12): 1784-8.
39. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013; 39(2): 274-7.
40. Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J.* 2006; 39(6): 464-71.

41. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod.* 2013; 39(10): 1281-6.
42. Willershausen I, Callaway A, Briseno B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med.* 2011; 7: 15.
43. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(4): e574-e8.
44. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod.* 2006; 32(10): 989-92.
45. Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod.* 2005; 31(4): 307-9.
46. Accardo C, Himel VT, Lallier TE. A novel GuttaFlow sealer supports cell survival and attachment. *J Endod.* 2014; 40(2): 231-4.
47. Wainstein M, Morgental RD, Waltrick SB, Oliveira SD, Vier-Pelisser FV, Figueiredo JA, et al. In vitro antibacterial activity of a silicone-based endodontic sealer and two conventional sealers. *Braz Oral Res.* 2016; 30(e18): 1-5.
48. Shakya VK, Gupta P, Tikku AP, Pathak AK, Chandra A, Yadav RK, et al. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy and flow characteristics for AH Plus, MTA Fillapex, CRCS and Gutta Flow 2 root canal sealer. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(8): ZC104-8.
49. Tanomaru Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, de Almeida M, Navarro LG, Steier L, et al. Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive glass and calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017; 43(12): 2097-101.
50. Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J.* 2010; 43(3): 231-40.
51. Prestegaard H, Portenier I, Orstavik D, Kayaoglu G, Haapasalo M, Endal U. Antibacterial activity of various root canal sealers and root-end filling materials in dentin blocks infected ex vivo with *Enterococcus faecalis*. *Acta Odontol Scand.* 2014; 72(8): 970-6.
52. Tawil PZ, Trope M, Curran AE, Caplan DJ, Kirakozova A, Duggan DJ, et al. Periapical microsurgery: an in vivo evaluation of endodontic root-end filling materials. *J Endod.* 2009; 35(3): 357-62.
53. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.* 2008; 11(4): 141-3.
54. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010; 36(1): 16-27.
55. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015; 31(4): 351-70.

56. Moinzadeh AT, Zerbst W, Boutsoukios C, Shemesh H, Zaslansky P. Porosity distribution in root canals filled with gutta percha and calcium silicate cement. *Dent Mater.* 2015; 31(9): 1100-8.
57. Viapiana R, Moinzadeh AT, Camilleri L, Wesselink PR, Tanomaru Filho M, Camilleri J. Porosity and sealing ability of root fillings with gutta-percha and BioRoot RCS or AH Plus sealers. Evaluation by three ex vivo methods. *Int Endod J.* 2016; 49(8): 774-82.
58. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010; 36(2): 190-202.
59. Vitti RP, Prati C, Silva EJ, Sinhoreti MA, Zanchi CH, de Souza e Silva MG, et al. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *J Endod.* 2013; 39(7): 915-8.
60. Vitti RP, Prati C, Sinhoreti MA, Zanchi CH, Souza ESMG, Ogliari FA, et al. Chemical-physical properties of experimental root canal sealers based on butyl ethylene glycol disalicylate and MTA. *Dent Mater.* 2013; 29(12): 1287-94.
61. Tanomaru-Filho M, Bosso R, Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and flow of different endodontic sealers. *Acta Odontol Latinoam.* 2013; 26(2): 121-5.
62. Lee JK, Kwak SW, Ha JH, Lee W, Kim HC. Physicochemical properties of epoxy resin-based and bioceramic-based root canal sealers. *Bioinorg Chem Appl.* 2017; 2017: 2582849.
63. Hasheminia M, Razavian H, Mosleh H, Shakerian B. In vitro evaluation of the antibacterial activity of five sealers used in root canal therapy. *Dent Res J (Isfahan).* 2017; 14(1): 62-7.
64. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Filho JA, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX(R). *Dent Traumatol.* 2012; 28(6): 452-6.
65. Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012; 38(9): 1233-8.
66. Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimaraes FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod.* 2012; 38(7): 971-6.
67. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012; 45(1): 12-8.
68. Braga JM, Oliveira RR, de Castro Martins R, Vieira LQ, Sobrinho AP. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. *Dent Traumatol.* 2015; 31(5): 390-5.
69. Zhou HM, Du TF, Shen Y, Wang ZJ, Zheng YF, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod.* 2015; 41(1): 56-61.
70. Baraba A, Pezelj-Ribaric S, Roguljic M, Miletic I. Cytotoxicity of two bioactive root canal sealers. *Acta Stomatol Croat.* 2016; 50(1): 8-13.

71. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, Belladonna FG, De-Deus GA, Lima IC, et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J.* 2017; 50(4): 407-14.
72. Mestieri LB, Gomes-Cornelio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(5): 467-71.
73. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Junior FA, De-Deus G, Miranda CE, et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J.* 2012; 45(5): 419-28.
74. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44(12): 1128-33.
75. Poggio C, Trovati F, Ceci M, Colombo M, Pietrocola G. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(6): e743-e8.
76. Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J.* 2017; 50 (Suppl 2): e120-e36.
77. Hess D, Solomon E, Spears R, He J. Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. *J Endod.* 2011; 37(11): 1547-9.
78. Koch K, Brave D. Bioceramic technology – the game changer in endodontics. *Endod Pract.* 2009 [Internet]; [Acesso 2017 dez 10]. Disponível em: https://s3.amazonaws.com/realworlddentistry-production/attachments/assets/000/000/038/original/2009-04_EP_Bioceramics_the_game_changer_in_endodontics.pdf?1385400678.
79. Ghabraei S, Bolhari B, Yaghoobnejad F, Meraji N. Effect of intra-canal calcium hydroxide remnants on the push-out bond strength of two endodontic sealers. *Iran Endod J.* 2017; 12(2): 168-72.
80. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod.* 2011; 37(5): 673-7.
81. Koch KA, Brave DG, Nasseh AA. Bioceramic technology: closing the endo-restorative circle, Part I. *Dent Today.* 2010; 29(2): 100-5.
82. Singh G, Gupta I, Elshamy FM, Boreak N, Homeida HE. In vitro comparison of antibacterial properties of bioceramic-based sealer, resin-based sealer and zinc oxide eugenol based sealer and two mineral trioxide aggregates. *Eur J Dent.* 2016; 10(3): 366-9.
83. Camilleri J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod.* 2015; 41(7): 1139-45.
84. McMichael GE, Primus CM, Opperman LA. Dentinal tubule penetration of tricalcium silicate sealers. *J Endod.* 2016; 42(4): 632-6.

85. Tran D, He J, Glickman GN, Woodmansey KF. Comparative Analysis of calcium silicate-based root filling materials using an open apex model. *J Endod.* 2016; 42(4): 654-8.
86. Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J.* 2017; 50 (Suppl 2): e83-e94.
87. Vivian RR, Zapata RO, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110(2): 250-6.
88. Nielsen RB, Alyassin AM, Peters DD, Carnes DL, Lancaster J. Microcomputed tomography: an advanced system for detailed endodontic research. *J Endod.* 1995; 21(11): 561-8.
89. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM, et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2014; 47(2): 120-6.
90. Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli J, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *J Appl Oral Sci* 2017; 25(4): 374-80.
91. Saygili G, Saygili S, Tuglu I, Davut Capar I. In vitro cytotoxicity of GuttaFlow bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iran Endod J.* 2017; 12(3): 354-9.
92. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dent Mater.* 2016; 32(5): e113-26.
93. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* 1991; 14(1): 27-40.
94. Barros J, Costa-Rodrigues J, Lopes MA, Pina-Vaz I, Fernandes MH. Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH plus and pulp canal sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod.* 2014; 40(8): 1149-55.
95. Jafari F, Aghazadeh M, Jafari S, Khaki F, Kabiri F. In vitro cytotoxicity comparison of MTA Fillapex, AH-26 and Apatite root canal sealer at different setting times. *Iran Endod J.* 2017; 12(2): 162-7.
96. Silva EJ, Carvalho NK, Ronconi CT, De-Deus G, Zuolo ML, Zaia AA. Cytotoxicity profile of endodontic sealers provided by 3D cell culture experimental model. *Braz Dent J.* 2016; 27(6): 652-6.
97. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol.* 1996; 12(4): 179-84.
98. Gong SQ, Huang ZB, Shi W, Ma B, Tay FR, Zhou B. In vitro evaluation of antibacterial effect of AH Plus incorporated with quaternary ammonium epoxy silicate against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2014; 40(10): 1611-5.

99. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318-22.
100. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000; 40(2): 175-9.
101. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*. 2013; 25(1): 31-42.
102. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2014; 40(4): 505-8.
103. Kapralos V, Koutroulis A, Orstavik D, Sunde PT, Rukke HV. Antibacterial activity of endodontic sealers against planktonic bacteria and bacteria in biofilms. *J Endod*. 2018; 44(1): 149-54.