



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



**Gabriela Mariana Castro Núñez**

**Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais  
em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico**

**Araraquara**

**2020**



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



**Gabriela Mariana Castro Núñez**

**Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais  
em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista  
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara  
para obtenção do Título de Doutor em Odontologia,  
na área de Endodontia

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

**Araraquara**

**2020**

Castro Núñez, Gabriela Mariana

Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico / Gabriela Mariana Castro Núñez-- Araraquara: [s.n.], 2020

97 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Materiais biocompatíveis 2. Propriedades físicas e Químicas 3. Óleos voláteis 4. Biofilmes 5. Candida albicans 6. Enterococcus faecalis 7. Endodontia

I. Título

**Gabriela Mariana Castro Núñez**

**Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais  
em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico**

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia**

Presidente e orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Leal Zandim-Barcelos

3º Examinador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Madalena Palomari Spolidorio

4º Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan

5º Examinador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

Araraquara, 23 de março de 2020

## **DADOS CURRICULARES**

### **Gabriela Mariana Castro Núñez**

NASCIMENTO	04/12/1989 – Tacna – Tacna – Perú
FILIAÇÃO	José Santos Castro Pavez Jesús Esperanza Núñez de Castro
2008-2012	Graduação em Odontologia Universidad Católica de Santa María - UCSM Arequipa – Peru
2014-2016	Especialização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014-2016	Mestrado em Odontologia – Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2018	Mobilidade de Doutorado Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (UCH)
2016-2020	Doutorado em Odontologia – Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

### **A Deus,**

Por minha vida cheia de amor, pela família, amigos e boas pessoas que colocou no meu caminho para me guiar e acompanhar. Por ter feito que o universo conspire a fim de poder realizar meus sonhos e por me colocar no lugar e momento certos; pela sua presença e fortaleza constante para nunca desistir e dar sempre o melhor de mim.

### **Aos meus pais José e Esperanza,**

Meus primeiros e melhores mestres, guias e exemplos de vida, de pessoa e de profissional, por todos os ensinamentos, teóricos (papi) e práticos (mami); por ter dedicado suas vidas a encher minha vida e a dos meus irmãos de amor e coisas boas, por ter criado 4 pessoas do bem para este mundo, hoje em dia tão difícil. Pela oportunidade e apoio incondicional para conseguir meus objetivos, tanto moral como económico, e porque apesar da distância nunca senti a sua ausência; sem vocês nada disto poderia ser realidade. Por ter-me ensinado que se há que fazer alguma coisa devemos fazê-la o melhor possível, se não é melhor nem fazê-la. E principalmente que “vimos a este mundo para servir e não para ser servidos”. No tengo como agradecerles, ¡los amo!

### **A Wilo,**

Meu amor, amigo, namorado e companheiro mais próximo neste caminho, por teu apoio incondicional, por tua compreensão e palavras para me acalmar e continuar nos momentos mais difíceis, por tua boa disposição sempre para me ajudar, por tua paciência, alegria e companhia; porque foi por você e sua perseverança que viemos em busca de nossos objetivos. Só me resta te agradecer por sempre estar em busca de minha tranquilidade, felicidade e bem-estar, por tua preocupação e dedicação para cuidar de mim. Te amo gordito!

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora Professora Dr.a Juline Maria Guerreiro-Tanomaru, e ao Professor Dr. Mario Tanomaru-Filho, por esses anos de trabalho juntos, pela confiança depositada em mim, pelo acolhimento, paciência e convência harmoniosa e pelo conhecimento compartilhado em estes anos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araraquara, na figura da diretora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Maria Sgavioli Massucato, e do Vice Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, pela infraestrutura necessária para a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, representado pelo Prof. Dr. Joni Cirelli, pela oportunidade de realizar meu Doutorado.

A todos os Professores da FOAr, em especial aos do programa da Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração: Endodontia, aos Professores Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisele Farias, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, pelos ensinamentos compartilhados e pela boa disposição para ajudar-me e esclarecer dúvidas. Este tempo foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha banca de qualificação de Mestrado, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Leal Zandim-Barcelos e Dr.<sup>a</sup> Elissandra Rodrigues, pela análise criteriosa e importantes sugestões atribuídas a este trabalho.

À CNPq, pelo apoio para a realização deste trabalho. Aos funcionários da Seção da Pós-Graduação, Alexandre e Cristiano, que foram muito prestativos sempre.

Ao Consejo Nacional de Ciencia , Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec) a través de sua unidade ejecutora el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt), pelo apoio para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários da FOAr, especialmente a Creusa, pelo carinho e disposição para nos apoiar no necessário, por sempre ser prestativa e ajudar a resolver quaisquer problemas e estar sempre com um sorriso para me atender.

Aos Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Prof. Dr. Edson Alves de Campos, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga e Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi, pela grande amizade que me ofereceram, a confiança e ensinamentos, pelas múltiplas conversas de diversos temas com alguns em espanhol, pelos ensinamentos profissionais e de vida que compartilharam comigo.

Aos colegas da Pós-Endo da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, pelo convívio diário, sorrisos nos corredores e conversas na copa e inspiração por cada uma das suas histórias de vida. A Elisandra Rodrigues, pelo ensinamento e ajuda nos experimentos de célula. A Gisselle Moraima Chávez Andrade, por estar sempre prestes a me ajudar no que precisei, na pesquisa, ensinando desde o começo o funcionamento das coisas e pela boa convivência, por todo o companheirismo especialmente no laboratório de micro e com os experimentos, e por sua ajuda e tempo para corrigir a escrita dos artigos.

A minhas amigas sobreviventes do Mestrado, Kennia, Lauriê e Fernanda, pela convivência e amizade, os momentos de estresse, de alegria, de lazer e principalmente a companhia nos congressos. A Kennia por nossa amizade mais próxima nos atendimentos, nos finais de semana e nas visitas a Jales. A Fer por todo o suporte sempre nos experimentos, sua amizade sincera, e especialmente todo o apoio principalmente no final, ao compartilhar seu conhecimento na escrita dos artigos, pelo seu tempo e carinho para corrigir minhas coisas, e aos seus pais e família pelo apoio e carinho com que sempre nos receberam na sua casa.

Realmente cada um de vocês marcou minha vida e estarão no meu coração sempre!

E a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desta história e contribuíram ao meu desenvolvimento nestes quatro anos de doutorado e seis anos no Brasil.

“A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

Castro Núñez GM. Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## RESUMO

Os cimentos reparadores endodônticos à base de silicato de cálcio apresentam biocompatibilidade e bioatividade. Porém, sua ação antimicrobiana é limitada. O acréscimo de óleos essenciais pode favorecer as propriedades antimicrobianas de materiais. Os óleos essenciais são substâncias de origem vegetal com propriedades antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antitoxigênica, antiparasitária e inseticida. Este estudo teve como objetivo avaliar a associação de diferentes óleos essenciais nas propriedades físico-químicas, citocompatibilidade, potencial bioativo e atividade antibiofilme dos cimentos reparadores à base de silicato de cálcio, MTA Repair HP (MTA HP) e Biodentine (BIO). **Publicação 1:** avaliou a associação de 1,5% de Farnesol (FAR). **Publicação 2:** analisou o acréscimo de 1% de *Thyme Essential Oil* (TEO). **Publicação 3:** associou 1% de *lemongrass oil* (LEO). As propriedades físico-químicas de tempo de presa, solubilidade após 7 dias de imersão em água destilada e pH em 1, 3, 7, 14 e 21 dias foram avaliadas. A citocompatibilidade foi avaliada por meio dos testes de methyltetrazolium (MTT) e Vermelho Neutro (VN) após exposição das células Saos-2 às diferentes diluições dos eluídos dos materiais por 24h. A bioatividade foi avaliada pela atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Nódulos de mineralização foram também quantificados após 21 dias pela coloração com vermelho de Alizarina (ARS). A capacidade de inibição de Metaloproteinase de Matriz (MMP) 2 e 9 foi mensurada por fluorescência. A capacidade antibiofilme foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (TCDM) sobre biofilme mono- e dual-espécies de *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans*, formados em dentina bovina. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey ou Bonferroni, com nível de significância de 5%. Todos os materiais tiveram tempo de presa semelhante e mostraram capacidade de alcalinização do meio em todos os períodos avaliados. BIO mostrou perda de massa puro ou associado ao FAR, TEO e LEO, enquanto que MTAHP ganhou massa com ou sem as associações. Todos os materiais mostraram citocompatibilidade e aumento na atividade de ALP nos períodos avaliados. Os cimentos avaliados foram capazes de induzir a produção de nódulos de mineralização. Os materiais não mostraram atividade anti-MMP-9, no entanto, mostraram inibição de MMP-2. A adição de FAR, TEO e LEO aumentou a capacidade antibiofilme mono e dual-espécie sobre *E. faecalis* e/ou *C. albicans* dos materiais. Conclui-se que a adição de óleos essenciais aos cimentos MTAHP e BIO melhora a atividade antibiofilme, sem alterar significativamente suas propriedades físico-químicas, mantendo a citocompatibilidade e potencial bioativo dos cimentos, e mostrando potencial para maiores estudos para uma futura aplicação clínica.

**Palavras chave:** Materiais Biocompatíveis. Propriedades Físicas e Químicas. Óleos Voláteis. Biofilmes. *Candida albicans*. *Enterococcus faecalis*. Endodontia.

Castro Núñez GM. Antimicrobial potential and biocompatibility of essential oils in association with biomaterials based on tricalcium silicate [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## **ABSTRACT**

Calcium silicate-based endodontic repair cements have biocompatibility and bioactivity. However, its antimicrobial action is limited. The addition of essential oils can favor the antimicrobial properties of materials. Essential oils are substances of plant origin with antimicrobial, antiviral, antifungal, antitoxigenic, antiparasitic and insecticide properties. This study aimed to evaluate the association of different essential oils in the physico-chemical properties, cytocompatibility, bioactive potential and antibiofilm activity of calcium silicate-based cements, MTA Repair HP (MTAHP) and Biodentine (BIO). publication 1: evaluated the association of 1.5% of Farnesol (FAR). Publication 2: analyzed the increase of 1% of Thyme Essential Oil (TEO). Publication 3: associated 1% lemongrass oil (LEO). The physicochemical properties of setting time, solubility after 7 days of immersion in distilled water and pH at 1, 3, 7, 14 and 21 days were evaluated. Cytocompatibility was assessed using methyltetrazolium (MTT) and Neutral Red (NR) tests after exposure of Saos-2 cells to different dilutions of the extracts of the materials for 24h. Bioactivity was assessed by the enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP) in the periods of 1, 3 and 7 days. Mineralization nodules were also quantified after 21 days by staining with Alizarin red (ARS). The inhibition capacity of Matrix Metalloproteinase (MMP) 2 and 9 was measured by fluorescence. The antibiofilm activity was assessed by the modified direct contact test (MDCT) on biofilm mono- and dual-species of *Enterococcus faecalis* and/or *Candida albicans*, formed in bovine dentin. The data were submitted to Shapiro-Wilk, ANOVA and Tukey or Bonferroni statistical tests, with a significance level of 5%. All evaluated materials had a similar setting time and showed the ability to alkalize the medium in all periods. BIO showed mass loss when pure or associated with FAR, TEO and LEO, while MTAHP gained mass with or without the associations. All materials showed cytocompatibility and increased ALP activity in the evaluated periods. The evaluated cements were able to induce the production of mineralized nodules. The materials did not show anti-MMP-9 activity, however, they showed inhibition of MMP-2. The addition of FAR, TEO and LEO increased the mono and dual-species antibiofilm activity against *E. faecalis* and / or *C. albicans* of the materials. It is concluded that the addition of essential oils to repair cements, MTAHP and BIO, improves the antibiofilm activity, without significantly altering its physical-chemical properties, maintaining the cytocompatibility and bioactive potential of the cements, and showing potential for clinical application.

**Keywords:** Biocompatible Materials. Physical and Chemical Properties. Oils, Volatile. Biofilms. *Candida albicans*. *Enterococcus faecalis*. Endodontics.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3 PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Publicação 1 .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Publicação 2 .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Publicação 3 .....</b>	<b>55</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Biomateriais reparadores estimulam a resposta do tecido pulpar e/ou periodontal<sup>1,2</sup> e devem apresentar propriedades como capacidade de selamento, resistência à penetração bacteriana, biocompatibilidade e bioatividade<sup>1,3</sup>. Cimentos reparadores são indicados para selamento de perfurações radiculares, capeamento pulpar, pulpotomias, apexificação, apicigênese e retrobturações<sup>3</sup>.

Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um cimento à base de silicato de cálcio<sup>4,5</sup> que apresenta bioatividade, capacidade regenerativa e alto potencial para estimular regeneração óssea<sup>6</sup>. Cimentos de silicato de cálcio imersos em soluções à base de fosfato induzem formação de precipitados de apatita<sup>7</sup>. Biomateriais reparadores podem promover diferenciação osteogênica, formação de nódulos de mineralização de células tronco mesenquimais humanas<sup>8</sup>, células da polpa dentária humana<sup>9</sup>, e células humanas do ligamento periodontal<sup>10</sup>.

Óxido de bismuto ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) usado como radiopacificador no MTA promove redução da liberação de íons cálcio, aumento do tempo de presa e solubilidade, diminuição da estabilidade dimensional e da resistência à compressão<sup>11-14</sup>. O colágeno presente na matriz orgânica da dentina, reage com o  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , resultando na alteração da coloração dentária. Desta forma, o uso de radiopacificadores alternativos é indicado para substituir o  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  no MTA<sup>15</sup>. Tungstato de cálcio e óxido de zircônio são radiopacificadores que podem ser utilizados com cimentos à base de silicato de cálcio sem alterar as propriedades físico-químicas como pH, liberação de íons cálcio, tempo de presa e solubilidade<sup>16</sup>.

O MTA foi modificado para desenvolver um novo cimento, lançado com o nome de MTA Repair HP (MTAHP) (Angelus Industria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil). As alterações ocorreram na composição do pó e do líquido a fim de melhorar características de manuseio e inserção. Assim, o radiopacificador Óxido de Bismuto foi substituído por Tungstato de Cálcio. O líquido apresenta além da água destilada, um agente plastificante, que determina o nome do cimento HP – “*High Plasticity*”. As propriedades físico-químicas e biológicas do MTAHP são consideradas adequadas e semelhantes ao MTA (Angelus)<sup>17-19</sup>.

O óxido de zircônio ( $\text{ZrO}_2$ ) tem sido um material de escolha como radiopacificador, por mostrar ser inerte e lixiviado em quantidades mínimas<sup>4,20-23</sup>. A associação do silicato tricálcico com  $\text{ZrO}_2$  libera íons cálcio, formando hidróxido de cálcio quando hidratado com água destilada<sup>20</sup>. A associação de 30% de  $\text{ZrO}_2$  ao cimento Portland proporciona radiopacidade,

resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade semelhantes ao ProRoot MTA<sup>21</sup>. O potencial bioativo do ZrO<sub>2</sub> associado a uma formulação endodôntica de cimento de silicato de cálcio demonstra deposição de cristais de hidroxiapatita<sup>23</sup>. Gomes Cornelio et al.<sup>24</sup> observaram por meio de teste de apoptose/necrose que células após exposição ao Cimento Portland associado ao ZrO<sub>2</sub> não apresentaram alterações morfológicas.

Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fossés, France) é um biomaterial à base de silicato de cálcio com propriedades mecânicas semelhantes à dentina, que apresenta indicações similares ao MTA<sup>25-29</sup>. Biodentine consiste de um pó e um líquido. O pó contém silicato tricálcico e dicálcico (3CaO SiO<sub>2</sub> e 2CaO SiO<sub>2</sub>), carbonato de cálcio e ZrO<sub>2</sub> como radiopacificador. O líquido é constituído por cloreto de cálcio, utilizado como um acelerador de presa e agente redutor de água, em solução aquosa com uma mistura de policarboxilato (agente superplastificante)<sup>26,28</sup>.

É desejável que os materiais reparadores endodônticos apresentem propriedade antimicrobiana. No entanto, cimentos à base de silicato de cálcio apresentam atividade antimicrobiana limitada<sup>30</sup>. A fim de melhorar as propriedades antimicrobianas, Biodentine foi associado a substâncias sintéticas como a clorexidina (CLX) e a doxiciclina. Nikhil et al. observaram que a associação do Biodentine à CLX potencializa suas propriedades antimicrobianas contra *C. albicans* e *E. faecalis*, porém a doxiciclina diminuiu seu potencial<sup>31</sup>. O MTA associado à clorexidina potencializou suas propriedades antibacterianas contra as bactérias normalmente encontradas na cavidade bucal, incluindo *E. faecalis*<sup>32-34</sup>. As associações de MTA a zeólito de prata a 0,2 e 2%, mostraram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *C. Albicans*. No entanto, não foram eficazes contra *P. intermedia* e *A. israelii*<sup>35</sup>. Embora a adição de CLX a MTA melhore a sua atividade antimicrobiana, esta influenciou negativamente em suas propriedades físico-químicas e biológicas, sendo que a adição de 2% de CLX impediu a presa do MTA<sup>36</sup>, a substituição de água destilada por CLX 0.12% para a manipulação do MTA provocou maior resposta inflamatória em subcutâneo de rato em 7, 15, 30, 60 e 90 dias<sup>37</sup>; e MTA com 0.2% de CLX prejudicou a formação da barreira mineralizada quando usada em capeamento pulpar direto em dente de cães<sup>38</sup>.

Na área da saúde, e especificamente na Odontologia, diversas substâncias antimicrobianas sintéticas e naturais são estudadas, com o intuito de reduzir o uso de antibióticos que promovem aumento da resistência bacteriana. Dentre estas substâncias naturais destacam-se os óleos essenciais (OEs) e seus componentes, que são substâncias voláteis que

protegem as plantas de doenças e ataques de insetos<sup>39,40</sup>. Os OEs são estudados por sua eficácia e segurança<sup>41</sup>.

Farnesol (FAR) é um álcool sesquiterpeno hidrofóbico comumente encontrado em própolis e OEs de frutas cítricas; apresenta ação antibacteriana e antifúngica e não gera resistência bacteriana<sup>42-45</sup>. Fernandes et al. concluíram que FAR é capaz de inibir a formação de biofilme simples ou misto de *C. albicans* e/ou *S. mutans*<sup>46</sup>. Possui propriedades antitumoral, antifúngica, antimicrobiana e antibiofilme e não gera resistência bacteriana<sup>42-45,47</sup>. FAR atua sobre as membranas celulares das bactérias, comprometendo sua integridade e levando à liberação do conteúdo intracelular<sup>44</sup>. Os biofilmes formados na presença de FAR contêm menos biomassa, e mudanças notáveis ocorrem na composição da matriz, além de afetar a estrutura do biofilme, reduzindo a biomassa, matando bactérias nos biofilmes, sem reduzir sua suscetibilidade ao longo das gerações celulares<sup>44</sup>.

O óleo essencial de Tomilho, mais conhecido na literatura por sua sigla TEO - *Thyme Essential Oil*, é composto principalmente por Timol (20%) e Carvacrol (40%). Timol é um monoterpeno<sup>48,49</sup>. Possui propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas de amplo espectro<sup>50,51</sup>, assim como ação antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*<sup>52</sup>. Carvacrol é um fenol monoterpênico, que possui propriedades antibacteriana e antiviral<sup>53</sup>, mostrou efetividade *in-vitro* na prevenção e tratamento de doença periodontal e capacidade de reduzir o crescimento bacteriano na superfície de implantes dentários<sup>54</sup>. Em 2018, TEO foi usado como substituto de eugenol no preparo de pasta endodôntica para obturação de dentes decíduos, e se mostrou mais eficaz contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*<sup>55</sup>.

*Lemongrass Essential Oil* (LEO) é conhecido no Brasil como óleo de capim-limão, sendo seu nome científico *Cymbopogon citratus*. O principal componente de LEO é Citral, em suas formas cis e trans, mais de 80% da composição do óleo<sup>56</sup>. LEO tem potencial para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de infecções fúngicas e inflamação da pele, por mostrar efeito antifúngico eficaz sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *A. niger*<sup>57</sup>. *C. citratus* mostrou capacidade de inibir o crescimento de *P. gingivalis* e *B. megaterim* (periodontopatógenos), assim como de várias cepas de *Helicobacter pylori*<sup>58</sup>. *C. citratus* também apresentou atividade antimicrobiana contra várias espécies cariogênicas, incluindo *S. mutans* e *L. acidophilus*<sup>56,58,59</sup>.

Os micro-organismos mais associados aos insucessos endodônticos são *E. faecalis* e *C. albicans*<sup>60</sup>. *E. faecalis* é um patógeno encontrado com maior frequência em casos de infecção secundária ou persistente e em periodontite apical<sup>61-65</sup>. Apresenta a capacidade de invadir

túbulos dentinários mesmo em condições adversas<sup>66</sup>, além de mostrar resistência ao NaOCl, especialmente em baixas concentrações<sup>67</sup> e ao ambiente altamente alcalino promovido pelo HC. *C. albicans* é encontrada na microbiota do sistema de canais radiculares em dentes com necrose pulpar com ou sem periodontite apical e contribui para sua persistência<sup>68</sup>. Além disso, sua capacidade de invadir túbulos dentinários e a sua resistência à medicação intracanal explica sua associação nos casos de infecções persistentes do canal radicular<sup>69,70</sup>.

Diante do exposto, este estudo visa avaliar as propriedades físico-químicas e biocompatibilidade, além da atividade antimicrobiana de cimentos reparadores endodônticos à base de silicato de cálcio, em associação às substâncias antimicrobianas naturais.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo geral:

Avaliar propriedades físico-químicas, citocompatibilidade, bioatividade e atividade antibiofilme da associação de três substâncias naturais, Farnesol, *Thyme oil* e *lemongrass oil*, a biomateriais à base de silicato tricálcico, MTA Repair HP ou Biodentine.

### 2.2 Objetivos específicos:

**Publicação 1:** avaliar a associação do óleo essencial Farnesol aos cimentos reparadores MTAHP e BIO com relação às suas propriedades físico-químicas, biológicas e atividade antibiofilme.

**Publicação 2:** avaliar as propriedades físico-químicas, biocompatibilidade e potencial antibiofilme da adição de *Thyme Essential Oil* aos cimentos reparadores endodônticos MTA Repair HP e Biodentine.

**Publicação 3:** avaliar as propriedades biológicas, físico-químicas e antimicrobianas da associação de LEO aos cimentos reparadores MTA HP e Biodentine.

### 3 PUBLICAÇÕES

Esta Tese de Doutorado foi dividida em três publicações, que apresentam os resultados obtidos em cada etapa desse estudo. Os artigos foram formatados de acordo com as revistas à qual serão submetidos.

#### 3.1 Publicação 1\*

##### **Propriedades físico-químicas, citocompatibilidade, potencial bioativo e antibiofilme dos materiais reparadores MTA Repair HP e Biodentine e suas associações com farnesol**

##### **RESUMO**

Este estudo avaliou a associação de 1,5% de Farnesol (FAR) aos cimentos reparadores MTA Repair HP (MTAHP) e Biodentine (BIO). As propriedades físico-químicas de tempo de presa, solubilidade em 7 dias e pH em diferentes períodos foram avaliadas. A citocompatibilidade foi avaliada por meio dos testes de methyltetrazolium (MTT) e Vermelho Neutro (VN) após exposição das células Saos-2 às diferentes diluições dos eluídos dos materiais por 24h. A bioatividade foi avaliada pela atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Nódulos de mineralização foram quantificados após 21 dias pela coloração com vermelho de Alizarina (ARS). A capacidade de inibição de Metaloproteinase de Matriz (MMP) 2 e 9 foi mensurada por fluorescência. A atividade antibiofilme foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (MDCT) sobre biofilme mono- e dual-espécies de *Enterococcus faecalis* e/ou *Cândida albicans*, formados em dentina bovina. Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey ou Bonferroni com nível de significância de 5%. Todos os materiais mostraram tempo de presa semelhante e capacidade de alcalinização em todos os períodos avaliados. BIO e BIO/FAR apresentaram perda de massa, e MTAHP e MTAHP/FAR ganho de massa. MTAHP foi o mais citocompatível, embora todos os materiais tenham mostrado citocompatibilidade. Houve aumento na atividade de ALP nos períodos avaliados para todos os materiais, com destaque no período de 7 dias. MTAHP mostrou maior atividade de ALP. Todos os materiais produziram nódulos de mineralização. Os materiais não mostraram atividade anti-MMP-9, no entanto, mostraram inibição de MMP-2. A adição de FAR aumentou a atividade antibiofilme mono e dual-espécie dos materiais. Conclui-se que a adição de FAR (1,5%)

---

\* Redigido de acordo com as normas do *International Endodontic Journal*, periódico para o qual será submetido.

melhora a atividade antibiofilme e mantém propriedades físico-químicas e biológicas adequadas para os cimentos MTAHP e BIO.

**Palavras chave:** Materiais Dentários, Propriedades Físicas e Químicas, Endodontia, *Enterococcus faecalis*, *Cândida albicans*, Óleos Voláteis.

## INTRODUÇÃO

Cimentos reparadores são indicados para selamento de perfuração radicular, capeamento pulpar, pulpotomia, apicificação, apicigênese e retrobturação, devendo estimular o reparo dos tecidos adjacentes (Parirokh & Torabinejad 2010; Torabinejad & Parirokh 2010). Desta forma, necessitam apresentar propriedades físico-químicas adequadas, capacidade de selamento, resistência à penetração bacteriana, biocompatibilidade e bioatividade (Parirokh & Torabinejad 2010; Torabinejad & Parirokh 2010). Por outro lado, o insucesso de tratamentos endodônticos está associado à persistência de vários micro-organismos com presença de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (Mergoni *et al.* 2018; Prada *et al.* 2019). Assim, o uso de materiais com atividade antimicrobiana favorece a eliminação desses micro-organismos residuais (Wang *et al.* 2014).

MTA Repair HP (MTA HP. Angelus, PR, Brasil) e Biodentine (BIO. Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França) são cimentos à base de silicato de cálcio que apresentam melhor propriedade de manipulação e aplicação clínica. MTA HP contém silicato de cálcio, óxido de cálcio, e tungstato de cálcio como radiopacificador. As propriedades físico-químicas e biológicas do MTA HP foram consideradas adequadas e similares ao MTA convencional (Cintra *et al.* 2017; Galarca *et al.* 2018; Guimaraes *et al.* 2018). BIO contém silicato tricálcico e dicálcico, carbonato de cálcio, e óxido de zircônio como radiopacificador. O óxido de zircônio associado ao silicato tricálcico permite a liberação de ions cálcio, formando hidróxido de cálcio quando hidratado com água destilada (Camilleri 2014), mostrando potencial bioativo (Viapiana *et al.* 2014b) e biocompatibilidade (Gomes Cornelio *et al.* 2011). No entanto, os cimentos reparadores endodônticos à base de silicato de cálcio apresentam atividade antimicrobiana limitada (Poggio *et al.* 2015).

Os Óleos Essenciais são substâncias voláteis que protegem as plantas (Hassan *et al.* 2015) e que são atualmente estudados por sua eficácia e segurança (Dagli *et al.* 2015). O Farnesol (FAR) é um álcool sesquiterpeno hidrofóbico encontrado em própolis e óleos essenciais de frutas cítricas, apresenta ação antibacteriana e antifúngica e não gera resistência bacteriana (Gomes *et al.* 2011; Gupta *et al.* 2018). FAR tem a capacidade de inibir a formação

de biofilme de *C. albicans* e/ou *S. mutans* (Fernandes *et al.* 2016), atuando nas membranas celulares das bactérias (Gomes *et al.* 2011).

Embora existam diversos estudos que associem substâncias aos cimentos reparadores endodônticos para melhorar suas propriedades antimicrobianas (Del Carpio-Perochena *et al.* 2015), ainda não foi relatada na literatura a associação destes biomateriais com substâncias naturais como os óleos essenciais visando favorecer a atividade antimicrobiana (Dagli *et al.* 2015).

O objetivo do estudo foi avaliar a associação do óleo essencial FAR aos cimentos reparadores MTAHP e BIO com relação às suas propriedades físico-químicas, biológicas e atividade antibiofilme. A hipótese nula foi de que FAR não apresenta influência sobre as propriedades dos cimentos reparadores avaliados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho os cimentos foram manipulados segundo as recomendações dos fabricantes, nas proporções descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Materiais e Proporções

Material	Fabricante	Proporção		
		Pó	Líquido	Farnesol*
MTAHP	Angelus, Londrina,	1 g	300 µL	—
MTAHP/FAR 1,5%	Paraná, Brasil	1 g	300 µL	21 µL
BIO	Septodont, Saint Maur	1 g	8 gotas	—
BIO/FAR 1,5%	des Fossés, France	1 g	8 gotas	21 µL

MTAHP – MTA Repair HP; BIO – Biodentine; FAR, Farnesol. \* Sigma-Aldrich Brasil Ltda.SP.

## AValiação DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

### *Tempo de presa*

A avaliação do tempo de presa (n=6) foi realizado baseado na ISO 6876/2012. Anéis metálicos de 10mm de diâmetro interno e 1mm de altura foram utilizados. Para determinar a presa foi utilizada agulha de Gilmore com massa de  $100 \pm 0,5g$  e diâmetro de  $2 \pm 0,1mm$  apoiada perpendicularmente sobre a superfície do cimento. Este processo foi repetido até a agulha não deixar mais marca na superfície do cimento. Os materiais foram manipulados segundo as

recomendações dos fabricantes, MTAHP foi espatulado durante 40 segundos; BIO foi agitado em amalgamador por 30 segundos. O tempo de presa foi aferido desde o preenchimento do material nos anéis até a agulha deixar de marcar na superfície do cimento. Durante o período de avaliação os materiais foram mantidos na estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $95\% \pm 5\%$  de umidade; a agulha foi limpa antes de cada aferição.

### ***Solubilidade***

O teste de solubilidade (n=5) foi realizado com corpos de prova de 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, e com um fio de nylon impermeável (6,5cm) no meio do material, armazenados em estufa ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $95\% \pm 5\% \text{UR}$ ), durante 24h (Carvalho-Junior *et al.* 2007). Os corpos de prova foram colocados em dessecador a vácuo, até obter estabilidade de massa. Depois foram suspensos em 7,5 ml de água destilada e deionizada, sem contato entre o material e a superfície interna do recipiente; mantidos em estufa ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) durante 7 dias. Os corpos de prova foram lavados com água destilada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final. A aferição de massa foi realizada em balança de precisão HM-200 (A&D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA). A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa inicial.

### ***pH***

Para o teste de pH, tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n=10). Cada tubo foi imerso em 10 ml de água deionizada cujo pH foi aferido previamente e mantido na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante os períodos experimentais, o grupo controle foi água destilada e deionizada. Transcorrido cada período de avaliação, 1, 3, 7, 14 e 21 dias, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos. A aferição do pH foi realizada em triplicata, com pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) a  $25^{\circ}\text{C}$  de temperatura ambiente.

## **AValiação da Citocompatibilidade e Potencial Bioativo**

Foram utilizadas células humanas “osteoblast-like cells” da linhagem Saos-2 (ATCC HTB-85), cultivadas em frascos T-75 (Jet Biofil, Guangzhou, China), contendo DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), até a confluência. Os cimentos foram manipulados (Tabela 1) e colocados no fundo do poço de placas de cultura de 12 poços (Jet Biofil). As placas foram mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , 95% de umidade e 5% de  $\text{CO}_2$ ; após 24h as placas

foram expostas à luz ultravioleta (UV) (Katara et al. 2008), e os poços preenchidos com 5mL de DMEM sem soro (meio modificado de Dulbecco; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram mantidas a 37°C por 24h, com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>, ISO 10993-5/2005.

### ***Ensaio de Viabilidade celular***

A viabilidade celular foi avaliada por brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e Vermelho Neutro (VN) (Tanomaru-Filho *et al.* 2017). As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células/mL) em placas de 96 poços (Jet Biofil) contendo DMEM suplementado com 10% de SFB (SFB: Gibco, Life Technologies), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas por 24h a 37°C, 5% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> antes de exposição aos eluídos dos materiais. As células foram expostas aos eluídos dos cimentos em diluições 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30; como controle negativo foi utilizado DMEM sem soro e como controle positivo Dimetilsilfóxido (DMSO). Após esse período, o meio foi substituído por 100 µL de solução de MTT 5mg/mL (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 3h. Foi adicionado isopropanol (100µL) acidificado a 0,04N (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi medida a 570nm em espectrofotômetro (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). Para o teste de VN, os eluídos foram substituídos por 0,1µL de DMEM contendo VN 50µL/mL (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 3h. O produto colorimétrico foi solubilizado em solução (50% de etanol e 1% de ácido acético) (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro a 570nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada grupo experimental, e a média de cada experimento foi usada na análise estatística (n = 3 por grupo).

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO**

### ***Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)***

A atividade enzimática da fosfatase alcalina foi determinada com a utilização de kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As células foram plaqueadas ( $5 \times 10^4$  células/mL) em placas de cultura de 96 poços. As células foram cultivadas por 24h a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram expostas aos eluídos dos materiais na diluição de 1:15, por um, três e sete dias. Após cada período experimental, o conteúdo dos poços foi removido e a monocamada celular foi lavada com 200 µL de PBS 1X. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de uma solução de Lauril sulfato de sódio/água destilada 1% (Sigma-Aldrich) a cada poço. Cada amostra foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) contendo substrato e tampão, e foram adicionados 500 µL de reagente

colorido. A densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro a 590 nm. Três experimentos independentes foram realizados em sextuplicata para cada grupo experimental e controle (n = 3/grupo). Os dados foram expressos como atividade ALP normalizada pela quantidade de proteínas totais no respectivo intervalo de tempo de cultura (DO = 570 nm).

### ***Coloração com vermelho de Alizarina (ARS)***

Para avaliar o potencial bioativo dos materiais reparadores e associações, as células Saos-2 foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/mL) em placas de cultura de 24 poços. Durante 21 dias, o meio de cultura DMEM osteogênico (DMEM 10% SFB; 100 IU/mL penicilina; 100 mg/mL estreptomicina; 0,023 g/mL  $\beta$ -glicerolfosfato; 0,055 mg/mL ácido ascórbico – Sigma Aldrich), com os eluídos dos cimentos e controles, foi renovado a cada 2 dias. Após este período, as células foram fixadas com 10% de paraformaldeído, lavadas e incubadas com 1 mL de AlizarinRed S – ARS 40 mM (2%- pH 4.1) (Sigma-Aldrich) por 3 minutos. Os campos foram fotografados (Canon EOS-1D, Canon Inc, Tokyo, Japan) e, em seguida, a mineralização foi quantificada pela dissolução dos nódulos com 0,5 mL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridínio (Sigma-Aldrich). Três alíquotas de 100  $\mu$ L da ressuspensão de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda. Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3) e repetido três vezes em tempos independentes.

### ***Atividade anti-MMP***

A avaliação de atividade anti-MMP (Gutierrez *et al.* 2019) foi realizada usando MMP-2 e MMP-9 recombinante com kits fluorométricos de MMP (SensoLyte assay kits; AnaSpec, Fremont, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Os eluídos dos materiais (tabela 1), e as MMP ativadas [pré-incubadas com 10mM de amino-phenyl mercuric acetate (APMA)] foram misturados com substrato peptídico de transferência de energia de ressonância de fluorescência 5-FAM / QXLTM 520 (FRET) em tampão de ensaio usando placas de 96 poços. Para o peptídeo FRET intacto, a fluorescência de 5-FAM foi anulada por QXL 520. Após a clivagem em 2 fragmentos separados por MMPs, a fluorescência de 5-FAM foi recuperada e monitorada em comprimentos de onda de excitação/emissão (490/520nm, respectivamente). Após 1 h de incubação, o sinal de fluorescência foi detectado por um leitor de microplacas (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EUA) e expresso como unidades fluorescentes relativas (RFU). MMPs ativas diluídas foram usadas como controle positivo; O Ilomastat 25 $\mu$ M foi usado como controle inibidor, e os controles do composto de teste sem

MMP foram adicionados para avaliar sua autoimunofluorescência. Foram realizadas seis amostras de cada grupo para cada ensaio de MMP.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Telstar Technologies, S.L.–BV 100, Terrassa, Espanha). Foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Cultura pura *E. faecalis* foi cultivada *overnight* em Tryptic Soy Broth-TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) e de *C. albicans* cultivada em Sabouraud Dextrose Broth – SB (Difco, Detroit, MI, EUA). Os inóculos foram preparados a partir de suspensões microbianas preparadas e ajustadas a uma densidade óptica equivalente a  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, tanto para os biofilmes mono-espécie como para os dual-espécies.

#### **Atividade antibiofilme: teste de contato direto modificado (TCDM)**

Blocos de dentina (n = 6) esterilizados, medindo 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura) foram submersos em TSb (2 mL) contendo 1% do inóculo ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) nos biofilmes de *E. faecalis*, com trocas do meio de cultura total a cada 48 horas. Os biofilmes de *C. albicans* e os biofilmes com as duas cepas associadas, foram induzidos utilizando meio de cultura RPMI-1640 (+L-glutamine, +25mM HEPES buffer, -sodium bicarbonate) (Gibco, R 23400-013 1L, Life Technologies, USA) e 28 g de glicose, com inóculos na concentração citada acima e trocas a cada 24 h. Os três tipos de biofilmes foram desenvolvidos em Placas de cultura de 24 poços. As placas foram mantidas em ambiente microaerófilo por 14 dias para o biofilme mono-espécie de *E. faecalis*, e em aerofilia por 5 dias para os biofilmes mono-espécie de *C. albicans* e dual de *E. faecalis/C. albicans*. Todos biofilmes foram mantidos em incubadora de bancada shaker (Modelo 0816M28, Quimis aparelhos científicos LTDA, Diadema, SP, Brasil) a 37°C com 80 rpm. Após os períodos de indução, os eluídos dos materiais foram preparados, em concentração de 50mg/mL. Os materiais foram manipulados segundo as proporções da Tabela 1, colocados em tubo falcon de 15 mL com 10 mL de água destilada e imediatamente misturados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), mantidos em estufa a 37°C durante 48 h. Em seguida, os blocos de dentina com biofilme formado foram lavados uma vez em PBS para remoção de células microbianas não aderidas e colocados individualmente em um eppendorf de 0,5 mL com 400µL de eluído dos materiais, os quais permaneceram em contato por 15 h, para o controle foi utilizado água destilada. Após este período, cada bloco de dentina

foi colocado em um microtubo contendo 1 mL de solução salina e pérolas de vidro e foram agitados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil). Posteriormente, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento de três alíquotas de 20µL de cada uma das suspensões, em placas de Petri contendo meio de cultura de Tryptic Soy Agar (TSA), para *E. faecalis* do biofilme mono-espécie; Sabouraud Dextrose Agar (SBa), para *C. albicans* do biofilme mono- e dual-espécie e m-Enterococcus Agar para isolamento de *E. faecalis* do biofilme dual-espécie. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Foi realizada contagem de UFC/mL e os dados foram submetidos à transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ).

### **Análise estatística**

A normalidade dos dados foi testada usando o teste Shapiro-Wilk. A análise estatística dos testes físico-químicos e ARS foi realizada com os testes paramétricos ANOVA e Tukey. A viabilidade celular e a atividade da ALP e inibição de MMP foram analisadas pelos testes estatísticos ANOVA e Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em  $P < .05$ .

## **RESULTADOS**

### **TESTES FÍSICO-QUÍMICOS**

A associação de FAR não modificou o tempo de presa dos materiais, que mostraram valores semelhantes entre eles ( $P > .05$ ). A solubilidade expressa em porcentagem de perda de massa mostrou que MTAHP e MTAHP/FAR ganharam massa, com maiores valores para MTAHP ( $P < .05$ ). Em contrapartida, BIO e BIO/FAR mostraram perda de massa, sem diferença entre eles ( $P > .05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Tempo de presa e solubilidade (média e desvio padrão) observados para os materiais

	<b>MTAHP</b>	<b>MTAHP/FAR</b>	<b>BIO</b>	<b>BIO/FAR</b>
Tempo de presa (min)	32.50 (1.97) <sup>a</sup>	32.50 (2.17) <sup>a</sup>	34.17 (2.64) <sup>a</sup>	32.83 (1.72) <sup>a</sup>
Solubilidade (%)	-2.11 (0.70) <sup>b</sup>	-1.18 (0.25) <sup>c</sup>	4.32 (0.11) <sup>a</sup>	4.19 (0.37) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < .05$ )

Todos os materiais mostraram capacidade de alcalinização nos períodos avaliados (24h, 72h, 7, 14 e 21 dias), mostrando diferença significativa com o grupo controle ( $P < .05$ ). A maior capacidade de alcalinização foi mostrada pelos grupos MTAHP e MTAHP/FAR no período de 24 horas. No período de 72 horas, o valor mais alto de pH foi do grupo MTAHP, e o valor mais baixo foi do grupo BIO ( $P < .05$ ). As associações com FAR neste período não mostraram diferença ( $P > .05$ ). Não houve diferença estatística entre os quatro grupos experimentais para os demais períodos avaliados ( $P > .05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores de pH (media e desvio padrão) observados para os materiais nos diferentes períodos

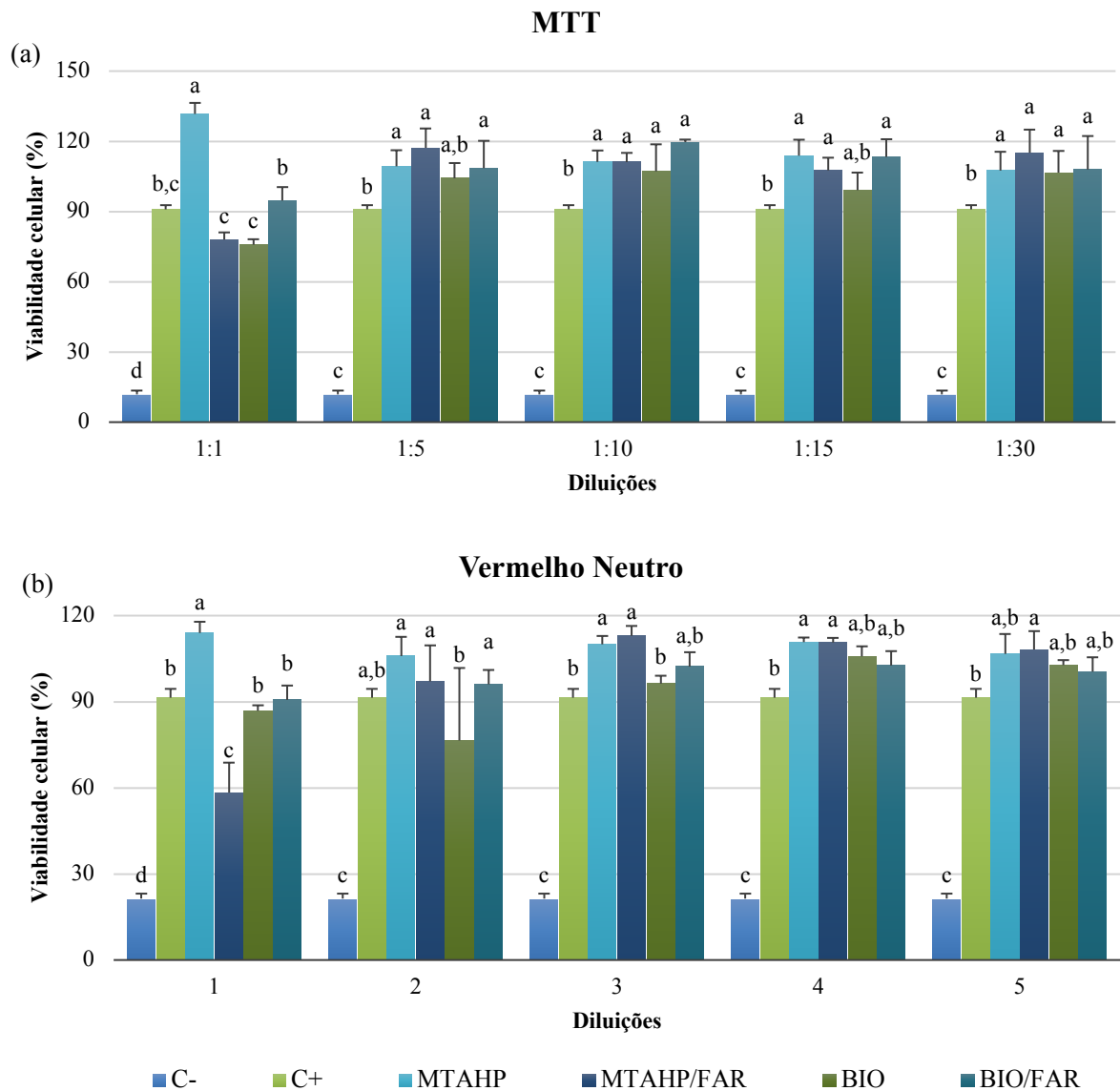
	MTAHP	MTAHP/FAR	BIO	BIO/FAR	Controle
24 h	11.12 (0.06) <sup>a</sup>	11.00 (0.09) <sup>a</sup>	10.07 (0.38) <sup>b</sup>	10.36 (0.16) <sup>b</sup>	6.43 (0.48) <sup>c</sup>
72 h	10.33 (0.56) <sup>a</sup>	9.83 (0.69) <sup>a,b</sup>	9.55 (0.65) <sup>b</sup>	9.79 (0.69) <sup>a,b</sup>	6.51 (0.31) <sup>c</sup>
7 dias	9.92 (0.77) <sup>a</sup>	10.08 (0.44) <sup>a</sup>	9.85 (0.52) <sup>a</sup>	9.63 (0.87) <sup>a</sup>	6.14 (0.36) <sup>b</sup>
14 dias	9.64 (0.74) <sup>a</sup>	10.03 (0.62) <sup>a</sup>	9.24 (1.09) <sup>a</sup>	9.32 (1.14) <sup>a</sup>	6.42 (0.28) <sup>b</sup>
21 dias	8.99 (0.63) <sup>a</sup>	9.77 (0.52) <sup>a</sup>	8.95 (1.02) <sup>a</sup>	9.78 (0.96) <sup>a</sup>	6.47 (0.41) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < .05$ )

### Viabilidade Celular

O ensaio de MTT mostrou que a adição de FAR aos cimentos MTAHP e BIO não aumentou a citotoxicidade dos materiais nas diluições 1:5; 1:10; 1:15 e 1:30. Na diluição de 1:1, MTAHP mostrou maiores valores de viabilidade celular ( $P < .05$ ) quando comparado ao controle positivo (Fig. 1a).

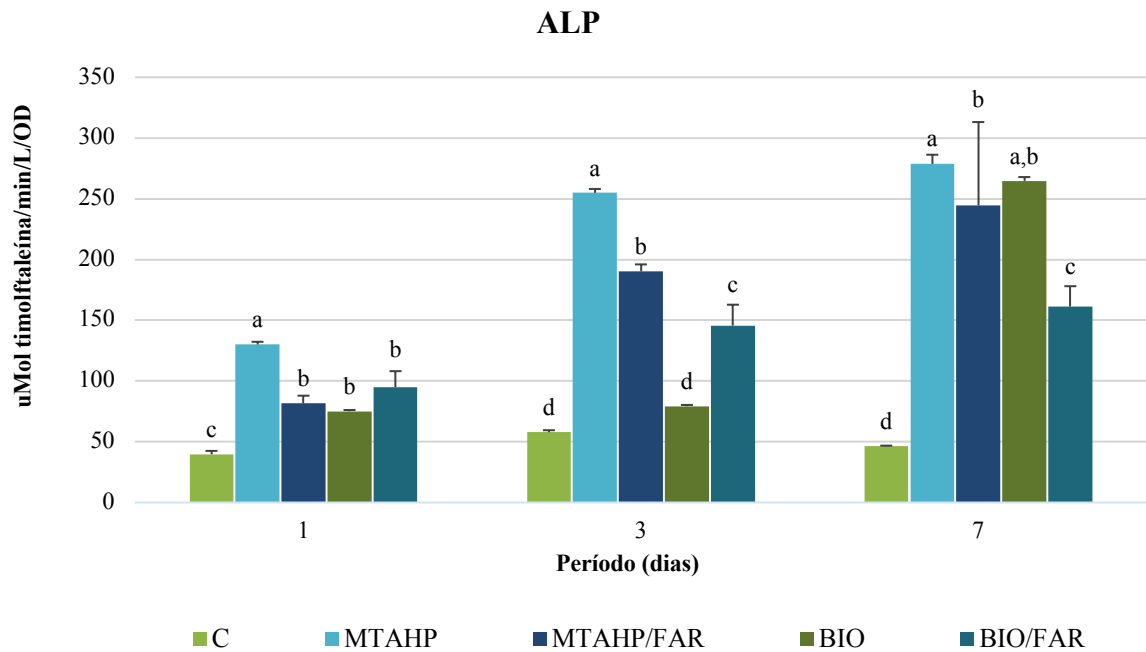
No teste de VN todos os materiais se mostraram citocompatíveis nas diluições 1:5, 1:10, 1:15 e 1:30, a viabilidade celular dos materiais foi semelhante ou maior que a do controle positivo e negativo. Na diluição 1:1 MTAHP/FAR foi citotóxico na diluição, ao comparado com o controle positivo ( $P < .05$ ) (fig. 1b).



**Figura 1** - Viabilidade celular de Saos-2 avaliada por ensaios MTT (a) e VN (b), após 24 horas de exposição aos eluídos dos cimentos MTAHP, MTAHP/FAR, BIO, BIO/FAR nas diluições de 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30, meio de cultura-DMEM sem soro (controle positivo), Dimetilsulfóxido-DMSO (controle negativo). Barras com letras diferentes representam diferenças significantes entre os eluídos de cimento (em cada diluição) e o controle; MTAHP, MTA Repair HP; FAR, Farnesol; BIO, Biodentine; C+, controle positivo; C-, controle negativo.

#### Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

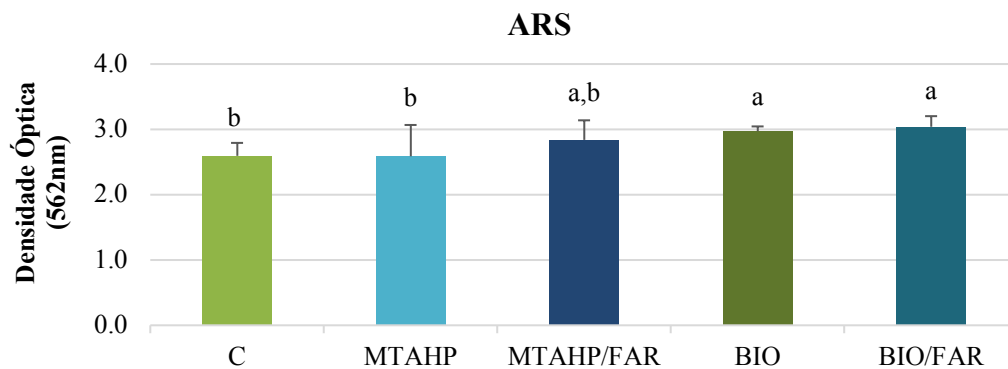
Todos os materiais avaliados aumentaram a atividade da fosfatase alcalina nos períodos avaliados quando comparados ao controle ( $P > .05$ ). MTAHP mostrou a maior atividade da ALP nos 3 períodos estudados. Aos 3 dias de cultivo, BIO apresentou atividade da ALP semelhante ao controle ( $P < .05$ ). A atividade da ALP aumentou significativamente no período de 7 dias, para todos os grupos quando comparados ao controle ( $P > .05$ ) (Fig. 2).



**Figura 2** – Atividade de ALP de células Saos-2 após exposição a MTAHP, MTAHP/FAR, BIO, BIO/FAR na diluição 1:15 e meio de cultura sem soro (controle), durante os períodos de 1, 3 e 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significantes em cada período. MTAHP, MTA Repair HP; FAR, Farnesol; BIO, Biodentine; C, Controle.

#### Coloração com vermelho de Alizarina (ARS)

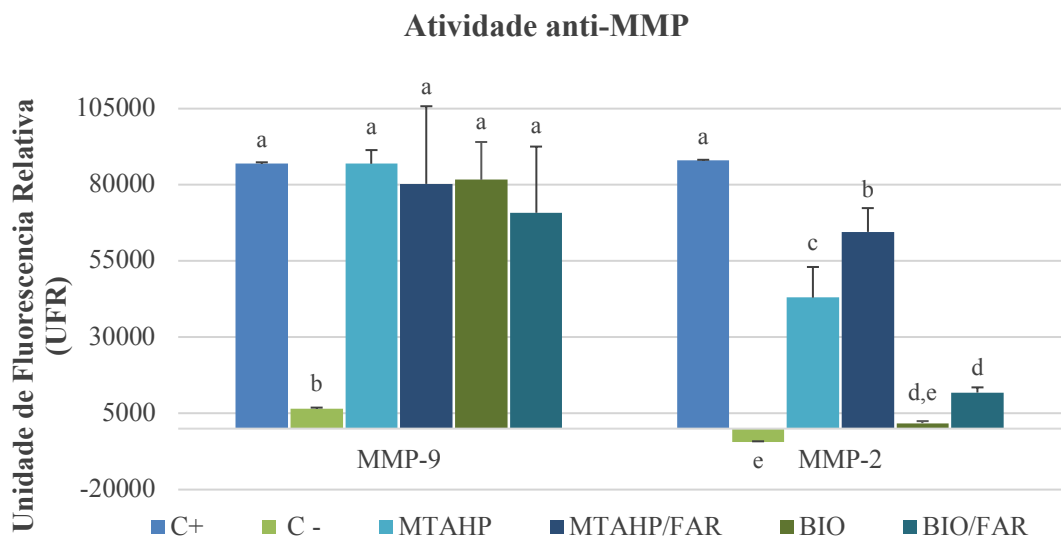
Todos os materiais estudados foram associados com produção de nódulos de mineralização. BIO e BIO/FAR produziram significativamente mais nódulos de mineralização que o controle ( $P < .05$ )



**Figura 3** – Coloração com alizarina (ARS), análise estatística realizada após 21 dias de exposição do meio de cultura osteogênico. Todos os materiais induziram a produção de nódulos mineralizados. Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os eluídos de cimento e o controle negativo. MTAHP, MTA Repair HP; FAR, Farnesol; BIO, Biodentine; C, Controle.

## ATIVIDADE ANTI-MMP

Os níveis de MMP-9 dos materiais avaliados não mostraram diferença significativa com o controle positivo (C+) ( $P > .05$ ), sem atividade inibitória (fig. 4). Os cimentos estudados evidenciaram inibição de MMP-2. O grupo BIO e BIO/FAR apresentaram menores níveis de MMP-2. MTAHP e MTAHP/FAR mostraram atividade anti-MMP-2, com diferença significativa entre eles ( $P < .05$ ). Todos os grupos foram diferentes ao controle positivo ( $P < .05$ ) (fig. 4).

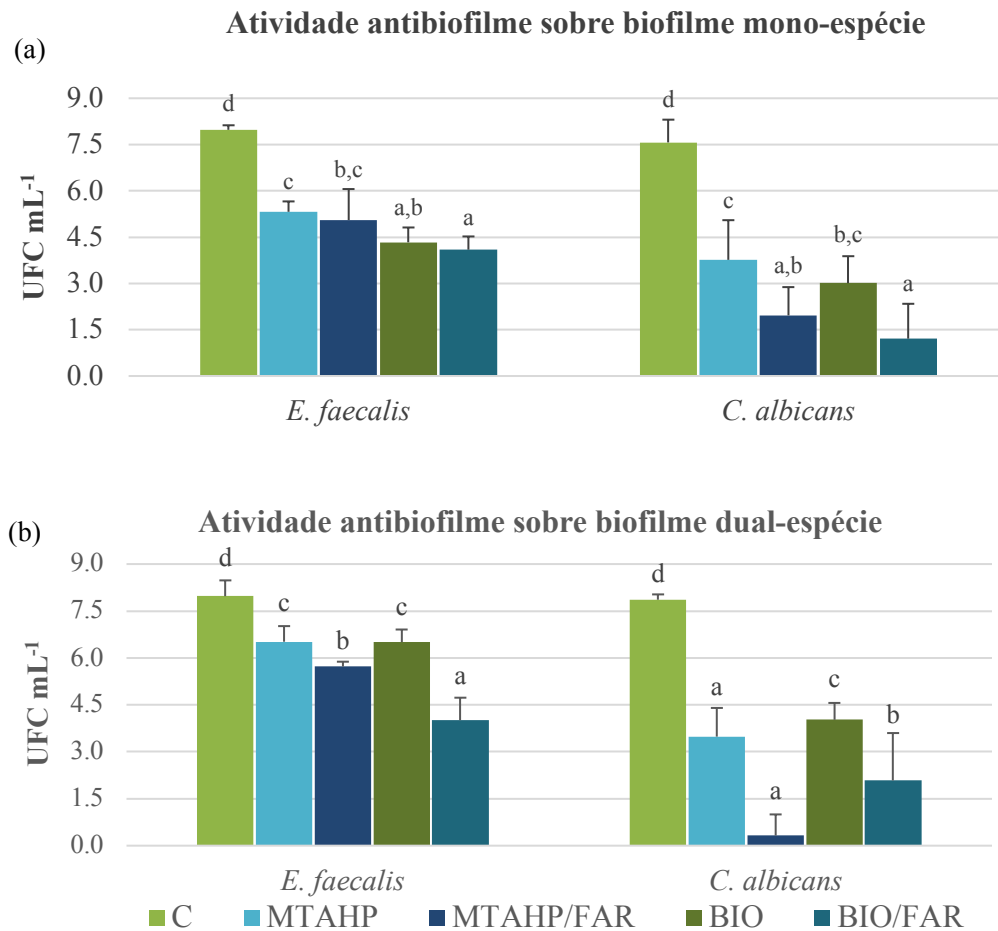


**Figura 4** – Atividade anti-MMP (Metaloprotease). Inibição de Matriz de Metaloprotease 9 e 2, por MTAHP, MTAHP/FAR, BIO, BIO/FAR na diluição 1:15 em Unidade de Fluorescência Relativa (UFR). MMP ativa diluída como controle positivo (C+), Ilomastat 25 $\mu$ M como controle inibição (C).

## ATIVIDADE ANTIBIOFILME POR TCDM

O TCDM evidenciou que os materiais possuem capacidade antibiofilme sobre biofilme mono-espécie de *E. faecalis* ou *C. albicans* quando comparados com o controle ( $P < .05$ ). BIO/FAR foi o que conseguiu maior redução de UFC mL<sup>-1</sup> tanto de *E. faecalis* como de *C. albicans*.

No TCDM sobre biofilme dual-espécie, todos os materiais avaliados mostraram capacidade de reduzir UFC de *E. faecalis* e *C. albicans*, mostrando diferença significativa quando comparados com o controle ( $P < .05$ ). A adição de FAR a MTAHP ou BIO aumentou a atividade antibiofilme dos materiais. BIO/FAR foi o mais efetivo contra *E. faecali*, e MTAHP/FAR conseguiu maior redução de UFC ml<sup>-1</sup> sobre *C. albicans*, no biofilme dual-espécie.



**Figura 5** – Atividade antibiofilme por Teste de Contado Direto Modificado (TCDM) sobre biofilme mono-espécie (a) e biofilme dual-espécie (b), após 15 horas de exposição aos eluídos dos cimentos MTAHP, MTAHP/FAR, BIO, BIO/FAR na concentração de 50mg/mL, e água destilada (controle). Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os cimentos e o controle (sobre cada micro-organismo); MTAHP, MTA Repair HP; FAR, Farnesol; BIO, Biodentine; C, controle.

## DISCUSÃO

Os cimentos reparadores MTA HP e BIO apresentaram aumento da atividade antibiofilme quando associados a 1,5% de Farnesol. Por outro lado, estas associações propostas não proporcionaram alterações nas propriedades físico-químicas e biológicas destes materiais. Sendo assim, a hipótese nula foi parcialmente aceita.

A atividade antibiofilme de MTAHP e BIO foi maior na associação de 1,5% de FAR; as associações propostas foram efetivas na redução de UFC de biofilme de *C. albicans* e/ou *E. faecalis* tanto em biofilme mono-espécie como em dual-espécie. *E. faecalis* é a bactéria mais usada como padrão para avaliar a atividade antimicrobiana de materiais endodônticos (Swimberghe *et al.* 2019). *C. albicans* é a levedura mais encontrada em infecções endodônticas (Mergoni *et al.* 2018). Ambos micro-organismos estão associados tanto a infecções primárias quanto secundárias (Pourhajibagher *et al.* 2017). Por outro lado, é interessante que a avaliação do efeito antimicrobiano de materiais endodônticos seja feita sobre microorganismos

organizados em biofilmes, pois são mais resistentes, e quando na forma dual ou multi-espécie apresentam ainda maior resistência (Swimberghe *et al.* 2019).

A busca por melhor característica antimicrobiana de materiais endodônticos é estudada (Wang *et al.* 2014; Del Carpio-Perochena *et al.* 2015). A substância mais associada a estes materiais é a Clorexhidina (CHX), que mostrou capacidade de aumentar a atividade antimicrobiana de MTA contra *E. faecalis*, *Streptococcus mutans*, *C. albicans*, *Actinomyces*, *Escherichia coli*, e a mistura desses micro-organismos (Bidar *et al.* 2012). No entanto, esta associação prejudicou as propriedades físico-químicas e biológicas do cimento reparador endodôntico (Jacinto *et al.* 2015; Manochehrifar *et al.* 2016).

Por outro lado, as substâncias antimicrobianas de origem natural são atualmente estudadas, pois não provocam resistência bacteriana (Dagli *et al.* 2015; Hassan *et al.* 2015). Dentre essas substâncias naturais, FAR está envolvido em uma série de funções celulares e, portanto, tem sido explorado como um agente antimicrobiano eficaz, sendo usado em sinergia com diferentes drogas, moléculas naturais e nanocompósitos, a fim de expandir sua potência como um agente terapêutico versátil (Gupta *et al.* 2018). A associação de FAR a MTAHP ou BIO potencializou a atividade antimicrobiana destes materiais sobre biofilme mono e dual-espécie de *E. faecalis* e/ou *C. Albicans*, corroborando outros estudos que mostraram que FAR inibiu a formação de biomassa de biofilme de *C. albicans* (Fernandes *et al.* 2016), reduziu biomassa de biofilme de *E. faecalis* (Alves *et al.* 2013), além de possuir atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre *C. albicans* ou *E. faecalis* (Chavez-Andrade *et al.* 2019). Estes dois micro-organismos são considerados resistentes e estão presentes em casos de insucesso do tratamento endodôntico (Prada *et al.* 2019; Manoil *et al.* 2020), sendo amplamente estudados para a avaliação do potencial antimicrobiano de materiais usados na endodontia (Wang *et al.* 2014; Del Carpio-Perochena *et al.* 2015; Pourhajibagher *et al.* 2017; Chavez-Andrade *et al.* 2019; Swimberghe *et al.* 2019). O mecanismo de ação do FAR sobre *C. albicans* ocorre em função de sua capacidade de inibir a transição de levedura para hifa, visto que esta é uma das características de virulência mais importantes associadas ao micro-organismo (Polke *et al.* 2018).

A associação de FAR não modificou as propriedades físico-químicas de MTAHP e BIO, mantendo o tempo de presa, solubilidade e pH dos materiais puros. A avaliação das propriedades físicas dos materiais é importante uma vez que alterações de sua composição ao alterar suas propriedades físicas e funcionais, podem alterar seu comportamento biomecânico e sua resposta bioativa (Jimenez-Sanchez *et al.* 2019). Além disso, a avaliação das propriedades químicas, como a aferição do pH, é importante para analisar a capacidade dos materiais em

promover reparo dos tecidos periapicais (Viapiana *et al.* 2014a). Tais propriedades são avaliadas de acordo com normas previamente definidas pela ISO 6876/2012 e ANSI/ADA 2008.

O tempo de presa de um cimento endodôntico deve ser suficiente para sua aplicação clínica. Embora seja esperado que o acréscimo de uma substância oleosa à água destilada possa ser responsável por um maior tempo de presa dos materiais (Viapiana *et al.* 2014a), nossos resultados mostraram que a adição de FAR manteve o tempo de presa de MTA HP e BIO. Desta forma, podemos pressupor que FAR não alterou a hidratação dos cimentos.

A avaliação da solubilidade deve também ser realizada uma vez que uma alta solubilidade pode comprometer a resistência mecânica dos materiais e levar à infiltração (Viapiana *et al.* 2014a). Entretanto, a metodologia convencional de avaliação da solubilidade pela perda de massa não considera o fato de que cimentos hidráulicos à base de silicato de cálcio absorvem água (Viapiana *et al.* 2014a). Esta captação de fluidos pode justificar o ganho de massa de MTA HP (Galarca *et al.* 2018) associado ou não ao FAR. Embora valores de solubilidade acima do recomendado pelas normas ISO/ADA tenha sido observado para BIO, como já previamente descrito (Elsaka *et al.* 2019; Quintana *et al.* 2019), associado ou não ao FAR, a avaliação desta propriedade após imersão em fluidos corporais simulados, ao invés de água destilada, tem mostrado menor perda de massa para cimentos de silicato de cálcio (Torres *et al.* 2020). O fato de FAR não ter alterado a reação de presa e o processo de hidratação dos cimentos avaliados pode justificar os valores de solubilidade terem se mantido (Elsaka *et al.* 2019).

Uma vez que a solubilidade dos cimentos à base de silicato de cálcio pode ser explicada pela liberação dos íons  $\text{OH}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , é importante que o pH das soluções também seja determinado, principalmente levando em consideração que um ambiente alcalino durante um longo período de tempo pode desempenhar um papel positivo nos processos de reparo e cicatrização (Urban *et al.* 2018). Todos os cimentos avaliados mostraram capacidade de alcalinização do meio, de acordo com estudos prévios que observaram altos valores de pH para BIO (Quintana *et al.* 2019) e MTAHP (Guimaraes *et al.* 2018).

Em relação à biocompatibilidade dos materiais avaliados, tanto MTAHP como BIO são considerados materiais adequados para uso clínico (Tomas-Catala *et al.* 2018). Portanto, é importante que as propostas para melhorar a atividade antimicrobiana desses materiais não prejudiquem as propriedades biológicas dos mesmos. A adição de FAR não influenciou na citocompatibilidade de MTAHP ou BIO. Chávez-Andrade *et al.* (Chavez-Andrade *et al.* 2017)

avaliaram a solução de FAR e não mostraram citotoxicidade nem genotoxicidade sobre células de fibroblastos L929.

A capacidade de induzir tecido mineralizado foi avaliada pelos ensaios de ALP e ARS. Os materiais puros e associados a FAR evidenciaram aumento da produção de ALP nos períodos avaliados, mostrando um incremento na atividade da ALP com o tempo, sendo maior aos 7 dias de contato, conforme já evidenciado (Tanomaru-Filho *et al.* 2017). Assim mesmo, o teste de ARS mostrou que após 21 dias, todos os materiais induziram a produção de nódulos mineralizados; no entanto os grupos BIO e BIO/FAR produziram maior quantidade de nódulos de mineralização. Os cimentos reparadores são considerados materiais bioativos porque quando colocados em contato com os tecidos pulpar ou periodontal são capazes de estimular estes tecidos, conduzindo e induzindo formação de tecido duro (ósso, cimento e dentina) (Parirokh & Torabinejad 2010; Torabinejad & Parirokh 2010; Quintana *et al.* 2019). Assim, a associação de FAR aos cimentos MTAHP e BIO não interferiu na bioatividade dos materiais.

As MMP são proteases que geram moléculas bioativas que participam em processos fisiológicos e patológicos de reabsorção e formação óssea (Paiva & Granjeiro 2017). Devido aos cimentos reparadores serem utilizados em íntimo contato com o osso e estar demonstrado que possuem propriedades bioativas (Tanomaru-Filho *et al.* 2017; Tomas-Catala *et al.* 2018), é interessante saber qual é a interação com as MMP. Todos os materiais mantiveram os níveis de MMP-9, que está associada ao processo de mineralização e remodelação tecidual (Boelen *et al.* 2019). Assim mesmo, os materiais estudados foram capazes de diminuir a expressão de MMP-2, o que poderia ser favorável para acelerar o reparo, já que o aumento de níveis de MMP-2 está relacionado a maior inflamação (Boelen *et al.* 2019). Assim, a adição de FAR a MTAHP ou BIO não influenciou nos níveis de MMP-2 ou 9.

## CONCLUSÃO

A adição de 1,5% de Farnesol aos cimentos reparadores endodônticos, MTA Repair HP e Biodentine, proporciona propriedades físico-químicas e biológicas adequadas, e melhora significativamente a ação antibiofilme.

## REFERÊNCIAS

- Alves FR, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. (2013) Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res* **27**(1), 20-25.
- Bidar M, Naderinasab M, Talati A *et al.* (2012) The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dent Res J (Isfahan)* **9**(4), 466-471.
- Boelen GJ, Boute L, d'Hoop J, EzEldeen M, Lambrichts I, Opdenakker G (2019) Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clin Oral Investig* **23**(7), 2823-2835.
- Camilleri J (2014) Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod* **40**(12), 2030-2035.
- Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhorette MA, Consani S, Sousa-Neto MD (2007) Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod* **33**(9), 1110-1116.
- Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz IO *et al.* (2017) Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new High-plasticity MTA material. *J Endod* **43**(5), 774-778.
- Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Basso Bernardi MI, de Toledo Leonardo R, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM (2019) Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Arch Oral Biol* **107**, 104481.
- Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM *et al.* (2017) Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Arch Oral Biol* **84**, 89-93.
- Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS, Baroudi K (2015) Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent* **5**(5), 335-340.
- Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Shrestha A, Bramante CM (2015) Antibacterial properties associated with chitosan nanoparticle treatment on root dentin and 2 types of endodontic sealers. *J Endod* **41**(8), 1353-1358.
- Elsaka SE, Elnaghy AM, Mandorah A, Elshazli AH (2019) Effect of titanium tetrafluoride addition on the physicochemical and antibacterial properties of Biodentine as intraorifice barrier. *Dent Mater* **35**(1), 185-193.
- Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB (2016) Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling* **32**(3), 329-338.
- Galarca AD, Da Rosa WLO, Da Silva TM *et al.* (2018) Physical and biological properties of a High-Plasticity Tricalcium Silicate cement. *Biomed Res Int* **2018**, 8063262.
- Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* **37**(2), 203-210.
- Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R (2011) Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Curr Microbiol* **63**(4), 354-359.
- Guimaraes BM, Prati C, Duarte MAH, Bramante CM, Gandolfi MG (2018) Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitalcem. *J Appl Oral Sci* **26**, e2017115.

- Gupta P, Sharma M, Arora N, Pruthi V, Poluri KM (2018) Chemistry and biology of farnesol and its derivatives: Quorum Sensing molecules with immense therapeutic potential. *Curr Top Med Chem* **18**(22), 1937-1954.
- Gutierrez MF, Bermudez J, Davila-Sanchez A *et al.* (2019) Zinc oxide and copper nanoparticles addition in universal adhesive systems improve interface stability on caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater* **100**, 103366.
- Hassan ST, Majerova M, Sudomova M, Berchova K (2015) Antibacterial activity of natural compounds - essential oils. *Ceska Slov Farm* **64**(6), 243-253.
- Jacinto RC, Linhares-Farina G, Sposito Oda S, Zanchi CH, Cenci MS (2015) Influence of 2% chlorhexidine on pH, calcium release and setting time of a resinous MTA-based root-end filling material. *Braz Oral Res* **29**.
- Jimenez-Sanchez MDC, Segura-Egea JJ, Diaz-Cuenca A (2019) Physicochemical parameters - hydration performance relationship of the new endodontic cement MTA Repair HP. *J Clin Exp Dent* **11**(8), e739-e744.
- Manochehrifar H, Parirokh M, Kakooei S *et al.* (2016) The effect of Mineral Trioxide Aggregate mixed with chlorhexidine as direct pulp capping agent in dogs teeth: a histologic study. *Iran Endod J* **11**(4), 320-324.
- Manoil D, Al-Manei K, Belibasakis GN (2020) A systematic review of the root canal microbiota associated with apical periodontitis: lessons from next-generation sequencing. *Proteomics Clin Appl*, e1900060.
- Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M (2018) Prevalence of Candida species in endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *J Endod* **44**(11), 1616-1625 e1619.
- Paiva KBS, Granjeiro JM (2017) Matrix Metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair. *Prog Mol Biol Transl Sci* **148**, 203-303.
- Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* **36**(3), 400-413.
- Poggio C, Beltrami R, Colombo M, Ceci M, Dagna A, Chiesa M (2015) In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. *J Clin Exp Dent* **7**(5), e584-588.
- Polke M, Leonhardt I, Kurzai O, Jacobsen ID (2018) Farnesol signalling in Candida albicans - more than just communication. *Crit Rev Microbiol* **44**(2), 230-243.
- Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A (2017) Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res* **31**, e108.
- Prada I, Mico-Munoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A (2019) Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **24**(3), e364-e372.
- Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR *et al.* (2019) Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clin Oral Investig* **23**(3), 1359-1366.
- Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA (2019) Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J* **52**(5), 604-628.
- Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM *et al.* (2017) Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J* **50** Suppl 2, e31-e39.

Tomas-Catala CJ, Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D *et al.* (2018) Biocompatibility of new pulp-capping materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on human dental pulp stem cells. *J Endod* **44**(1), 126-132.

Torabinejad M, Parirokh M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* **36**(2), 190-202.

Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chavez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M (2020) Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J* **53**(3), 385-391.

Urban K, Neuhaus J, Donnermeyer D, Schafer E, Dammaschke T (2018) Solubility and pH Value of 3 Different Root Canal Sealers: A Long-term Investigation. *J Endod* **44**(11), 1736-1740.

Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M (2014a) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J* **47**(5), 437-448.

Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM, Hungaro-Duarte MA, Tanomaru-Filho M, Camilleri J (2014b) Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dent Mater* **30**(9), 1005-1020.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2014) Dental materials with antibiofilm properties. *Dent Mater* **30**(2), e1-16.

### 3.2 Publicação 2\*

#### **Adição do *Thyme Essential Oil* ao MTA Repair HP e Biodentine. Propriedades físico-químicas, citocompatibilidade, potencial bioativo e atividade antibiofilme**

##### **RESUMO**

**Objetivo:** Este estudo visa avaliar propriedades físico-químicas, citocompatibilidade, potencial bioativo e potencial antimicrobiano de MTA Repair HP (MTAHP) e Biodentine (BIO) associados a 1% de *Thyme Essential Oil* (TEO).

**Material e Metodos:** As propriedades físico-químicas de tempo de presa, solubilidade e pH foram avaliadas para MTAHP, MTAHP/TEO, BIO e BIO/TEO. A citocompatibilidade foi analisada por meio dos testes de methyltetrazolium (MTT) e Vermelho Neutro (VN) após exposição das células Saos-2 ao eluído dos materiais por 24h. A bioatividade foi ponderada pela atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) nos períodos de 1, 3 e 7 dias. A capacidade e induzir formação de nódulos de mineralização foi avaliada pela Coloração com Vermelho de Alizarina (ARS) após 21 dias. A capacidade de inibição de Metaloproteinase de Matriz (MMP) 2 e 9 foi mensurada por fluorescência. A atividade antibiofilme foi avaliada pelo Teste de Contato Direto Modificado (TCDM) sobre biofilme mono- e dual-espécie de *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans* em blocos de dentina. Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey ou Bonferroni, com nível de significância de 5%.

**Resultados:** Não houve diferença significante entre os materiais no tempo de presa. MTAHP e MTAHP/TEO mostraram aumento de massa, enquanto BIO e BIO/TEO mostraram perda de massa. Todos os materiais promoveram alcalinização do meio nos períodos avaliados. Os materiais se mostraram citocompatíveis. Houve aumento da atividade da ALP nos três períodos, com realce no período de 7 dias onde houve os maiores valores. Todos os materiais foram capazes de induzir a produção de nódulos de mineralização. Os materiais mantiveram os níveis de MMP-9, no entanto, diminuíram significativamente a MMP-2. A adição de TEO potencializou a atividade antibiofilme dos cimentos sobre biofilme mono e dual-espécie de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*.

**Conclusão:** A adição de 1% de *Thyme Essential Oil* não modifica as propriedades físico-químicas avaliadas, biocompatibilidade e bioatividade de MTA Repair HP ou Biodentine. Porém, aumenta a atividade antibiofilme dos materiais reparadores.

---

\* Redigido de acordo com as normas do *Clinical Oral Investigation*, periódico para o qual será submetido

**Significância clínica:** Os materiais reparadores são utilizados em regiões que podem apresentar contaminação microbiana. Por tanto as associações de biomateriais com *Thyme Essential Oil* propostas neste estudo podem contribuir para o controle microbiano e sucesso dos tratamentos reparadores.

**Palavras chave:** Biofilmes, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, Materiais Dentários, Endodontia, Thymus (planta).

## INTRODUÇÃO

A presença de micro-organismos está diretamente associada ao insucesso do tratamento endodôntico [1]. Os micro-organismos persistentes mais comumente isolados na endodontia são *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* [1, 2], normalmente organizados em biofilme, formando comunidades microbianas organizadas e resistentes [3]. Desta forma é desejável que os materiais apresentem efeito antibiofilme, visando contribuir com a eliminação de micro-organismos residuais [4, 5]

Diversas substâncias são associadas aos materiais endodônticos para melhorar suas propriedades antimicrobianas [4, 6, 7]. Dentre elas, embora a clorexidina (CLX) tenha mostrado uma melhora na atividade antimicrobiana de cimentos reparadores, tal substância pode impedir a presa dos materiais [8], além de aumentar sua citotoxicidade [9, 10].

Substâncias antimicrobianas naturais, como os Óleos Essenciais, representam uma alternativa para associação aos materiais endodônticos e reparadores, por não produzirem desenvolvimento de resistência bacteriana [11, 12]. Os óleos essenciais (OEs) apresentam potencial como agentes preventivos ou terapêuticos contra doenças bucais, por sua eficácia contra microorganismos orais [12-14]. O óleo essencial de Tomilho, ou *Thyme Essential Oil* (TEO) é composto principalmente por Timol (20%) e Carvacrol (40%). O Timol é um monoterpeneo [15] que apresenta propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas de amplo espectro [16, 17], além de ação antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* [18]. O Carvacrol é um fenol monoterpênico, com propriedades antibacteriana e antiviral [19], efetivo na prevenção e tratamento de doença periodontal, e capaz de reduzir o crescimento bacteriano na superfície de implantes dentários [20].

Cimentos reparadores endodônticos à base silicato de cálcio apresentam propriedades físico-químico e biológicas adequadas, além de capacidade de estimular a resposta do tecido pulpar e periodontal [21, 22]. Desta forma, são indicados para selamento de perfurações

radiculares, capeamento pulpar, pulpotomias, apexificação, apicigênese e obturação retrógrada [23].

Biodentine (Septodont) é composto por silicato tricálcico e dicálcico, carbonato de cálcio, e óxido de zircônio como radiopacificador; sendo misturado ao líquido que contém água, policarboxilato e cloreto de cálcio [24, 25]. MTA Repair HP (Angelus) é composto por pó com silicato de cálcio, óxido de cálcio, e tungstato de cálcio como radiopacificador, e líquido com água e agente plastificante. Embora as propriedades físico-químicas e biológicas destes materiais sejam consideradas adequadas [26-28], os cimentos reparadores à base de silicato de cálcio demonstram atividade antimicrobiana limitada [29].

Ainda não foi relatada na literatura a associação de biomateriais com OEs. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-químicas, biocompatibilidade e potencial antibiofilme da adição de *Thyme Essential Oil* aos cimentos reparadores endodônticos MTA Repair HP e Biodentine. A hipótese nula foi de que não haveria diferença nas propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade e potencial antibiofilme para a associação de TEO a MTAHP ou BIO.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho os cimentos foram manipulados segundo as recomendações dos fabricantes, nas seguintes proporções (Tabela 1).

**Tabela 1** – Materiais, fabricantes e proporções utilizadas

Material	Fabricante	Proporção		
		Pó	Líquido	Thyme oil*
MTAHP	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	1 g	300 µL	—
MTAHP/TEO 1%		1 g	300 µL	14,7 µL
BIO	Septodont, Saint Maur des Fossés, France	1 g	8 gotas	—
BIO/TEO 1%		1 g	8 gotas	14,7 µL

MTAHP – MTAP Repair HP; BIO – Biodentine; TEO – Thyme Essential Oil. \* Sigma-Aldrich Brasil Ltda.SP.

## AValiação DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

### TEMPO DE PRESA

A avaliação do tempo de presa (n=6) foi realizado baseado na ISO 6876:2012. Anéis metálicos de 10mm de diâmetro interno e 1mm de altura foram utilizados. Para determinar a

presa foi utilizada agulha de Gilmore com massa de  $100 \pm 0,5\text{g}$  e diâmetro de  $2 \pm 0,1\text{mm}$  apoiada perpendicularmente sobre a superfície do cimento. Este processo foi repetido até a agulha não deixar mais marca na superfície do cimento. Os materiais foram manipulados segundo as recomendações dos fabricantes, MTA Repair HP foi espatulado durante 40 segundos; Biodentine foi agitado em amalgamador por 30 segundos. O tempo de presa foi aferido desde o preenchimento do material nos anéis até a agulha deixar de marcar na superfície do cimento. Durante o período de avaliação os materiais foram mantidos na estufa a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e  $95\% \pm 5\%$  de umidade; a agulha foi limpa antes de cada aferição.

### ***SOLUBILIDADE***

O teste de solubilidade ( $n=5$ ) foi realizado com corpos de prova de 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, e com um fio de nylon impermeável (6,5cm) no meio do material, armazenados em estufa ( $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e  $95\% \pm 5\%\text{UR}$ ), durante 24h [30]. Os corpos de prova foram colocados em dessecador a vácuo, até obter estabilidade de massa. Depois foram suspensos em 7,5 mL de água destilada e deionizada, sem contato entre o material e a superfície interna do recipiente; mantidos em estufa ( $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 7 dias. Os corpos de prova foram lavados com água destilada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final. A aferição de massa foi realizada em balança de precisão HM-200 (A&D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA). A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa inicial.

### ***pH***

Para o teste de pH, tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material ( $n=10$ ). Cada tubo foi imerso em 10 mL de água deionizada cujo pH foi aferido previamente e mantido na estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante os períodos experimentais, o grupo controle foi água destilada e deionizada. Transcorrido cada período de avaliação, 1, 3, 7, 14 e 21 dias, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos. A aferição do pH foi realizada em triplicata, com pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) a  $25^\circ\text{C}$  de temperatura ambiente.

### **AValiação da Citotocompatibilidade e Potencial Bioativo**

Foram utilizadas células humanas “osteoblast-like cells” da linhagem SAOS-2 (ATCC HTB-85), cultivadas em frascos T-75 (Jet Biofil, Guangzhou, China), contendo DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY,

EUA), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), até a confluência. Os cimentos foram manipulados (Tabela 1) e colocados no fundo do poço de placas de cultura de 12 poços (Jet Biofil). As placas foram mantidas a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>; após 24h as placas foram expostas à luz ultravioleta (UV) [31], e os poços preenchidos com 5mL de DMEM sem soro (meio modificado de Dulbecco; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram mantidas a 37°C por 24h, com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> (ISO 10993-5/2005).

### ***Ensaio de Viabilidade celular***

A viabilidade celular foi avaliada por brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e Vermelho Neutro (VN) [32]. Células Saos-2 foram plaqueadas (1 x 10<sup>5</sup> células/mL) em placas de 96 poços (Jet Biofil) contendo DMEM suplementado com 10% de SFB (SFB: Gibco, Life Technologies), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas por 24h a 37°C, 5% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> antes de exposição aos eluídos dos materiais. As células foram expostas aos eluídos dos cimentos em diluições 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30; como controle negativo foi utilizado DMEM sem soro e como controle positivo Dimetilsilfóxido (DMSO). Após esse período, o meio foi substituído por 100 µL de solução de MTT 5mg/mL (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 3h. Foi adicionado isopropanol (100µL) acidificado a 0,04N (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi medida a 570nm em espectrofotômetro (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). Para o teste de VN, os eluídos foram substituídos por 0,1µL de DMEM contendo VN 50µL/mL (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 3h. O produto colorimétrico foi solubilizado em solução (50% de etanol e 1% de ácido acético) (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro a 570nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada grupo experimental, e a média de cada experimento foi usada na análise estatística (n = 3 por grupo).

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO**

### ***Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)***

A atividade enzimática da fosfatase alcalina foi determinada com a utilização de kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As Saos-2 foram plaqueadas (5 x 10<sup>4</sup> células/mL) em placas de cultura de 96 poços. As células foram cultivadas por 24h a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram expostas aos eluídos dos materiais na diluição de 1:15, por um, três e sete dias. Após cada período experimental, o conteúdo dos

poços será removido e a monocamada celular será lavada com 200  $\mu$ L de PBS 1X. Em seguida, serão acrescentados 200  $\mu$ L de uma solução de Lauril sulfato de sódio/água destilada 1% (Sigma-Aldrich) a cada poço. Cada amostra foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) contendo substrato e tampão, e foram adicionados 500  $\mu$ L de reagente colorido. A densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro a 590nm. Três experimentos independentes foram realizados em sextuplicata para cada grupo experimental e controle (n = 3 / grupo). Os dados foram expressos como atividade ALP normalizada pela quantidade de proteínas totais no respectivo intervalo de tempo de cultura (DO = 570 nm).

### ***Coloração com vermelho de Alizarina (ARS)***

Para avaliar o potencial bioativo dos materiais reparadores e associações, as células Saos-2 foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/mL) em placas de cultura de 24 poços. Durante 21 dias, o meio de cultura DMEM osteogênico (DMEM 10% SFB; 100 IU/mL penicilina; 100 mg/mL estreptomicina; 0,023 g/mL  $\beta$ -glicerolfosfato; 0,055 mg/mL ácido ascórbico – Sigma Aldrich), com os eluídos dos cimentos e controles, foi renovado a cada 2 dias. Após este período, as células foram fixadas com 10% de paraformaldeído, lavadas e incubadas com 1 mL de AlizarinRed S – ARS 40 mM (2%- pH 4.1) (Sigma-Aldrich) por 3 minutos. Os campos foram fotografados (Canon EOS-1D, Canon Inc, Tokyo, Japan) e, em seguida, a mineralização foi quantificada pela dissolução dos nódulos com 0,5 mL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridínio (Sigma-Aldrich). Três alíquotas de 100  $\mu$ L da ressuspensão de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda. Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3) e repetido três vezes em tempos independentes.

### ***Avaliação da Atividade anti-MMP***

Os ensaios de atividade anti-MMP [33] foram realizados com MMP-2 e MMP-9 recombinante, com kits fluorométricos de MMP (SensoLyte assay kits; AnaSpec, Fremont, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Os eluídos dos materiais (tabela 1), e as MMP ativadas (pré-incubadas com 10mM de amino-phenyl mercuric acetate (APMA)) foram misturados com substrato peptídico de transferência de energia de ressonância de fluorescência 5-FAM / QXLTM 520 (FRET) em tampão de ensaio usando placas de 96 poços. Para o peptídeo FRET intacto, a fluorescência de 5-FAM foi anulada por QXL 520. Após a clivagem em 2 fragmentos separados por MMPs, a fluorescência de 5-FAM foi recuperada e monitorada em comprimentos de onda de excitação/emissão (490/520nm, respectivamente). Após 1 h de

incubação, o sinal de fluorescência foi lido por um leitor de microplacas (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EUA) e expresso como unidades fluorescentes relativas (RFU) MMPs ativas diluídas foram usadas como controle positivo; O Ilomastat 25 $\mu$ M foi usado como controle inibidor, e os controles do composto de teste sem MMP foram adicionados para avaliar sua autoimunofluorescência. Foram realizadas seis amostras de cada grupo para cada ensaio de MMP.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Telstar Technologies, S.L.–BV 100, Terrassa, Espanha). Foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Cultura pura *E. faecalis* foi cultivada *overnight* em Tryptic Soy Broth-TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) e de *C. albicans* cultivada em Sabouraud Dextrose Broth – SB (Difco, Detroit, MI, EUA). Os inóculos foram preparados a partir de suspensões microbianas preparadas e ajustadas a uma densidade óptica equivalente a  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, tanto para os biofilmes mono-espécie como para os dual-espécies.

#### ***Atividade antibiofilme: teste de contato direto modificado (TCDM)***

Blocos de dentina esterilizados medindo 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura) foram submersos em TSb (2 mL) contendo 1% do inóculo ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) nos biofilmes de *E. faecalis*, com trocas do meio de cultura total a cada 48 horas. Os biofilmes de *C. albicans* e os biofilmes com as duas cepas associadas, foram induzidos utilizando meio de cultura RPMI-1640 (+L-glutamine, +25mM HEPES buffer, -sodium bicarbonate) (Gibco, R 23400-013 1L, Life Technologies, USA) e 28 g de glicose, com inóculos na concentração citada acima e trocas a cada 24 h. Os três tipos de biofilmes foram desenvolvidos em Placas de cultura de 24 poços. As placas foram mantidas em ambiente microaerófilo por 14 dias para o biofilme mono-espécie de *E. faecalis*, e em aerofilia por 5 dias para os biofilmes mono-espécie de *C. albicans* e dual de *E. faecalis/C. albicans*. Todos biofilmes foram mantidos em incubadora de bancada shaker (Modelo 0816M28, Quimis aparelhos científicos LTDA, Diadema, SP, Brasil) a 37°C com 80rpm. Após os períodos de indução, os eluídos dos materiais foram preparados, em concentração de 50mg/mL. Os materiais foram manipulados segundo as proporções da Tabela 1, colocados em tubo falcon de 15 mL com 10 mL de água destilada e imediatamente misturados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), mantidos em estufa a 37°C

durante 48 h. Em seguida, os blocos de dentina ( $n = 6$ ) com biofilme formado foram lavados uma vez em PBS para remoção de células microbianas não aderidas e colocados individualmente em um eppendorf de 0,5 mL com 400 $\mu$ L de eluído dos materiais, os quais permaneceram em contato por 15 h, para o controle foi utilizado água destilada. Após este período, cada bloco de dentina foi colocado em um microtubo contendo 1 mL de solução salina e pérolas de vidro e foram agitados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil). Posteriormente, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento de três alíquotas de 20 $\mu$ L de cada uma das suspensões, em placas de Petri contendo meio de cultura de Tryptic Soy Agar (TSA), para *E. faecalis* do biofilme mono-espécie; Sabouraud Dextrose Agar (SBA), para *C. albicans* do biofilme mono- e dual-espécie e m-Enterococcus Agar para isolamento de *E. faecalis* do biofilme dual-espécie. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Foi realizada contagem de UFC/mL e os dados foram submetidos à transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ).

### **Análise estatística**

A normalidade dos dados foi testada usando o teste Shapiro-Wilk. A análise estatística dos testes físico-químicos e ARS foi realizada com os testes paramétricos ANOVA e Tukey. A viabilidade celular e a atividade da ALP e inibição de MMP foram analisadas pelos testes estatísticos ANOVA e Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em  $P < .05$ .

## **RESULTADOS**

### Testes físico-químicos

Os materiais avaliados puros e em associação não mostraram diferenças significantes no tempo de presa ( $P > .05$ ). Não houve diferença significativa entre BIO e BIO/TEO que mostraram perda de massa ( $P > .05$ ). MTAHP e MTAHP/TEO ganharam massa sem diferença significate ente eles ( $P < .05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Tempo de presa e solubilidade (média e desvio padrão) observados para os materiais

	<b>MTAHP</b>	<b>MTAHP/TEO</b>	<b>BIO</b>	<b>BIO/TEO</b>
Tempo de presa (min)	32.50 (1.97) <sup>a</sup>	35.67 (4.97) <sup>a</sup>	34.17 (2.64) <sup>a</sup>	34.17 (1.83) <sup>a</sup>
Solubilidade (%)	-2.11 (0.70) <sup>b</sup>	-3.10 (2.32) <sup>b</sup>	4.32 (0.11) <sup>a</sup>	3.88 (0.10) <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < .05$ )

Durante todos os períodos avaliados todos os materiais estudados tiveram capacidade de alcalinização e mostraram diferença significativa com o grupo controle ( $P < .05$ ). Destacou-se MTAHP nos períodos de 24 e 72 h com os maiores valores de pH ( $P < .05$ ). Não houve diferenças significativa entre os materiais nos outros períodos, 7, 14 e 21 dias ( $P > .05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores de pH (media e desvio padrão) observados para os materiais nos diferentes períodos

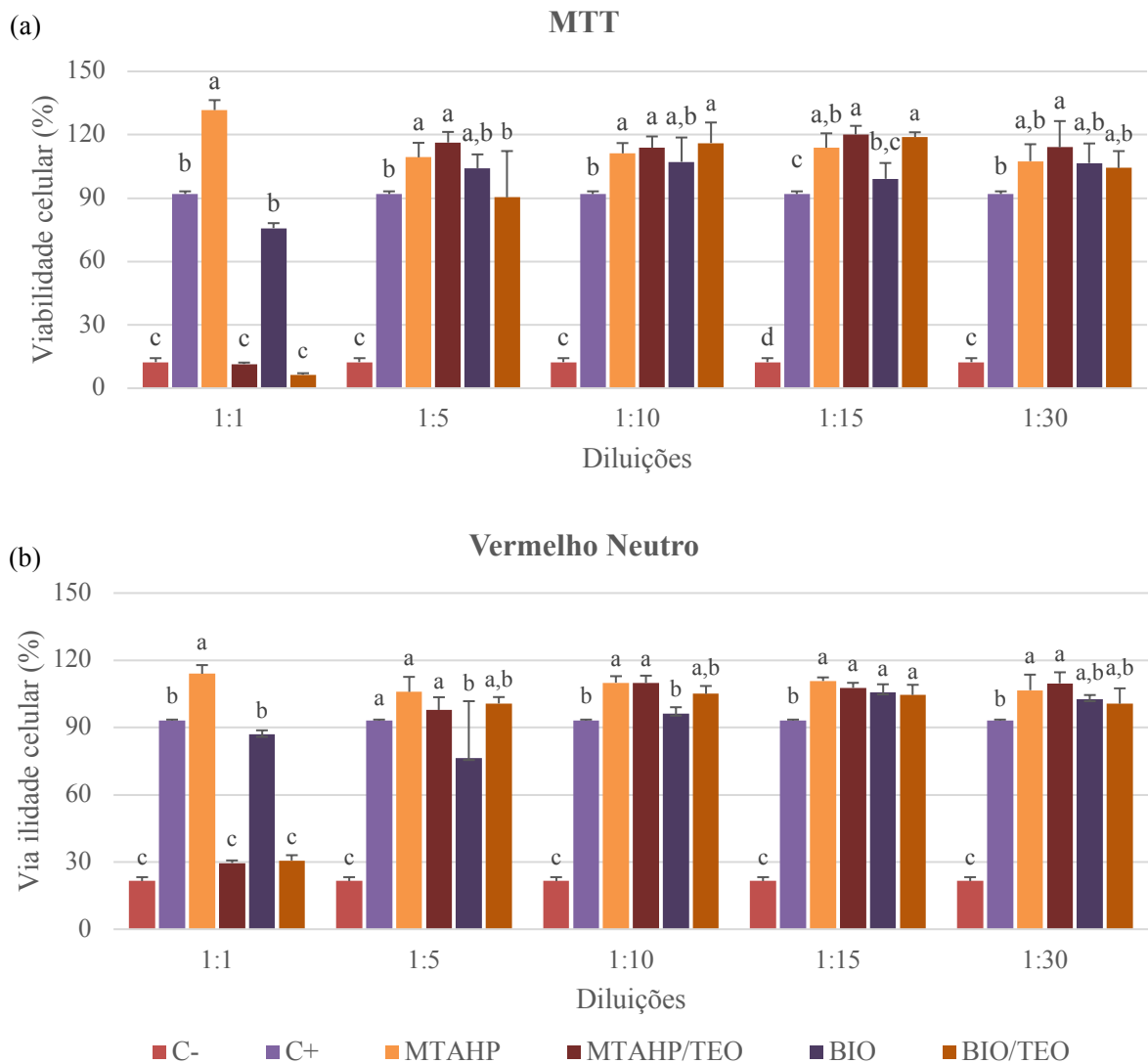
	<b>MTAHP</b>	<b>MTAHP/TEO</b>	<b>BIO</b>	<b>BIO/TEO</b>	<b>Controle</b>
24 h	11.12 (0.06) <sup>a</sup>	10.72 (0.38) <sup>a,b</sup>	10.07 (0.38) <sup>c</sup>	10.55 (0.21) <sup>b,c</sup>	6.43 (0.48) <sup>d</sup>
72 h	10.33 (0.56) <sup>a</sup>	9.85 (0.19) <sup>a,b</sup>	9.55 (0.65) <sup>b</sup>	9.99 (0.46) <sup>a,b</sup>	6.51 (0.31) <sup>c</sup>
7 dias	9.92 (0.77) <sup>a</sup>	9.01 (1.08) <sup>a</sup>	9.85 (0.52) <sup>a</sup>	9.75 (0.76) <sup>a</sup>	6.14 (0.36) <sup>b</sup>
14 dias	9.64 (0.74) <sup>a</sup>	8.33 (0.78) <sup>b</sup>	9.24 (1.09) <sup>a,b</sup>	9.77 (1.21) <sup>a</sup>	6.42 (0.28) <sup>c</sup>
21 dias	8.99 (0.63) <sup>a</sup>	8.76 (0.84) <sup>a</sup>	8.95 (1.02) <sup>a</sup>	9.29 (1.12) <sup>a</sup>	6.47 (0.41) <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < .05$ )

#### Viabilidade Celular

O teste de MTT revelou que MTAHP e BIO com ou sem TEO promoveram viabilidade celular maior que o controle positivo e controle negativo ( $P < .05$ ) nas diluições 1:5, 1:10, 1:15 e 1:30. No entanto, na diluição 1:1 MTAHP/TEO e BIO/TEO mostraram viabilidade mais baixa que o controle positivo ( $P < .05$ ), sendo semelhantes ao controle negativo (Fig. 1a).

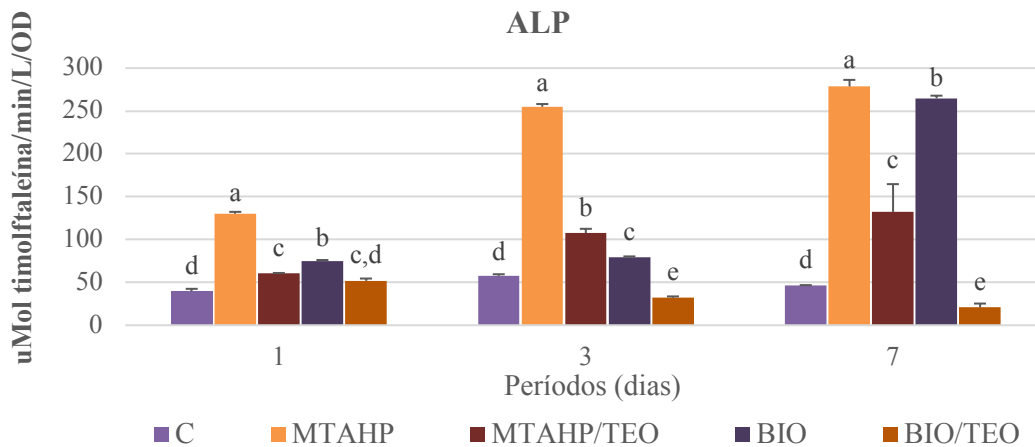
O teste VN mostrou que nas diluições 1:10, 1:15 e 1:30 MTAHP e BIO, assim como a associação deles com TEO não diminuíram a viabilidade celular, quando comparado com o controle ( $P > .05$ ). Na diluição 1:5 o BIO foi o material que mostrou menor citocompatível, comparado com o controle ( $P < .05$ ); e na primeira diluição 1:1, a adição de TEO aos materiais aumentou a citotoxicidade deles, quando comparados com o controle e com os cimentos reparadores puros ( $P < .05$ ) (Fig. 1b).



**Figura 1** - Viabilidade celular de Saos-2 avaliada pelos ensaios MTT (a) e VN (b), após 24 horas de exposição aos eluídos dos cimentos MTAHP, MTAHP/TEO, BIO, BIO/TEO nas diluições de 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30, meio de cultura-DMEM sem soro (controle positivo), Dimetilsulfóxido-DMSO (controle negativo). Barras com letras diferentes representam diferenças significantes entre os eluídos de cimento (em cada diluição) e o controle; MTAHP, MTA Repair HP; TEO, Óleo essencial de Tomilho; BIO, Biodentine; C+, controle positivo; C-, controle negativo.

#### Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

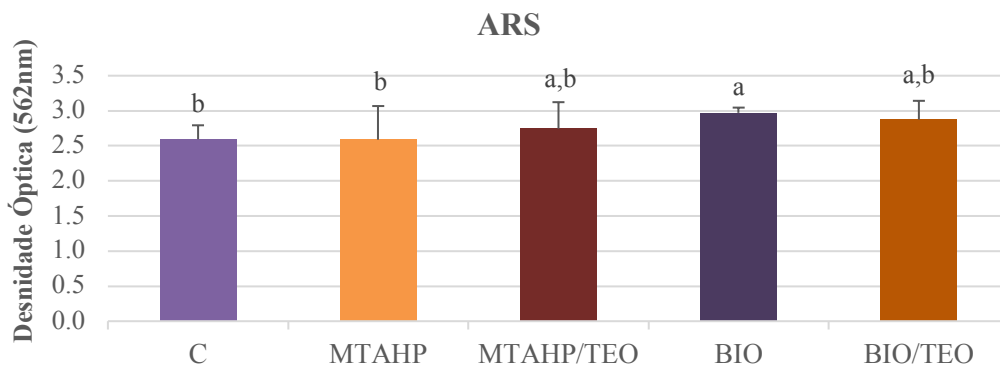
A atividade de ALP foi maior para o grupo MTAHP nos três períodos avaliados, 1, 3 e 7 dias, mostrando diferença significante ( $P > .05$ ) com o controle e os outros grupos. MTAHP, MTAHP/TEO e BIO evidenciaram aumento na atividade da ALP ao longo do tempo. BIO/TEO teve a menor atividade de ALP ( $P > .05$ ) que foi decrescente ao longo do tempo (Fig.2).



**Figura 2** – Atividade de ALP de células Saos-2 após exposição a MTAHP, MTAHP/TEO, BIO, BIO/TEO na diluição 1:15 e meio de cultura sem soro (controle) durante os períodos de 1, 3 e 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas em cada período. MTAHP, MTA Repair HP; TEO, Thyme Essential Oil; BIO, Biodentine; C, Controle

#### Coloração com vermelho de Alizarina (ARS)

BIO induziu mais nódulos de mineralização comparado ao controle ( $P < .05$ ). MTAHP, MTAHP/TEO, e BIO/TEO mostraram bioatividade semelhante ao controle ( $P > .05$ ).

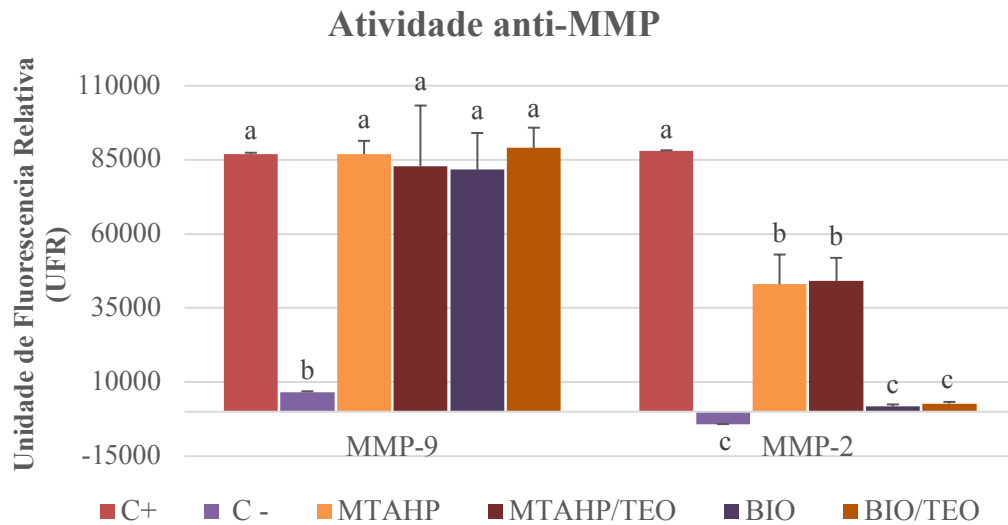


**Figura 3** – Coloração com alizarina (ARS), análise estatística realizada após 21 dias de exposição do meio de cultura osteogênico. Todos os materiais induziram a produção de nódulos mineralizados. Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os eluídos de cimento e o controle negativo. MTAHP, MTA Repair HP; TEO, Thyme Essential Oil; BIO, Biodentine; C, Controle.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-MMP

MTAHP, MTAHP/TEO, BIO e BIO/TEO mantiveram os níveis de MMP-9, sem diferença significativa com o controle positivo (C+) ( $P > .05$ ), e evidenciando diferenças significativas com o controle inibição (C-) ( $P < .05$ ) (fig. 4).

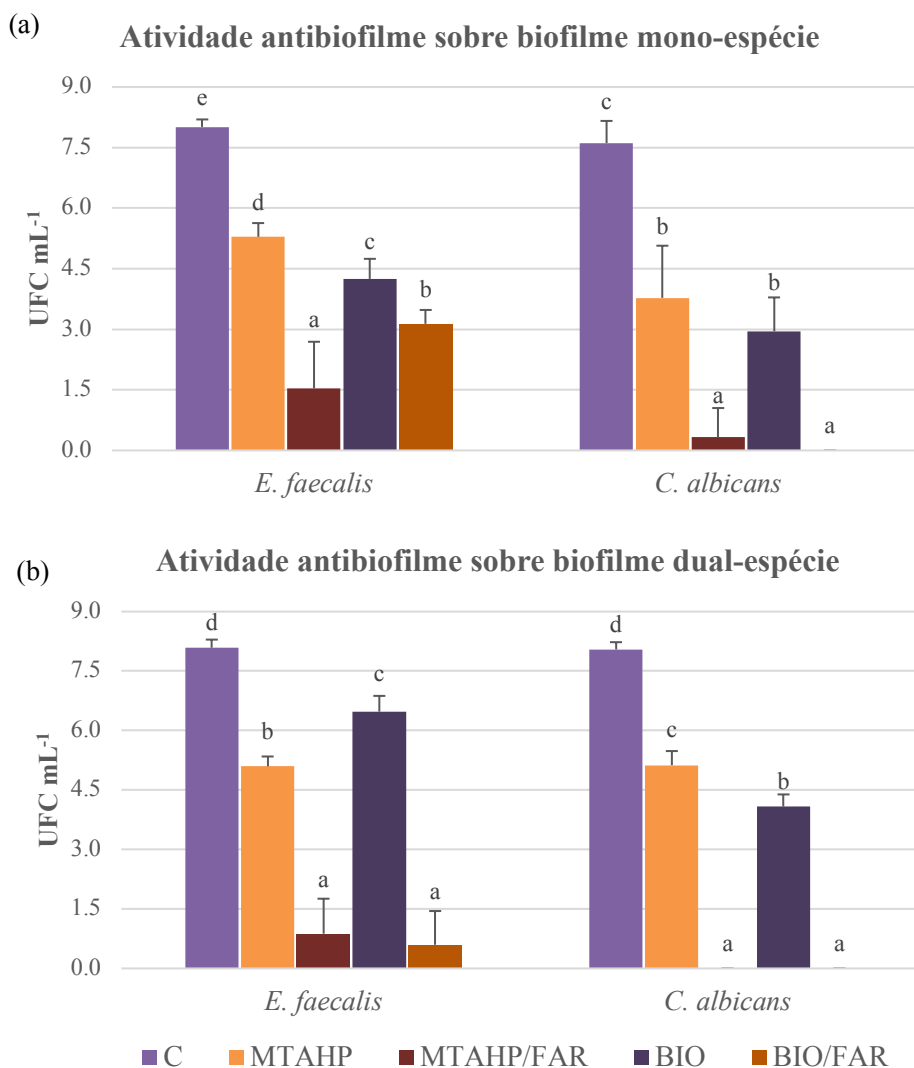
Os níveis de MMP-2 foram diminuídos pelos grupos BIO e BIO/TEO, mostrando-se semelhantes ao controle inibição ( $P > .05$ ). MTAHP e MTAHP/TEO mostrou atividade de anti-MMP-2, com diferença significativa com o controle positivo e inibição ( $P < .05$ ) (fig. 4).



**Figura 4** – Atividade anti-MMP (Metaloprotease). Inibição de Matriz de Metaloprotease 9 e 2, por MTAHP, MTAHP/TEO, BIO, BIO/TEO na diluição 1:15 em Unidade de Fluorescência Relativa (UFR). MMP ativa diluída como controle positivo (C+), Ilomastat 25 $\mu$ M como controle inibição (C-). MTAHP, MTA Repair HP; TEO, Thyme Essential Oil; BIO, Biodentine; C+, Controle positivo; C-, Controle negativo.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME POR TCDM

A adição de TEO 1% aos cimentos reparadores MTAHP e BIO potencializou a atividade antimicrobiana dos materiais sobre biofilme mono- e dual-espécie de *E. faecalis* e/ou *C. albicans* ( $P < .05$ ). MTAHP/TEO se mostrou mais efetivo na redução de UFC mL<sup>-1</sup> de sobre o biofilme mono-espécie de *E. faecalis* ( $P < .05$ ). MTA/TEO e BIO/TE foram efetivos na redução de UFC mL<sup>-1</sup> de *C. albicans* no biofilme mono e dual-espécie e de *E. faecalis* dual-espécie ( $P < .05$ ).



**Figura 5** – Atividade antibiofilme por Teste de Contado Direto Modificado (TCDM) sobre biofilme mono-espécie (a) e biofilme dual-espécie (b), após 15 horas de exposição aos eluídos dos cimentos MTAHP, MTAHP/TEO, BIO, BIO/TEO na concentração de 50mg/mL, e água destilada (controle). Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os cimentos e o controle (sobre cada micro-organismo); MTAHP, MTA Repair HP; TEO, Thyme Essential Oil; BIO, Biodentine; C, controle.

## DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, a hipótese nula foi parcialmente aceita, pois, MTAHP e BIO associados a TEO foram semelhantes aos materiais puros em relação às propriedades físico-químicas (tempo de presa, solubilidade e pH), bem como nas avaliações da citotoxicidade e expressão de MMP.

Com relação às propriedades físico-químicas, a adição de TEO não alterou o tempo de presa de MTAHP e BIO, manteve a capacidade de alcalinização do meio dos cimentos e não modificou a solubilidade dos materiais. BIO e BIO/TEO perderam massa, enquanto MTAHP e MTAHP/TEO ganharam massa. Por outro lado, é importante mencionar que esta associação

tornou a consistência dos cimentos mais plástica, melhorando a consistência final para aplicação clínica de ambos materiais.

Várias associações foram propostas ao MTA convencional, a fim de melhorar sua consistência arenosa. Entre essas substâncias, a associação de propilenoglicol mostrou melhorar escoamento e consistência de MTA, entretanto, ocorreu um aumento no seu tempo de presa [34]. Solução salina, lidocaína, gel de NaOCl e de gluconato de clorexidina, gelatina K-Y e  $\text{CaCl}_2$  também foram avaliados ao serem adicionados na manipulação de MTA, mostrando alterações no tempo de presa e na resistência mecânica dos materiais [35]. Desta forma, a associação de uma substância natural que possa melhorar a consistência e aplicação clínica de cimentos reparadores sem alterar suas propriedades físico-químicas mostrou resultados favoráveis no presente estudo.

Em nosso estudo, o tempo de presa não variou após adição de TEO, no entanto foi maior que o especificado pelos fabricantes. A avaliação do tempo de presa é importante pois tempo de presa muito curto pode estar associado a impossibilidade de correta acomodação do material. Por outro lado, um tempo de presa muito longo poderia aumentar o tempo clínico, além de ter uma relação direta com a solubilidade do material, o que pode comprometer a resistência mecânica e favorecer a infiltração [36] e porosidade, permitindo penetração bacteriana e de seus produtos [23].

A capacidade de alcalinização dos cimentos hidráulicos está associada a maior bioatividade osteogênica e atividade antibacteriana dos materiais [37, 38], sendo o resultado da hidratação de silicatos que formam hidróxido de cálcio, o qual se dissocia alcalinizando o meio [37]. O incremento de TEO em 1% aos cimentos reparadores MTAHP e BIO, não alterou a capacidade de alcalinização dos materiais.

Os cimentos reparadores estudados, MTA Repair HP e Biodentine, apresentam propriedades físico-químicas e biológicas adequadas para uso clínico [26-28, 39]. No entanto, a limitada capacidade antimicrobiana destes cimentos é conhecida. O aumento da resistência bacteriana tem conduzido ao uso de substâncias naturais visando ação antimicrobiana [40]. TEO apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante, anticarcinogênese, antiinflamatória e antiespasmódica, além de potencial imunomodulador e baixa toxicidade [40]. TEO foi usado como substituto do eugenol no preparo de pasta endodôntica para obturação de dentes decíduos, e demonstrou maior efetividade contra *Staphilococcus aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* [41].

Nosso estudo demonstra que a adição de TEO na proporção de 1% aos cimentos reparadores endodônticos MTAHP e BIO, aumenta significativamente a ação antimicrobiana,

sendo efetivos na redução de UFC de biofilmes mono e dual-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, dois micro-organismos diretamente relacionados a infecções endodônticas primárias e secundárias [42]. MTAHP mostrou potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, e *C. albicans* [43]; sendo que esta ação antimicrobiana foi relacionada à liberação de íons hidroxila e pH alcalino do material. Biodentine mostrou capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans* em 1 e 28 dias e *Lactobacillus casei* em 28 dias de contato [38]. No entanto, estes estudos não foram realizados sobre biofilme. As infecções endodônticas são mediadas por biofilmes bacterianos, que são comunidades microbianas altamente organizadas e complexas [3]. Assim, os materiais endodônticos devem ser testados sobre biofilmes, sendo na maioria das vezes os estudos utilizando biofilme mono-espécie, geralmente sobre *E. faecalis*, seguido de *Pseudomonas aureginosa* e *C. albicans*. Por outro lado, biofilmes dual e multi-espécie apresentam maior resistência ao tratamento antimicrobiano. Entretanto, ainda não há estudos sobre biofilme dual-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans* [5].

A biocompatibilidade dos cimentos reparadores é essencial. A adição de TEO a 1% ao MTAHP ou BIO manteve a citocompatibilidade dos materiais. Na diluição utilizada para os testes de bioatividade (1:15), MTAHP, MTAHP/TEO, BIO e BIO/TEO aumentaram a viabilidade celular. MTAHP foi lançado no mercado em 2016, e embora ainda haja poucos estudos avaliando este material, foi mostrada sua citocompatibilidade em células-tronco da polpa dentária humana [44], assim como para fibroblastos [28], além de MTA HP permitir a proliferação e migração celular [44]. BIO é comercializado desde 2012, sendo que muitos estudos demonstram sua biocompatibilidade, mostrando-se citocompatível para células-tronco da polpa dentária humana [44] e do ligamento periodontal [45], aumentando o potencial de proliferação, migração, adesão e diferenciação celular.

Por outro lado, a citocompatibilidade de TEO foi avaliada *in vitro* sobre células epiteliais de traqueia de porco e queratinócitos [46, 47], mostrando que concentrações de 0,156% de TEO diminui a viabilidade celular. Entretanto, em concentrações mais baixas TEO não afetou a viabilidade dessas células epiteliais [46]. Além disso, o efeito sobre queratinócitos em concentrações abaixo de 0,28 mg/mL de TEO foi aumentar a proliferação celular e estimular sua atividade [47].

A avaliação da atividade de ALP possibilita determinar o potencial dos materiais para induzir formação de tecido mineralizado. A expressão de ALP aumenta conforme o período de contato de Saos-2 com os materiais à base de silicato de cálcio [32], coincidindo com o

comportamento dos materiais testados neste trabalho, com exceção de BIO/TEO, que diminuiu a atividade da ALP nos três períodos avaliados.

Cimentos reparadores endodônticos induzem a formação de nódulos de mineralização, identificados pela coloração ARS [32]. Embora a adição de TEO tenha diminuído a viabilidade e bioatividade celular, as associações mantiveram a capacidade de induzir diferenciação e proliferação celular [23].

Embora não haja estudos do efeito dos materiais de silicato de cálcio sobre as MMP, é conhecido que as MMP regulam processos de formação de tecido mineralizado, sendo capazes de estimular ou inibir a resposta tecidual [48]. MTAHP e BIO e suas modificações com TEO mantiveram a expressão de MMP-9 e inibiram a de MMP-2, sendo que a ausência de MMP-9 tem sido associada a inibição de mineralização, e o aumento de MMP-2 está relacionado a maior inflamação [49]. A resposta das MMP relacionadas com os materiais reparadores pode favorecer o processo de reparo de tecido mineralizado.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição de 1% de *Thyme Essential Oil* aos cimentos reparadores MTA Repair HP ou Biodentine, não prejudica as propriedades físico-químicas e biológicas desses materiais, além de potencializar a capacidade antibiofilme sobre *E. faecalis* e/ou *C. albicans*. Estas associações propostas apresentam potencial para o uso clínico.

## REFERÊNCIAS

- Prada I, Mico-Munoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Collado-Castellano N and Manzano-Saiz A (2019) Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 24:e364-e372. doi: 10.4317/medoral.22907
- Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P and Manfredi M (2018) Prevalence of *Candida* species in endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of endodontics* 44:1616-1625 e9. doi: 10.1016/j.joen.2018.07.016
- Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A and Cheung GSP (2017) Biofilms in endodontics-current status and future directions. *International journal of molecular sciences* 18. doi: 10.3390/ijms18081748
- Wang Z, Shen Y and Haapasalo M (2014) Dental materials with antibiofilm properties. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 30:e1-16. doi: 10.1016/j.dental.2013.12.001
- Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG and Meire MA (2019) Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *International endodontic journal* 52:604-628. doi: 10.1111/iej.13050
- Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B, Gharechahi M and Mashadi NA (2012) The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dental research journal* 9:466-71.
- Nikhil V, Madan M, Agarwal C and Suri N (2014) Effect of addition of 2% chlorhexidine or 10% doxycycline on antimicrobial activity of biodentine. *Journal of conservative dentistry : JCD* 17:271-5. doi: 10.4103/0972-0707.131795
- Jacinto RC, Linhares-Farina G, Sposito Oda S, Zanchi CH and Cenci MS (2015) Influence of 2% chlorhexidine on pH, calcium release and setting time of a resinous MTA-based root-end filling material. *Brazilian oral research* 29. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0036
- Yavari HR, Shahi S, Rahimi S, Shakouie S, Roshangar L, Mesgari Abassi M and Sattari Khavas S (2009) Connective tissue reaction to white and gray MTA Mixed with distilled water or chlorhexidine in rats. *Iranian endodontic journal* 4:25-30.
- Manochehrifar H, Parirokh M, Kakooei S, Oloomi MM, Asgary S, Eghbal MJ and Mashhadi Abbas F (2016) The effect of Mineral Trioxide Aggregate mixed with chlorhexidine as direct pulp capping agent in dogs teeth: a histologic study. *Iranian endodontic journal* 11:320-324. doi: 10.22037/iej.2016.12
- Hassan ST, Majerova M, Sudomova M and Berchova K (2015) Antibacterial activity of natural compounds - essential oils. *Ceska a Slovenska farmacie : casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti* 64:243-53.
- Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS and Baroudi K (2015) Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 5:335-40. doi: 10.4103/2231-0762.165933
- Shakya VK, Luqman S, Tikku AP, Chandra A and Singh DK (2019) A relative assessment of essential oil of *Chrysopogon zizanioides* and *Matricaria chamomilla* along with calcium hydroxide and chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis* in ex vivo root canal models. *Journal of conservative dentistry : JCD* 22:34-39. doi: 10.4103/JCD.JCD\_69\_18

Guandalini Cunha B, Duque C, Sampaio Caiaffa K, Massunari L, Arague Catanoze I, Dos Santos DM, de Oliveira SHP and Guiotti AM (2019) Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Archives of oral biology* 109:104577. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104577

Mota ML, Lobo LT, Costa JM, Costa LS, Rocha HA, Rocha e Silva LF, Pohlit AM and Neto VF (2012) In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta medica* 78:658-64. doi: 10.1055/s-0031-1298333

Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ, Montenegro D, Heukelbach J, Rao VS and Brito GA (2007) Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 40:349-56. doi: 10.1590/s0100-879x2007000300010

Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA and Sattelle DB (2003) Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British journal of pharmacology* 140:1363-72. doi: 10.1038/sj.bjp.0705542

de Castro RD, de Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Costa EM and Cavalcanti AL (2015) Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC complementary and alternative medicine* 15:417. doi: 10.1186/s12906-015-0947-2

Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, Akpulat HA, Sahin F and Sokmen A (2004) In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:3309-12. doi: 10.1021/jf049859g

Ciandrini E, Campana R, Federici S, Manti A, Battistelli M, Falcieri E, Papa S and Baffone W (2014) In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clinical oral investigations* 18:2001-13. doi: 10.1007/s00784-013-1179-9

Garcia L da F, Huck C, Scardueli CR and de Souza Costa CA (2015) Repair of bone defects filled with new calcium aluminate cement (EndoBinder). *Journal of endodontics* 41:864-70. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.029

Torabinejad M and Parirokh M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part II: leakage and biocompatibility investigations. *Journal of endodontics* 36:190-202. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.010

Parirokh M and Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of endodontics* 36:400-13. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.009

Laurent P, Camps J and About I (2012) Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *International endodontic journal* 45:439-48. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01995.x

Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, Opsahl Vital S, Chaussain C and Boukpepsi T (2012) Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *Journal of dental research* 91:1166-71. doi: 10.1177/0022034512460833

- Galarca AD, Da Rosa WLO, Da Silva TM, da Silveira Lima G, Carreno NLV, Pereira TM, Aguirre Guedes O, Borges AH, da Silva AF and Piva E (2018) Physical and biological properties of a High-Plasticity Tricalcium Silicate cement. *BioMed research international* 2018:8063262. doi: 10.1155/2018/8063262
- Guimaraes BM, Prati C, Duarte MAH, Bramante CM and Gandolfi MG (2018) Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitacem. *Journal of applied oral science : revista FOB* 26:e2017115. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0115
- Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz IO, de Araujo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araujo G and Gomes-Filho JE (2017) Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new High-plasticity MTA material. *Journal of endodontics* 43:774-778. doi: 10.1016/j.joen.2016.12.018
- Poggio C, Beltrami R, Colombo M, Ceci M, Dagna A and Chiesa M (2015) In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. *Journal of clinical and experimental dentistry* 7:e584-8. doi: 10.4317/jced.52401
- Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S and Sousa-Neto MD (2007) Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *Journal of endodontics* 33:1110-6. doi: 10.1016/j.joen.2007.06.004
- Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V and Chitnis DS (2008) Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian journal of medical microbiology* 26:241-2.
- Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J and Guerreiro-Tanomaru JM (2017) Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *International endodontic journal* 50 Suppl 2:e31-e39. doi: 10.1111/iej.12780
- Gutierrez MF, Bermudez J, Davila-Sanchez A, Alegria-Acevedo LF, Mendez-Bauer L, Hernandez M, Astorga J, Reis A, Loguercio AD, Farago PV and Fernandez E (2019) Zinc oxide and copper nanoparticles addition in universal adhesive systems improve interface stability on caries-affected dentin. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 100:103366. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.07.024
- Duarte MA, Alves de Aguiar K, Zeferino MA, Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Tanomaru-Filho M, Weckwerth PH and Kuga MC (2012) Evaluation of the propylene glycol association on some physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal* 45:565-70. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02012.x
- Kogan P, He J, Glickman GN and Watanabe I (2006) The effects of various additives on setting properties of MTA. *Journal of endodontics* 32:569-72. doi: 10.1016/j.joen.2005.08.006
- Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J and Tanomaru-Filho M (2014) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International endodontic journal* 47:437-48. doi: 10.1111/iej.12167
- Camilleri J, Sorrentino F and Damidot D (2013) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 29:580-93. doi: 10.1016/j.dental.2013.03.007
- Koutroulis A, Kuehne SA, Cooper PR and Camilleri J (2019) The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Scientific reports* 9:19019. doi: 10.1038/s41598-019-55288-3

Solanki NP, Venkappa KK and Shah NC (2018) Biocompatibility and sealing ability of mineral trioxide aggregate and biodentine as root-end filling material: A systematic review. *Journal of conservative dentistry* : JCD 21:10-15. doi: 10.4103/JCD.JCD\_45\_17

Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MDM, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi NN, Kobarfard F and Sharifi-Rad J (2018) Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy research* : PTR 32:1688-1706. doi: 10.1002/ptr.6109

Thosar NR, Chandak M, Bhat M and Basak S (2018) Evaluation of antimicrobial activity of two endodontic sealers: Zinc Oxide with Thyme Oil and Zinc Oxide Eugenol against root canal microorganisms- An in vitro study. *International journal of clinical pediatric dentistry* 11:79-82. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1489

Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R and Bahador A (2017) Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Brazilian oral research* 31:e108. doi: 10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0108

ElReash AA, Hamama H, Eldars W, Lingwei G, Zaen El-Din AM and Xiaoli X (2019) Antimicrobial activity and pH measurement of calcium silicate cements versus new bioactive resin composite restorative material. *BMC oral health* 19:235. doi: 10.1186/s12903-019-0933-z

Tomas-Catala CJ, Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Forner L, Llena C, Lozano A, Moraleda JM and Rodriguez-Lozano FJ (2018) Biocompatibility of new pulp-capping materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on human dental pulp stem cells. *Journal of endodontics* 44:126-132. doi: 10.1016/j.joen.2017.07.017

Abuarqoub D, Aslam N, Jafar H, Abu Harfil Z and Awidi A (2020) Biocompatibility of Biodentine ((R)) with periodontal ligament stem cells: in vitro study. *Dentistry journal* 8. doi: 10.3390/dj8010017

LeBel G, Vaillancourt K, Bercier P and Grenier D (2019) Antibacterial activity against porcine respiratory bacterial pathogens and in vitro biocompatibility of essential oils. *Archives of microbiology* 201:833-840. doi: 10.1007/s00203-019-01655-7

Alves M, Goncalves MJ, Zuzarte M, Alves-Silva JM, Cavaleiro C, Cruz MT and Salgueiro L (2019) Unveiling the Antifungal Potential of Two Iberian Thyme Essential Oils: Effect on *C. albicans* Germ Tube and Preformed Biofilms. *Frontiers in pharmacology* 10:446. doi: 10.3389/fphar.2019.00446

Paiva KBS and Granjeiro JM (2017) Matrix Metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair. *Progress in molecular biology and translational science* 148:203-303. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.05.001

Boelen GJ, Boute L, d'Hoop J, EzEldeen M, Lambrichts I and Opdenakker G (2019) Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clinical oral investigations* 23:2823-2835. doi: 10.1007/s00784-019-02915-y

### 3.3 Publicação \*

#### **Associação de cimentos reparadores a Lemongrass oil: propriedades físico-químicas, citocompatibilidade, potencial bioativo e atividade antibiofilme**

##### **Resumo**

**Introdução:** O objetivo deste estudo foi avaliar propriedades físico-químicas (tempo de presa, pH e solubilidade), biológicas (citocompatibilidade, potencial bioativo e antibiofilme) dos cimentos reparadores MTA Repair HP (MTAHP) e Biodentine (BIO) associados a 1% de *lemongrass oil* (LEO).

**Materiais e Métodos:** Tempo de presa foi avaliado de acordo com ISO 6876/2012. O pH foi avaliado após 1, 3, 7, 14 e 21 dias. A solubilidade (% de perda de massa) foi avaliada após 7 dias de imersão em água destilada. A citocompatibilidade foi avaliada por meio dos testes de metiltetrazólio (MTT) e vermelho neutro (VN) após 24 h de exposição de células Saos-2 às diferentes diluições dos eluídos dos materiais. O potencial bioativo foi analisado pela atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) nos períodos de 1, 3 e 7 dias e pela capacidade de induzir mineralização por Coloração com Vermelho de Alizarina (ARS). A atividade anti Metaloproteinases de Matriz (MMP) 2 e 9 foi analisada por fluorescência. A atividade antibiofilme sobre *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans* em biofilme mono- e dual-espécie formado em dentina foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (TCDM). A análise estatística foi realizada com os testes ANOVA e Tukey ou Bonferroni ( $\alpha=0.05$ ).

**Resultados:** A associação de LEO manteve tempo de presa e capacidade de alcalinização dos materiais. Não houve diferença estatística na solubilidade de BIO após o acréscimo de LEO, sendo que BIO e BIO/LEO mostraram valores acima do recomendado pela norma ISO 6876. Houve um ganho de massa para MTAHP, que aumentou com a associação de LEO. A adição de LEO a MTAHP e BIO não alterou as propriedades biológicas. Todos os materiais foram citocompatíveis, sendo que MTAHP mostrou maior citocompatibilidade. MTAHP, MTAHP/LEO e BIO mostraram aumento da ALP. Todos os materiais produziram nódulos de mineralização. BIO/LEO foi o mais bioativo pela ARS. A adição de LEO a MTAHP e BIO não influenciou nos níveis de MMP-9, e aumentou a atividade antibiofilme dos materiais.

---

\* Redigido de acordo com as normas do International Endodontic Journal, periódico para o qual será submetido.

**Conclusão:** A associação de LEO aos cimentos MTA HP e Biodentine aumenta a atividade antimicrobiana desses materiais, sem alterar significativamente suas propriedades físico-químicas, citocompatibilidade e potencial bioativo; mostrando potencial para aplicação clínica.

**Palavras-chave:** Endodontia. Ação antimicrobiana. Biologia celular. Propriedades físico-químicas. Silicato de cálcio.

## INTRODUÇÃO

Cimentos reparadores à base de silicato de cálcio são amplamente utilizados na endodontia devido às suas propriedades biológicas e potencial bioativo (1). MTA foi o pioneiro, sendo introduzido na década de 1990 (1). Entretanto, MTA apresenta algumas desvantagens, tais como tempo de presa longo, descoloração dental e dificuldade de manipulação, levando os fabricantes a desenvolverem diferentes materiais à base de silicato de cálcio (1). Dentre esses materiais, MTA HP (Angelus, PR, Brasil) apresenta um plastificante visando maior plasticidade, manuseio e aplicação clínica. Além disso, a substituição do radiopacificador de óxido de bismuto para tungstato de cálcio foi realizada para evitar a descoloração dentária (2). Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França) é também um biomaterial à base de silicato de cálcio que apresenta no líquido cloreto de cálcio para reduzir a presa do material, além de policarboxilato como agente superplastificante, podendo ser usado como substituto da dentina em várias indicações clínicas (3). O radiopacificador do Biodentine é o óxido de zircônio, o qual não promove descoloração dentária (4).

MTA HP apresenta propriedades físico-químicas e biológicas (*in vitro* e *in vivo*) adequadas, com melhor capacidade de manipulação e escoamento que MTA Branco (5). De acordo com revisão sistemática desenvolvida por Torabinejad et al (6), numerosos relatos de casos ilustraram o sucesso clínico de Biodentine como plug apical em tratamentos endodônticos regenerativos, como selador de perfurações, cimento retrobturador e como material restaurador temporário. Entretanto, altos valores de solubilidade são reportados para Biodentine (7).

Embora as propriedades físico-químicas e biológicas de cimentos à base de silicato de cálcio tenham sido amplamente investigadas, existe uma escassez de informações com relação à atividade antimicrobiana que favoreçam a aplicação clínica desses materiais (8). Até o momento, um estudo (8) avaliou propriedades antimicrobianas de MTA HP, que mostrou eficácia antimicrobiana inferior ao cimento reparador (iRoot BP Plus. BioCeramix Inc., Canada) contra as espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Candida albicans*, sendo que

ambos materiais avaliados não apresentaram efeito antimicrobiano contra *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces israelii*. Com relação ao Biodentine, estudo prévio (9) mostrou adequadas propriedades antimicrobianas para este material no teste de contato direto. Porém, o material não demonstrou atividade antibiofilme (9). Além disso, Biodentine não se mostrou eficaz contra o biofilme de várias espécies (10).

A associação do Biodentine com outras substâncias pode aumentar a atividade antimicrobiana (11). Diferentes estratégias (12) e associações (11) a cimentos reparadores foram propostas a fim de aumentar sua atividade antimicrobiana. Entretanto, alterações mecânicas (13), biológicas (14) e físico-químicas (15) podem ser observadas para os materiais após associações. Nesse contexto, associações utilizando agentes naturais que possam inibir o crescimento de micro-organismos sem impactar em outras propriedades podem representar alternativas terapêuticas eficazes (16). Desta forma, o potencial antibacteriano de óleos essenciais pode ser promissor para uso na odontologia, com redução de custos e maior disponibilidade (17). *Lemongrass oil* (LEO) é um óleo essencial amplamente utilizado devido às suas propriedades medicinais (16). A atividade antimicrobiana do LEO foi comprovada contra vários fungos patogênicos (16), além de mostrar as zonas de inibição mais altas sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, quando comparado a outros óleos e eluídos naturais (18).

Com base nesses achados, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas, físico-químicas e antimicrobianas da associação de LEO aos cimentos reparadores MTA HP e Biodentine. A hipótese nula foi de que não haveria diferença nas propriedades dos cimentos antes e após a inserção do óleo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho os cimentos foram manipulados segundo as recomendações dos fabricantes, nas seguintes proporções (Tabela 1).

**Tabela 1** – Materiais e Proporções

Material	Fabricante	Proporção		
		Pó	Líquido	Lemongrass oil*
MTAHP	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	1 g	300 µL	—
MTAHP/LEO		1 g	300 µL	13,5 µL
BIO	Septodont, Saint Maur des Fossés, France	1 g	8 gotas	—
BIO/LEO		1 g	8 gotas	13,5 µL

MTAHP: MTA Repair HP; BIO: Biodentine; LEO: Lemongrass Essential Oil. \* Sigma-Aldrich Brasil Ltda.SP.

## AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

### **TEMPO DE PRESA**

A avaliação do tempo de presa (n=6) foi realizado baseado na ISO 6876/2012. Anéis metálicos de 10mm de diâmetro interno e 1mm de altura foram utilizados. Para determinar a presa foi utilizada agulha de Gilmore com massa de  $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de  $2 \pm 0,1$ mm apoiada perpendicularmente sobre a superfície do cimento. Este processo foi repetido até a agulha não deixar mais marca na superfície do cimento. Os materiais foram manipulados segundo as recomendações dos fabricantes, MTA Repair HP foi espatulado durante 40 segundos; Biodentine foi agitado em amalgamador por 30 segundos. O tempo de presa foi aferido desde o preenchimento do material nos anéis até a agulha deixar de marcar na superfície do cimento. Durante o período de avaliação os materiais foram mantidos na estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $95\% \pm 5\%$  de umidade; a agulha foi limpa antes de cada aferição.

### **SOLUBILIDADE**

O teste de solubilidade (n=5) foi realizado baseado em Carvalho-Junior et al (19), com corpos de prova de 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, e com um fio de nylon impermeável (6,5cm) no meio do material, armazenados em estufa ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $95\% \pm 5\%$ UR), durante 24h. Os corpos de prova foram colocados em dessecador a vácuo, até obter estabilidade de massa. Depois foram suspensos em 7,5 mL de água destilada e deionizada, sem contato entre o material e a superfície interna do recipiente; mantidos em estufa ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) durante 7 dias. Os corpos de prova foram lavados com água destilada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final. A aferição de massa foi realizada em balança de precisão HM-200 (A&D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA). A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa inicial.

### **pH**

Para o teste de pH, tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n=10). Cada tubo foi imerso em 10 mL de água deionizada cujo pH foi aferido previamente e mantido na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante os períodos experimentais. O grupo controle foi água destilada e deionizada. Transcorrido cada período de avaliação, 1, 3, 7, 14 e 21 dias, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos. A aferição do pH foi realizada em triplicata, com pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) a  $25^{\circ}\text{C}$  de temperatura ambiente.

## AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E BIOATIVIDADE

Foram utilizadas células humanas “osteoblast-like cells” da linhagem Saos-2 (ATCC HTB-85), cultivadas em frascos T-75 (Jet Biofil, Guangzhou, China), contendo DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), até a confluência. Os cimentos foram manipulados (Tabela 1) e colocados no fundo do poço de placas de cultura de 12 poços (Jet Biofil). As placas foram mantidas a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>; após 24h as placas foram expostas à luz ultravioleta (UV) (20), e os poços preenchidos com 5mL de DMEM sem soro (meio modificado de Dulbecco; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram mantidas a 37°C por 24h, com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> (ISO 10993-5:2005) (21).

### *Ensaio de Viabilidade celular*

A viabilidade celular foi avaliada por brometo de 3-(4,5-dimetil -2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (22, 23) e Vermelho Neutro (VN) (24). Células Saos-2 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células/mL) em placas de 96 poços (Jet Biofil) contendo DMEM suplementado com 10% de SFB (SFB: Gibco, Life Technologies), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas por 24h a 37°C, 5% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> antes de exposição aos eluídos dos materiais. As células foram expostas aos eluídos dos cimentos em diluições 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30; como controle negativo foi utilizado DMEM sem soro e como controle positivo Dimetilsilfóxido (DMSO). Após esse período, o meio foi substituído por 100 µL de solução de MTT 5mg/mL (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 3h. Foi adicionado isopropanol (100µL) acidificado a 0,04N (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi medida a 570nm em espectrofotômetro (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). Para o teste de VN, os eluídos foram substituídos por 0,1µL de DMEM contendo VN 50µL/mL (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 3h. O produto colorimétrico foi solubilizado em solução (50% de etanol e 1% de ácido acético) (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro a 570nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada grupo experimental, e a média de cada experimento foi usada na análise estatística (n = 3 por grupo).

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO

### ***Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)***

A atividade enzimática da fosfatase alcalina foi determinada com a utilização de kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As Saos-2 foram plaqueadas ( $5 \times 10^4$  células/mL) em placas de cultura de 96 poços. As células foram cultivadas por 24h a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram expostas aos eluídos dos materiais na diluição de 1:15, por um, três e sete dias. Após cada período experimental, o conteúdo dos poços será removido e a monocamada celular será lavada com 200 µL de PBS 1X. Em seguida, serão acrescentados 200 µL de uma solução de Lauril sulfato de sódio/água destilada 1% (Sigma-Aldrich) a cada poço. Cada amostra foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) contendo substrato e tampão, e foram adicionados 500 µL de reagente colorido. A densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro a 590nm. Três experimentos independentes foram realizados em sextuplicata para cada grupo experimental e controle ( $n = 3$  / grupo). Os dados foram expressos como atividade ALP normalizada pela quantidade de proteínas totais no respectivo intervalo de tempo de cultura (DO = 570 nm).

### ***Coloração com vermelho de Alizarina (ARS)***

Para avaliar o potencial bioativo dos materiais reparadores e associações, as células Saos-2 foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/mL) em placas de cultura de 24 poços. Durante 21 dias, o meio de cultura DMEM osteogênico (DMEM 10% SFB; 100 IU/mL penicilina; 100 mg/mL estreptomicina; 0,023 g/mL β-glicerolfosfato; 0,055 mg/mL ácido ascórbico – Sigma Aldrich), com os eluídos dos cimentos e controles, foi renovado a cada 2 dias. Após este período, as células foram fixadas com 10% de paraformaldeído, lavadas e incubadas com 1 mL de AlizarinRed S – ARS 40 mM (2%- pH 4.1) (Sigma-Aldrich) por 3 minutos. Os campos foram fotografados (Canon EOS-1D, Canon Inc, Tokyo, Japan) e, em seguida, a mineralização foi quantificada pela dissolução dos nódulos com 0,5 mL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridínio (Sigma-Aldrich). Três alíquotas de 100 µL da ressuspensão de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda. Os ensaios foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ) e repetido três vezes em tempos independentes.

### ***Atividade anti-MMP***

A capacidade de atividade anti-MMP (25) foi avaliada usando MMP-2 e MMP-9 recombinante com kits fluorométricos de MMP (SensoLyte assay kits; AnaSpec, Fremont, CA,

USA), seguindo as recomendações do fabricante. Os eluídos dos materiais (tabela 1), e as MMP ativadas (pré-incubadas com 10mM de amino-phenyl mercuric acetate (APMA)) foram misturados com substrato peptídico de transferência de energia de ressonância de fluorescência 5-FAM / QXLTM 520 (FRET) em tampão de ensaio usando placas de 96 poços. Para o peptídeo FRET intacto, a fluorescência de 5-FAM foi anulada por QXL 520. Após a clivagem em 2 fragmentos separados por MMPs, a fluorescência de 5-FAM foi recuperada e monitorada em comprimentos de onda de excitação/emissão (490/520nm, respectivamente). Após 1 h de incubação, o sinal de fluorescência foi lido por um leitor de microplacas (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EUA) e expresso como unidades fluorescentes relativas (RFU) MMPs ativas diluídas foram usadas como controle positivo; O Ilomastat 25µM foi usado como controle inibidor, e os controles do composto de teste sem MMP foram adicionados para avaliar sua autoimunofluorescência. Foram realizadas seis amostras de cada grupo para cada ensaio de MMP.

#### AValiação da Atividade Antibiofilme

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Telstar Technologies, S.L.–BV 100, Terrassa, Espanha). Foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Cultura pura *E. faecalis* foi cultivada *overnight* em Tryptic Soy Broth-TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) e de *C. albicans* cultivada em Sabouraud Dextrose Broth – SB (Difco, Detroit, MI, EUA). Os inóculos foram preparados a partir de suspensões microbianas preparadas e ajustadas a uma densidade óptica equivalente a  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, tanto para os biofilmes mono-espécie como para os dual-espécies.

#### **Atividade antibiofilme: teste de contato direto modificado (TCDM)**

Blocos de dentina esterilizados medindo 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura) foram submersos em TSb (2 mL) contendo 1% do inóculo ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) nos biofilmes de *E. faecalis*, com trocas do meio de cultura total a cada 48 horas. Os biofilmes de *C. albicans* e os biofilmes com as duas cepas associadas, foram induzidos utilizando meio de cultura RPMI-1640 (+L-glutamine, +25mM HEPES buffer, -sodium bicarbonate) (Gibco, R 23400-013 1L, Life Technologies, USA) e 28 g de glicose, com inóculos na concentração citada acima e trocas a cada 24 h. Os três tipos de biofilmes foram desenvolvidos em Placas de cultura de 24 poços. As placas foram mantidas em ambiente microaerófilo por 14 dias para o biofilme mono-espécie de *E. faecalis*, e em aerofilia por 5 dias

para os biofilmes mono-espécie de *C. albicans* e dual de *E. faecalis/C. albicans*. Todos biofilmes foram mantidos em incubadora de bancada shaker (Modelo 0816M28, Quimis aparelhos científicos LTDA, Diadema, SP, Brasil) a 37°C com 80rpm. Após os períodos de indução, os eluídos dos materiais foram preparados, em concentração de 50mg/mL. Os materiais foram manipulados segundo as proporções da Tabela 1, colocados em tubo falcon de 15 mL com 10 mL de água destilada e imediatamente misturados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), mantidos em estufa a 37°C durante 48 h. Em seguida, os blocos de dentina com biofilme formado foram lavados uma vez em PBS para remoção de células microbianas não aderidas e colocados individualmente em um eppendorf de 0,5 mL com 400µL de eluído dos materiais, os quais permaneceram em contato por 15 h, para o controle foi utilizado água destilada. Após este período, cada bloco de dentina foi colocado em um microtubo contendo 1 mL de solução salina e pérolas de vidro e foram agitados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil). Posteriormente, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento de três alíquotas de 20µL de cada uma das suspensões, em placas de Petri contendo meio de cultura de Tryptic Soy Agar (TSA), para *E. faecalis* do biofilme mono-espécie; Sabouraud Dextrose Agar (SBA), para *C. albicans* do biofilme mono- e dual-espécie e m-Enterococcus Agar para isolamento de *E. faecalis* do biofilme dual-espécie. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Foi realizada contagem de UFC/mL e os dados foram submetidos à transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ).

### **Análise estatística**

A normalidade dos dados foi testada usando o teste Shapiro-Wilk. A análise estatística dos testes físico-químicos e ARS foi realizada com os testes paramétricos ANOVA e Tukey. A viabilidade celular, e a atividade da ALP e inibição de MMP foram analisadas pelos testes estatísticos *two-way* ANOVA e Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **TESTES FÍSICO-QUÍMICOS**

Os materiais não mostraram diferença significativa no tempo de presa ( $P > 0.05$ ). Na avaliação da solubilidade, MTAHP e MTAHP/LEO ganharam massa (valores negativos), mostrando diferença entre eles ( $P < 0.05$ ). MTAHP/LEO mostrou maior valor ( $P < 0.05$ ). BIO e BIO/LEO mostraram perda de massa maior que 3%, sem diferença entre eles ( $P > 0.05$ ).

**Tabela 2** – Tempo de presa e solubilidade (média e desvio padrão) observados para os materiais

	<b>MTAHP</b>	<b>MTAHP/LEO</b>	<b>BIO</b>	<b>BIO/LEO</b>
Tempo de presa (min)	32.50 (1.97) <sup>a</sup>	32.00 (2.09) <sup>a</sup>	34.17 (2.64) <sup>a</sup>	34.00 (1.67) <sup>a</sup>
Solubilidade (% perda de massa)	-2.11 (0.70) <sup>c</sup>	-5.47 (1.13) <sup>a</sup>	4.32 (0.11) <sup>b</sup>	3.62 (0.11) <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significante ( $P < .05$ )

Todos os materiais avaliados tiveram capacidade de alcalinização nos períodos avaliados, mostrando diferença com o grupo controle ( $P < 0.05$ ). Os valores de pH mais elevados foram do MTAHP nos períodos de 24 e 72 horas. Nos períodos, 7, 14 e 21 dias, não houve diferenças significantes entre os grupos estudados ( $P > 0.05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores de pH (media e desvio padrão) observados para os materiais nos diferentes períodos

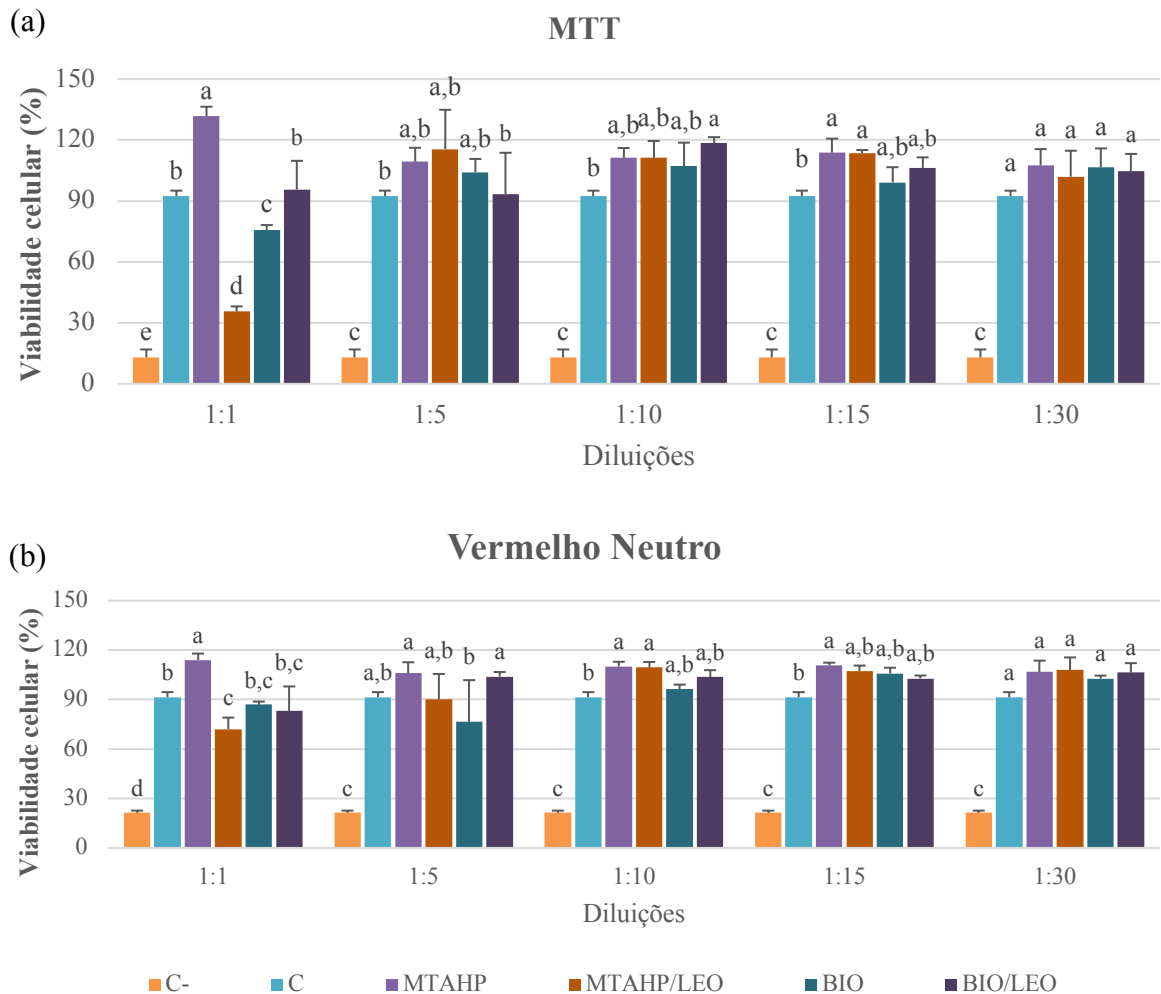
	<b>MTAHP</b>	<b>MTAHP/LEO</b>	<b>BIO</b>	<b>BIO/LEO</b>	<b>Controle</b>
24 h	11.12 (0.06) <sup>a</sup>	10.58 (0.14) <sup>b</sup>	10.07 (0.38) <sup>c</sup>	10.36 (0.16) <sup>b,c</sup>	6.43 (0.48) <sup>d</sup>
72 h	10.33 (0.56) <sup>a</sup>	9.47 (0.51) <sup>b</sup>	9.55 (0.65) <sup>b</sup>	9.79 (0.70) <sup>a,b</sup>	6.51 (0.31) <sup>c</sup>
7 dias	9.92 (0.77) <sup>a</sup>	9.13 (1.03) <sup>a</sup>	9.85 (0.52) <sup>a</sup>	9.63 (0.87) <sup>a</sup>	6.14 (0.36) <sup>b</sup>
14 dias	9.64 (0.74) <sup>a</sup>	8.78 (1.01) <sup>a</sup>	9.24 (1.09) <sup>a</sup>	9.32 (1.14) <sup>a</sup>	6.42 (0.28) <sup>b</sup>
21 dias	8.99 (0.63) <sup>a,b</sup>	8.38 (0.86) <sup>b</sup>	8.95 (1.02) <sup>a,b</sup>	9.77 (0.96) <sup>a</sup>	6.47 (0.41) <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significante ( $P < .05$ )

### Viabilidade Celular

Pelo teste de MTT, a citocompatibilidade de MTAHP e BIO não foi comprometida pela adição de LEO a 1% nas diluições 1:5, 1:10, 1:15 e 1:30 ( $P > 0.05$ ). Embora na diluição 1:1 MTAHP/LEO mostrou menores valores de viabilidade celular ( $P < 0.05$ ); BIO/LEO foi mais citocompatível quando comparado com BIO ( $P > 0.05$ ) (Fig. 1a).

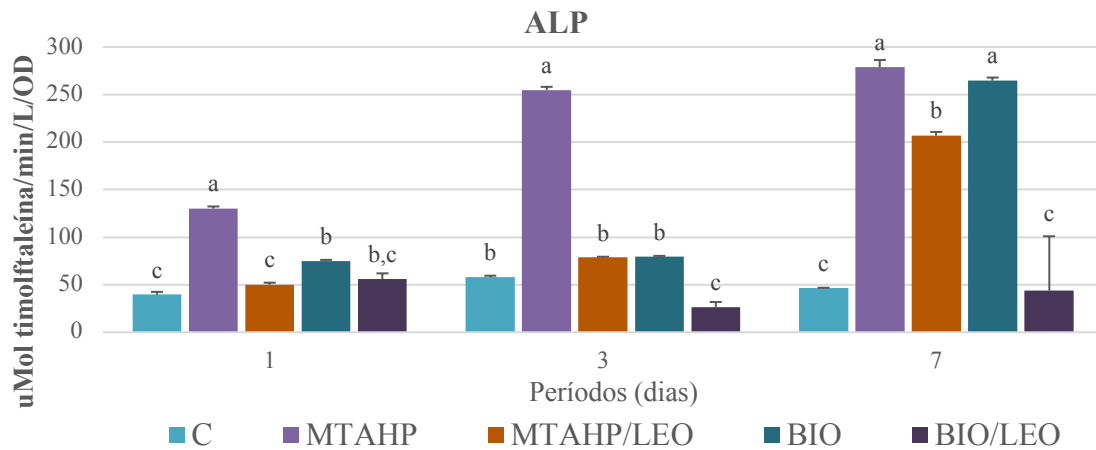
O teste VN revelou que na diluição 1:1 MTA/LEO diminuiu a viabilidade celular quando comparado ao MTA e ao controle ( $P > 0.05$ ). Nas demais diluições, 1:5, 1:10, 1:15 e 1:30 todos os materiais se mostraram citocompatíveis ( $P > 0.05$ ) (fig. 1b).



**Figura 1** - Viabilidade celular de Saos-2 avaliada pelos ensaios MTT (a) e VN (b), após 24 horas de exposição aos eluídos dos cimentos MTAHP, MTAHP/LEO, BIO, BIO/LEO nas diluições de 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30, meio de cultura-DMEM sem soro (controle positivo), Dimetilsulfóxido-DMSO (controle negativo). Barras com letras diferentes representam diferenças significantes entre os eluídos de cimento (em cada diluição) e o controle; MTAHP, MTA Repair HP; LEO, Lemongrass Essential Oil; BIO, Biodentine; C+, controle positivo; C-, controle negativo.

#### Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

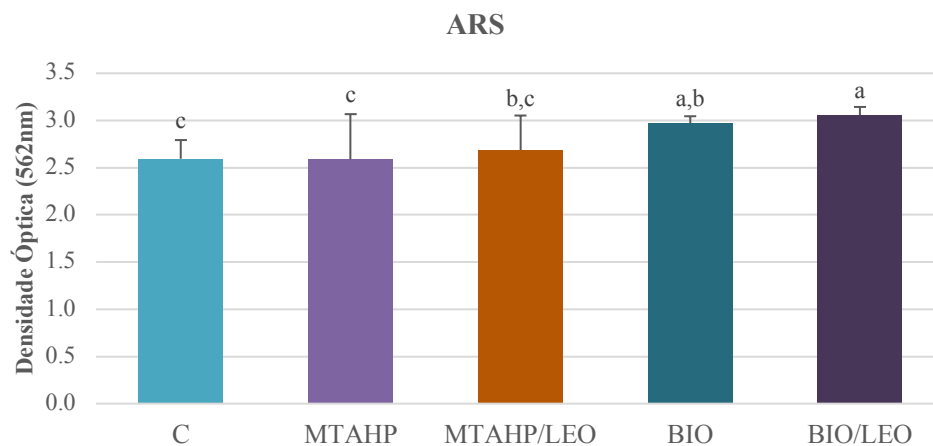
Todos os materiais mostraram atividade da fosfatase alcalina nos três períodos avaliados (Fig. 2). No primeiro e terceiro dias, a atividade de ALP foi maior para MTAHP, mostrando diferença significativa com o controle e os outros grupos ( $p < 0.05$ ). Após 7 dias, a atividade de ALP aumentou significativamente para MTAHP e BIO ( $p < 0.05$ ), seguido por MTAHP/LEO, sendo diferentes quando comparados ao controle e BIO/LEO ( $p < 0.05$ ).



**Figura 2** – Atividade de ALP de células Saos-2 após exposição a MTAHP, MTAHP/LEO, BIO, BIO/LEO na diluição 1:15 e meio de cultura sem soro (controle), durante os períodos de 1, 3 e 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significantes em cada período. MTAHP, MTA Repair HP; LEO, Lemongrass Essential Oil; BIO, Biodentine; C, Controle.

#### Coloração com vermelho de Alizarina (ARS)

Todos os materiais mostraram produção de nódulos de mineralização. BIO e BIO/LEO produziram maior deposição de nódulos mineralizados comparado ao controle ( $p < 0.05$ ) (fig.3).

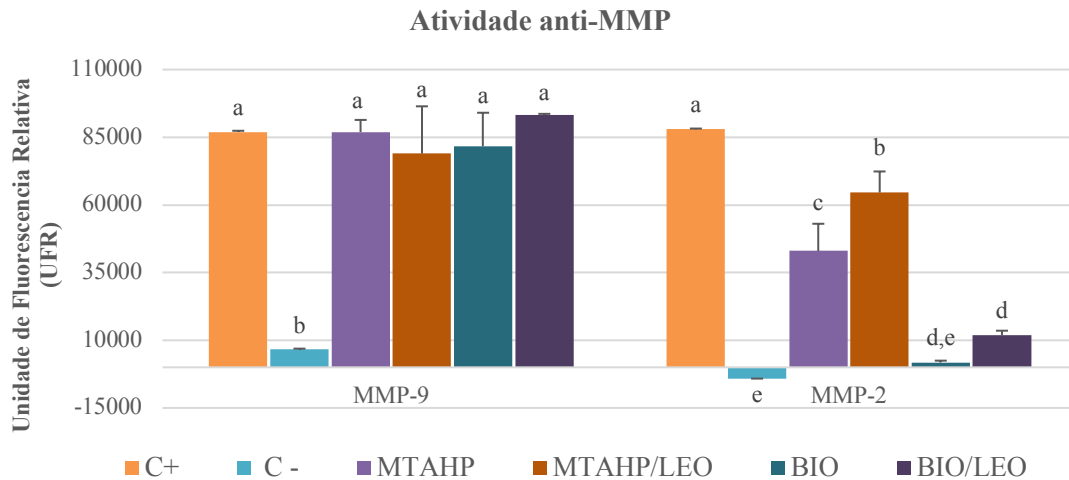


**Figura 3** – Coloração com alizarina (ARS), análise estatística realizada após 21 dias de exposição do meio de cultura osteogênico. Todos os materiais induziram a produção de nódulos mineralizados. Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os eluídos de cimento e o controle negativo. MTAHP, MTA Repair HP; LEO, Lemongrass Essential Oil; BIO, Biodentine; C, Controle

#### ATIVIDADE ANTI-MMP

Os grupos avaliados não mostraram capacidade de inibição de MMP-9 com valores de UFR semelhantes ao controle positivo ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4).

A MMP-2 foi inibida por todos os grupos avaliados, mostrando valores de UFR de MMP-2 menores que o controle positivo ( $p < 0.05$ ). A maior atividade anti-MMP-2 foi do grupo BIO e BIO/LEO (Fig. 4).

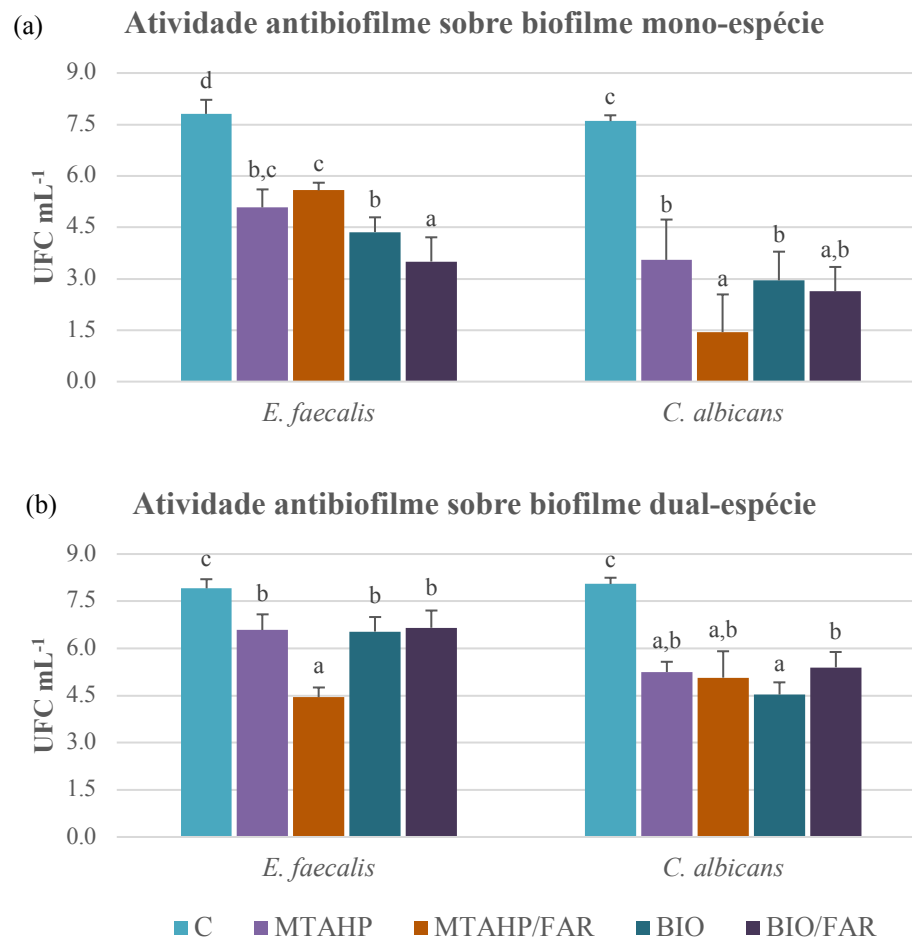


**Figura 4** – Atividade anti-MMP (Metaloprotease). Inibição de Matriz de Metaloprotease 9 e 2, por MTAHP, MTAHP/LEO, BIO, BIO/LEO na diluição 1:15 em Unidade de Fluorescência Relativa (UFR). MMP ativa diluída como controle positivo (C+), Ilomastat 25 $\mu$ M como controle inibição (C-).

#### ATIVIDADE ANTIBIOFILME POR TCDM

A adição de LEO mostrou um aumento da capacidade antibiofilme dos materiais MTAHP e BIO sobre biofilme mono-espécie de *C. albicans* ( $P < 0.05$ ). Sobre biofilme de *E. faecalis*, BIO/LEO reduziu significativamente a contagem de UFC quando comparado com BIO e com o controle ( $P < 0.05$ ).

No TCDM sobre biofilme dual-espécie, todos os materiais mostraram redução de *C. albicans* ( $P > 0.05$ ), porém mostraram diferença significativa com o controle ( $P < 0.05$ ). A atividade antibiofilme contra *E. faecalis* em biofilme dual-espécie, MTAHP/LEO mostrou maior redução bacteriana com diferença significativa quando comparado aos cimentos MTAHP, BIO e BIO/LEO ( $P < 0.05$ ). Todos os materiais mostraram diferença significativa com o controle ( $P < 0.05$ ).



**Figura 5** – Atividade antibiofilme por Teste de Contado Direto Modificado (TCDM) sobre biofilme mono-espécie (a) e biofilme dual-espécie (b), após 15 horas de exposição aos eluidos dos cimentos MTAHP, MTAHP/LEO, BIO, BIO/LEO na concentração de 50mg/mL, e água destilada (controle). Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os cimentos e o controle (sobre cada micro-organismo); MTAHP, MTA Repair HP; LEO, Lemongrass Essential Oil; BIO, Biodentine; C, controle.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo da literatura a reportar a associação de LEO a cimentos reparadores à base de silicato de cálcio. A hipótese nula testada, de que a incorporação de LEO não alteraria as propriedades de MTA HP e Biodentine foi parcialmente aceita, uma vez que as propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais não foram significativamente alteradas, enquanto que a atividade antimicrobiana apresentou aumento significativo.

Quanto às propriedades físico-químicas, o tempo de presa dos materiais não foi alterado, os cimentos mantiveram sua capacidade de alcalinização e não houve diferença na solubilização para Biodentine, enquanto que para MTA HP houve um aumento no ganho de massa.

O tempo de presa dos materiais é importante, uma vez que um tempo de presa longo pode comprometer a estabilidade dos cimentos, enquanto valores muito curtos dificultam a

aplicação clínica dos materiais (26). Nossos resultados não mostraram diferença no tempo de presa entre os cimentos avaliados. Embora não haja estudos comparando esta propriedade entre MTA HP e Biodentine, nossos valores foram semelhantes aos observados para MTA HP (5) e para o Biodentine (27). O cloreto de cálcio presente em Biodentine proporciona um tempo de presa mais curto ao material (28), enquanto que para o MTA HP, o tempo de presa similar ao Biodentine pode ser justificado devido a maior área superficial, o que ocorre em cimentos com tamanhos de partículas reduzidos (29).

O tempo de presa e a solubilidade dos materiais podem estar associados, uma vez que cimentos com tempo de presa longo são mais suscetíveis à dissolução após sua aplicação (26). Nossos resultados mostraram ganho de massa para MTA HP com ou sem associação ao LEO, o que pode ter ocorrido em função de sua baixa solubilidade e alta absorção de água (30). Biodentine mostrou valores de solubilidade acima dos 3% recomendados pela ISO com ou sem a presença de LEO, o que corrobora estudos prévios (7) e pode ser relacionado com a presença de policarboxilato em seu líquido, que atua como surfactante promovendo a dispersão das partículas do cimento (31).

Embora a solubilidade possa comprometer a estabilidade do material, em contrapartida, valores mais altos de pH são encontrados em materiais mais solúveis (26). Estes altos valores de pH podem estimular o processo de reparo, induzindo mineralização e explicando o comportamento biológico dos materiais (26). Todos os cimentos avaliados mostraram capacidade de alcalinização do meio em todos os períodos, mesmo após a incorporação de LEO. Além da associação entre altos valores de pH e propriedades biológicas dos materiais, a potencial atividade antimicrobiana de cimentos à base de silicato de cálcio ocorre principalmente devido à sua alta alcalinidade (8). Ainda correlacionando as propriedades dos materiais, a baixa solubilidade e o curto tempo de presa evitam extrusão do material para os tecidos perirradiculares e pode colaborar com as propriedades biológicas dos mesmos (5).

A proposta de adicionar 1% de LEO manteve a citocompatibilidade de MTAHP e Biodentine. Tais cimentos reparadores são considerados materiais com adequadas propriedades biológicas (5, 27). Por outro lado, a citocompatibilidade de LEO foi estudada sobre fibroblastos de dérmicos humanos (32) e mostrou ser concentração dependente, reduzindo a viabilidade celular em 5% quando usadas concentrações maiores que 25% (v/v) de LEO. Portanto, torna-se importante determinar o efeito da concentração proposta neste estudo sobre células “*osteoblast-like*”. Embora a associação de LEO tenha afetado negativamente a viabilidade celular quando mais concentrado, esta associação manteve a citocompatibilidade dos materiais. No entanto, estudos *in-vivo* devem ser realizados antes de recomendar seu uso clínico.

Com relação ao potencial bioativo, a adição de LEO diminuiu a atividade da fosfatase alcalina dos cimentos MTAHP e Biodentine. MTAHP mostrou maior atividade da ALP nos três períodos avaliados. A maior atividade de ALP foi evidenciado após 7 dias de contato, concordando com outros estudos (23). Por outro lado, na avaliação de formação de nódulos de mineralização pelo teste de ARS, embora seja evidente que todos os materiais estudados induziram produção de nódulos de mineralização, Biodentine e Biodentine/LEO foram os que mais induziram.

Esses resultados corroboram estudos prévios que mostraram as boas propriedades biológicas de MTA HP (5) e Biodentine (27). Além disso, nossos resultados mostram que mesmo que a adição de LEO possa ter alterado as propriedades dos cimentos em algumas concentrações e momentos específicos, tal associação manteve a biocompatibilidade e bioatividade dos mesmos.

A adição de LEO a MTAHP e Biodentine não alterou a inibição de MMP-2 e -9. Todos os materiais mantiveram os níveis de MMP-9 e diminuíram os níveis de MMP-2. Embora a avaliação de MMP não seja comum para cimentos reparadores endodônticos, as MMP participam como mediadores de processos fisiológicos e patológicos de formação e reabsorção óssea. A ausência de MMP-9 tem sido associada a inibição de mineralização, e o aumento de MMP-2 está relacionado a maior inflamação (33).

Embora cimentos à base de silicato de cálcio possam apresentar certa atividade antibacteriana intrínseca em função de sua capacidade alcalinizante e liberação de hidróxido de cálcio (11), esta propriedade é insuficiente na condução de uma erradicação completa das bactérias residuais, o que pode levar a uma reinfecção secundária (12). Koutroulis et al (34) ao avaliarem a biocompatibilidade e propriedades antimicrobianas de cimentos hidráulicos, observaram que Biodentine mostrou efeito antimicrobiano apenas sobre *S. mutans*. Além disso, ElReash et al (8) ao avaliarem MTA HP afirmaram que o efeito antimicrobiano de cimentos de silicato de cálcio contra espécies bacterianas estritamente anaeróbicas ainda é questionável. Jardine et al (10) avaliaram a viabilidade do biofilme de várias espécies após contato com diferentes cimentos hidráulicos e observaram uma viabilidade superior a 50% em todos os grupos, sendo que Biodentine mostrou-se semelhante ao grupo controle negativo. Os autores afirmam que é essencial entender que esses cimentos biocerâmicos são indicados para situações clínicas infectadas e que, portanto, procedimentos de desinfecção complementar devem ser idealizados (10). Desta forma, muitos estudos são realizados a fim de tentar desenvolver um material com atividade antibacteriana superior (12).

No tratamento do canal radicular, a remoção de biofilmes e matéria orgânica que possam servir como nutrientes para bactérias residuais é fundamental. Desta forma, a partir de seus mecanismos de ação específicos, substâncias naturais com potencial antibiofilme podem ser aplicadas na endodontia (35). Nossos resultados mostraram que a associação de LEO aumentou a atividade antimicrobiana sobre biofilme mono-espécie e dual-espécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

A incorporação de um óleo essencial como LEO aos cimentos à base de silicato de cálcio pode auxiliar na inibição da formação de biofilme (efeito preventivo) ou, alternativamente, atuar em biofilmes já formados (efeito terapêutico) (35), mantendo sua ação ao longo do tempo, como mostrado pela alcalinização do meio mesmo após 21 dias de avaliação. As associações estudadas apresentam um caráter promissor na endodontia, uma vez que os cimentos mantiveram suas boas propriedades físico-químicas e biológicas e aumentaram sua atividade antimicrobiana.

### **Conclusão**

A associação de LEO a 1% aos cimentos reparadores MTA HP e Biodentine aumenta a atividade antimicrobiana desses materiais, sem alterar significativamente suas propriedades físico-químicas (tempo de presa, solubilidade e pH) e mantendo a citocompatibilidade e potencial bioativo, mostrando-se promissora para aplicação clínica.

## REFERÊNCIAS

1. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J* 2018;51:177-205.
2. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz IO, et al. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biom mineralization of the New High-plasticity MTA Material. *J Endod* 2017;43:774-8.
3. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012;45:439-48.
4. Valles M, Roig M, Duran-Sindreu F, Martinez S, Mercade M. Color Stability of Teeth Restored with Biodentine: A 6-month In Vitro Study. *J Endod* 2015;41:1157-60.
5. Ferreira CMA, Sassone LM, Goncalves AS, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep* 2019;9:3933.
6. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J* 2018;51:284-317.
7. Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR, et al. Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clin Oral Investig* 2019;23:1359-66.
8. ElReash AA, Hamama H, Eldars W, et al. Antimicrobial activity and pH measurement of calcium silicate cements versus new bioactive resin composite restorative material. *BMC Oral Health* 2019;19:235.
9. Farrugia C, Lung CYK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The Relationship of Surface Characteristics and Antimicrobial Performance of Pulp Capping Materials. *J Endod* 2018;44:1115-20.
10. Jardine AP, Montagner F, Quintana RM, Zaccara IM, Kopper PMP. Antimicrobial effect of bioceramic cements on multispecies microcosm biofilm: a confocal laser microscopy study. *Clin Oral Investig* 2019;23:1367-72.
11. Elsaka SE, Elnaghy AM, Mandorah A, Elshazli AH. Effect of titanium tetrafluoride addition on the physicochemical and antibacterial properties of Biodentine as intraorifice barrier. *Dent Mater* 2019;35:185-93.
12. Shen YF, Huang TH, Ng HY, Fang HY, Hsu TT. Mineral Trioxide Aggregate Mixed with 5-Aminolevulinic Acid for the Photodynamic Antimicrobial Strategy in Hard Tissue Regeneration. *Materials (Basel)* 2018;11:
13. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod* 2007;33:844-7.

14. Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J* 2005;38:137-43.
15. Cavenago BC, Del Carpio-Perochena AE, Ordinola-Zapata R, et al. Effect of Using Different Vehicles on the Physicochemical, Antimicrobial, and Biological Properties of White Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2017;43:779-86.
16. Tyagi AK, Malik A. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans*. *Micron* 2010;41:797-805.
17. Karbach J, Ebenezer S, Warnke PH, Behrens E, Al-Nawas B. Antimicrobial effect of Australian antibacterial essential oils as alternative to common antiseptic solutions against clinically relevant oral pathogens. *Clin Lab* 2015;61:61-8.
18. Makade CS, Shenoi PR, Morey E, Paralikar AV. Evaluation of antimicrobial activity and efficacy of herbal oils and extracts in disinfection of gutta percha cones before obturation. *Restor Dent Endod* 2017;42:264-72.
19. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, et al. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *Journal of endodontics* 2007;33:1110-6.
20. Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V, Chitnis DS. Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian journal of medical microbiology* 2008;26:241-2.
21. International Organization for Standardization Dentistry. Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity. Geneva 2005.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983;65:55-63.
23. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *International endodontic journal* 2017;50 Suppl 2:e31-e9.
24. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols* 2008;3:1125-31.
25. Gutierrez MF, Bermudez J, Davila-Sanchez A, et al. Zinc oxide and copper nanoparticles addition in universal adhesive systems improve interface stability on caries-affected dentin. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2019;100:103366.
26. Vivan RR, Zapata RO, Zeferino MA, 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;110:250-6.
27. Ochoa-Rodriguez VM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, et al. Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. *J Appl Oral Sci* 2019;27:e20180429.

28. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 2013;29:580-93.
29. Jimenez-Sanchez MDC, Segura-Egea JJ, Diaz-Cuenca A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019;107:2109-20.
30. Galarca AD, Da Rosa WLO, Da Silva TM, et al. Physical and Biological Properties of a High-Plasticity Tricalcium Silicate Cement. *Biomed Res Int* 2018;2018:8063262.
31. Dawood AE, Manton DJ, Parashos P, et al. The physical properties and ion release of CPP-ACP-modified calcium silicate-based cements. *Aust Dent J* 2015;60:434-44.
32. Adukwu EC, Bowles M, Edwards-Jones V, Bone H. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:9619-27.
33. Boelen GJ, Boute L, d'Hoop J, et al. Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clin Oral Investig* 2019;23:2823-35.
34. Koutroulis A, Kuehne SA, Cooper PR, Camilleri J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci Rep* 2019;9:19019.
35. Alves FR, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res* 2013;27:20-5.

## 4 DISCUSSÃO

Cimentos reparadores endodônticos à base de silicatos de cálcio, conhecidos como Cimentos Hidráulicos de Silicato de Cálcio (CHSCs)<sup>71</sup>, são utilizados em regiões contaminadas ou infeccionadas, como retroobturações e perfurações radiculares. Desta forma, maior atividade antimicrobiana destes materiais é desejável. Diversas associações foram propostas, principalmente com substâncias sintéticas<sup>31-34,36-38</sup>. A substância mais associada a CHSC é a Clorexidina (CLX), que demonstra aumentar a ação antimicrobiana contra diversas espécies, incluindo *E. faecalis* e *C. albicans*<sup>31-34</sup>. No entanto, a adição de CLX a CHSC influenciou negativamente nas propriedades físico-químicas e biológicas deste material<sup>36-38</sup>.

O desenvolvimento de resistência bacteriana é uma preocupação para os pesquisadores da área da saúde, que buscam substâncias alternativas<sup>72,73</sup>. Os óleos essenciais (OEs) são utilizados para o tratamento de várias doenças desde os tempos antigos. A segurança e a eficácia dos OEs foram comprovadas por ensaios clínicos<sup>41</sup>. Os OEs e polifenóis de plantas têm potencial antimicrobiano e imunomodulador no tratamento e prevenção de cáries e doenças periodontais<sup>74,75</sup>. Desta forma, na odontologia os OEs apresentam potencial para serem usados como agentes preventivos ou terapêuticos para várias doenças bucais<sup>41,76,77</sup>.

Deste modo, no presente estudo, propusemos a associação de três OEs, FAR, TEO e LEO, a dois cimentos reparadores endodônticos, MTAHP e BIO, com o objetivo de potencializar a sua limitada efetividade antimicrobiana, e avaliar a influência destas associações nas propriedades físico-químicas e potencial de biocompatibilidade e bioatividade.

FAR compromete a integridade da membrana bacteriana, é capaz de reduzir a biomassa de biofilme, e não provoca resistência bacteriana<sup>44</sup>. Em odontologia, este óleo mostrou capacidade de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* e/ou *S. mutans*<sup>46</sup>. Em endodontia, FAR foi usado como solução irrigadora, mostrando atividade antibacteriana e capacidade de reduzir a biomassa de biofilme de *E. faecalis*<sup>78</sup>, sendo recomendado como irrigador auxiliar por possuir capacidade antimicrobiana e anti-adesão de biofilme contra *E. faecalis*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*<sup>79</sup> e baixa citotoxicidade e genotoxicidade<sup>80</sup>.

TEO apresenta propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas de amplo espectro e antifúngica<sup>50-52</sup>. Em Odontologia, Carvacrol, o principal componente de TEO demonstra atividade antibacteriana e antibiofilme contra *S. mutans*, *P. gingivalis* ou *F. nucleatum*, sendo recomendado como agente alternativo para prevenir e tratar doenças periodontais em paciente implantados<sup>54</sup>. TEO como substituto de eugenol para obturação de dentes decíduos, foi eficaz contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*<sup>55</sup>.

LEO é um eficaz antifúngico e anti-inflamatório, sendo eficaz contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *A. niger*<sup>57</sup>. LEO é um potente antimicrobiano, mostrando efetividade em odontologia contra periodontopatógenos, capaz de inibir o crescimento de *P. gingivalis* e *B. megaterim*, assim como de várias cepas de *Helicobacter pylori*<sup>58</sup>; assim como capacidade antibacteriana e antibiofilme contra espécies cariogênicas, *S. mutans* e *L. acidophilus*<sup>56,58,59</sup>.

Tais achados corroboram nossos resultados, que mostraram aumento da capacidade antibiofilme dos materiais MTAHP e BIO sobre biofilme mono- e dual-espécies de *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans*, quando associados a FAR, TEO e LEO.

As propriedades físico-químicas avaliadas em nosso estudo foram tempo de presa, solubilidade e pH. O tempo de presa dos CHSCs deve ser suficiente para permitir a manipulação e uso clínico, no entanto, tempo de presa prolongado está associado a maior solubilidade<sup>81</sup>. Estudos anteriores mostraram tempo de presa de BIO entre 16<sup>82</sup> e 85.66 minutos<sup>83</sup> e de MTAHP entre 22<sup>84</sup> e 85 minutos<sup>18</sup>. Os materiais avaliados tiveram tempo de presa entre 32 e 35 minutos, sem diferença quando adicionados aos OEs. Desta forma, nossos resultados mostraram que a adição de FAR, TEO e LEO a MTAHP e BIO não prejudicou o tempo de presa dos materiais.

A capacidade de selamento pode ser associada a menor solubilidade dos materiais. A ISO 6876:2012<sup>85</sup> recomenda menos de 3% de perda de massa total para cimentos obturadores endodônticos após imersão em água destilada por 24 horas. Neste estudo foi avaliada a solubilidade de cimentos reparadores endodônticos após imersão em água durante 7 dias, a fim de observar o comportamento dos materiais após um período mais prolongado de imersão. MTAHP e suas associações ganharam massa, e BIO e suas associações perderam massa. Estes resultados estão de acordo com estudo que mostrou 1.62% de ganho de massa para MTA e 6.82% de perda de massa para BIO aos 7 dias de imersão em água<sup>86</sup>. Além disso, estudos prévios mostraram que MTAHP ganhou 2,2% de massa após imersão em água por 24 horas<sup>84</sup> e BIO mostrou perda de massa de 2.28% no mesmo período de avaliação<sup>87</sup>.

A capacidade de alcalinização de CHSC é importante, uma vez que meios alcalinos são associados a maior bioatividade osteogênica e atividade antibacteriana dos materiais<sup>88</sup>. O pH de CHSC é estudado na literatura<sup>82,89</sup>. A capacidade de alcalinização é o resultado da hidratação de silicatos que formam hidróxido de cálcio, o qual se dissocia alcalinizando o meio<sup>90</sup>. A associação de FAR, TEO e LEO em MTAHP e BIO, não prejudica a capacidade de alcalinização dos materiais. Ainda, a adição destas substâncias naturais melhora o manuseio e a consistência de MTAHP e BIO.

Os CHSCs regulam positivamente a diferenciação de osteoblastos, fibroblastos, cementoblastos, odontoblastos, células pulpares e células tronco. Eles podem induzir a

formação química de um revestimento de fosfato de cálcio/apatita quando imersos em fluidos biológicos<sup>71</sup>.

Considerando que os CHSC podem ficar em íntimo contato com osteoblastos quando utilizados clinicamente, é relevante a avaliação celular quando em contato com os materiais. Neste estudo foram utilizadas células humanas “*osteoblastic-like*” (Saos-2)<sup>91,92</sup>. Para uma avaliação confiável da citotoxicidade é interessante a realização simultânea de parâmetros celulares, podendo identificar eventuais efeitos citotóxicos e mecanismo de toxicidade dos cimentos<sup>91</sup>. Portanto, foram realizados os testes MTT e VN para avaliação da viabilidade celular em contato com os eluídos dos materiais. O teste MTT avalia a atividade metabólica celular baseada na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase que converte o sal de tetrazólio em cristais de formazán de cor violeta. A absorbância dos cristais de formazan solubilizados é proporcional ao número de células viáveis. NR é um ensaio baseado na incorporação de corante NR em lisossomos/endossomas e vacúolos de células vivas, a perda de captação de NR corresponde à perda de viabilidade celular<sup>93</sup>. No presente estudo, todos os cimentos apresentaram citocompatibilidade (MTT e NR). No entanto, a diluição 1:1 mostrou algumas diferenças; MTAHP apresentou maior viabilidade celular; a adição de FAR, TEO e LEO ao MTAHP diminuiu a viabilidade celular na diluição 1:1; por outro lado, a associação de FAR e LEO a BIO não influenciou, mas TEO aumentou a citotoxicidade de BIO sem diluição. Nas outras diluições avaliadas (1:5, 1:10, 1:15 e 1:30), a adição de FAR, TEO e LEO não interferiu na viabilidade celular. Nossos resultados dos materiais de referência MTAHP e BIO coincidem com outros estudos<sup>19,87</sup>. No entanto, não é possível uma comparação direta dos materiais associados a FAR, TEO e LEO, devido a não haver estudos similares na literatura.

A capacidade dos CHSCs de promover depósito de fosfato de cálcio sugere seu uso na remineralização da dentina e regeneração tecidual, confirmando sua capacidade de induzir a formação de tecidos mineralizados<sup>71</sup>. Portanto, foi avaliada a influência das associações propostas neste trabalho com respeito ao potencial bioativo dos materiais puros.

A capacidade de induzir tecido mineralizado foi avaliada pelos ensaios de ALP e ARS. A ALP é diretamente proporcional a biomineralização<sup>94</sup>. Houve aumento na ALP para MTAHP, MTAHP/FAR, MTAHP/TEO MTAHP/LEO, BIO e BIO/FAR, nos períodos avaliados, evidenciando um incremento na atividade da ALP com o tempo, conforme já evidenciado<sup>87,91,92</sup>. Por outro lado, a adição de TEO e LEO a BIO, diminuiu significativamente a atividade de ALP nos três períodos avaliados. Os CHSCs induzem a deposição de nódulos de cálcio quando em contato com células Saos-2<sup>91,92</sup> e células da polpa dental humana<sup>95</sup> pelo teste de ARS. Este foi realizado para ver a influência das associações propostas aos CHSCs. Após 21 dias de cultura

com os diferentes eluídos com meio osteogênico, todos os materiais induziram depósito de cálcio. MTAHP teve resultados semelhantes ao controle. As associações, FAR, TEO e LEO, ao MTAHP e ao BIO, assim como BIO produziram maior quantidade de nódulos de mineralização, evidenciando que estas substâncias naturais não interferem nesta propriedade dos CHSCs.

As Metaloproteínases de Matriz (MMPs) são a principal família de proteases responsáveis pela clivagem de proteínas, gerando moléculas bioativas<sup>96</sup>. Numerosas funções foram atribuídas a essas proteínas, incluindo diferenciação de osteoblasto/osteócito, formação óssea, solubilização do osteóide durante a reabsorção óssea, recrutamento e migração de osteoclastos e como fator de acoplamento no remodelamento ósseo em condições fisiológicas<sup>96</sup>. A literatura das MMPs em odontologia é artificialmente inclinada para as gelatinases MMP-2 e MMP-9<sup>97</sup>.

MMP-2 e 9 são normalmente encontradas no complexo dentino-pulpar, o pH neutro da dentina aumenta atividade de MMP; enquanto que em cárie, as bactérias acidificam o meio, o que baixa a atividade das MMPs. Por outro lado, a inflamação pulpar irreversível está relacionada ao desequilíbrio das MMPs. A presença de MMP-9 pode contribuir para a remodelação tecidual. Por outro lado, no tecido ósseo, a ausência de MMP-9 tem sido associada à inibição de mineralização, e o aumento de MMP-2 está relacionado a maior inflamação. Assim, para o tratamento da periodontite são usados inibidores de MPs<sup>97</sup>.

Os nossos resultados mostram que os materiais não mostraram atividade anti-MMP-9, o que poderia contribuir para a cicatrização pulpar e formação de dentina reparadora. Assim mesmo, os CHSCs avaliados foram capazes de inibir MMP-2, o que poderia ser favorável para a recuperação do tecido periodontal periapical. Não existem estudos na literatura avaliando os CHSCs com atividade de MMPs. Além das MMP-2 e 9, muitas outras estão presentes em processos fisiológicos e patológicos de dente e periodonto<sup>97</sup>. Desta forma, mais estudos nesta área seriam importantes para complementar os achados do presente estudo.

A atividade antimicrobiana e antibiofilme dos cimentos e suas associações foi avaliada contra células planctônicas e biofilme, mono- e dual-espécies, de *E. faecalis* e *C. albicans*. Estes micro-organismos são usados para avaliar o potencial antimicrobiano de materiais utilizados no tratamento endodôntico, como soluções irrigadoras, cimento obturador e reparador<sup>47,78,79</sup>. São micro-organismos que podem persistir no sistema de canais radiculares e na região perirradicular (*E. faecalis* e *C. albicans*) sendo vinculados às infecções endodônticas secundárias/persistentes<sup>98-101</sup>. Foi realizado o teste por contato direto modificado (TCDM) adaptado de Arias-Moliz et al.<sup>102</sup> (2015), por ser um método quantitativo e reproduzível, que simula o contato dos micro-organismos testados com os materiais reparadores endodônticos no

interior da retrocavidade; consiste na mensuração do crescimento microbiano pelo íntimo contato entre o micro-organismo e o material<sup>102</sup>. Após tais avaliações, nossos resultados mostraram um aumento na capacidade antibiofilme dos materiais MTAHP e BIO sobre biofilme mono- e dual-espécies de *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans*, quando associados a FAR, TEO e LEO, mostrando potencial para uso clínico, melhorando o prognóstico do tratamento.

## 5 CONCLUSÃO

A adição de OEs, Farnesol, *Thyme Essencial Oil* e *Lemongrass Essencial Oil*, aos cimentos reparadores endodônticos, MTA Repair HP e Biodentine, potencializou a atividade antibiofilme e não prejudicou as propriedades físico-químicas de tempo de presa, solubilidade e pH destes materiais. Além disso, os materiais mantiveram-se citocompatíveis e mostraram potencial bioativo.

## REFERÊNCIAS\*

1. Garcia L da F, Huck C, Scardueli CR, de Souza Costa CA. Repair of bone defects filled with new calcium aluminate cement (EndoBinder). *J Endod.* 2015; 41(6): 864-70.
2. Yassen GH, Eckert GJ, Platt JA. Effect of intracanal medicaments used in endodontic regeneration procedures on microhardness and chemical structure of dentin. *Restor Dent Endod.* 2015; 40(2): 104-12.
3. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010; 36(2): 190-202.
4. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater.* 2011; 27(8): 836-44.
5. Wu BC, Wei CK, Hsueh NS, Ding SJ. Comparative cell attachment, cytotoxicity and antibacterial activity of radiopaque dicalcium silicate cement and white-coloured mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2015; 48(3): 268-76.
6. Tu MG, Chen YW, Shie MY. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(12): 276.
7. Lai WY, Chen YW, Kao CT, Hsu TT, Huang TH, Shie MY. Human dental pulp cells responses to apatite precipitation from dicalcium silicates. *Materials (Basel).* 2015; 8(7): 4491-504.
8. Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes MH. Osteogenic and angiogenic response to calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2016; 42(1): 113-9.
9. Chang SW, Bae WJ, Yi JK, Lee S, Lee DW, Kum KY et al. Odontoblastic differentiation, inflammatory response, and angiogenic potential of 4 calcium silicate-based cements: Micromega MTA, ProRoot MTA, RetroMTA, and Experimental Calcium Silicate cement. *J Endod.* 2015; 41(9): 1524-9.
10. Chen YW, Hsu TT, Wang K, Shie MY. Preparation of the fast setting and degrading Ca-Si-Mg cement with both odontogenesis and angiogenesis differentiation of human periodontal ligament cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 60: 374-83.
11. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.* 2008; 11(4): 141-3.
12. Camilleri J. Modification of mineral trioxide aggregate. Physical and mechanical properties. *Int Endod J.* 2008; 41(10): 843-9.
13. Camilleri J, Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Dynamic sealing ability of MTA root canal sealer. *Int Endod J.* 2011; 44(1): 9-20.
14. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod.* 2007; 33(3): 295-8.

---

\* 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-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimaraes BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod.* 2014; 40(8): 1235-40.
16. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(3): 394-7.
17. Galarca AD, Da Rosa WLO, Da Silva TM, da Silveira Lima G, Carreno NLV, Pereira TM et al. Physical and biological properties of a High-Plasticity Tricalcium Silicate cement. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 8063262.
18. Guimaraes BM, Prati C, Duarte MAH, Bramante CM, Gandolfi MG. Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitalcem. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: e2017115.
19. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz IO, de Araujo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araujo G et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new High-plasticity MTA material. *J Endod.* 2017; 43(5): 774-8.
20. Camilleri J. Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod.* 2014; 40(12): 2030-5.
21. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater.* 2011; 27(9): 879-91.
22. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J.* 2014; 47(5): 437-48.
23. Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM, Hungaro-Duarte MA, Tanomaru-Filho M, Camilleri J. Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dent Mater.* 2014; 30(9): 1005-20.
24. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011; 37(2): 203-10.
25. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(1): 243-9.
26. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012; 45(5): 439-48.
27. Raskin A, Eschrich G, Dejou J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent.* 2012; 14(6): 535-42.
28. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 2012; 91(12): 1166-71.

29. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod.* 2012; 38(9): 1220-6.
30. Poggio C, Beltrami R, Colombo M, Ceci M, Dagna A, Chiesa M. In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. *J Clin Exp Dent.* 2015; 7(5): e584-8.
31. Nikhil V, Madan M, Agarwal C, Suri N. Effect of addition of 2% chlorhexidine or 10% doxycycline on antimicrobial activity of biodentine. *J Conserv Dent.* 2014; 17(3): 271-5.
32. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2004; 30(6): 429-31.
33. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod.* 2007; 33(7): 844-7.
34. Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B et al. The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dent Res J (Isfahan).* 2012; 9(4): 466-71.
35. Odabas ME, Cinar C, Akca G, Araz I, Ulusu T, Yucel H. Short-term antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate with incorporated silver-zeolite. *Dent Traumatol.* 2011; 27(3): 189-94.
36. Jacinto RC, Linhares-Farina G, Sposito Oda S, Zanchi CH, Cenci MS. Influence of 2% chlorhexidine on pH, calcium release and setting time of a resinous MTA-based root-end filling material. *Braz Oral Res.* 2015; 29 doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.
37. Yavari HR, Shahi S, Rahimi S, Shakouie S, Roshangar L, Mesgari Abassi M et al. Connective tissue reaction to white and gray MTA Mixed with distilled water or chlorhexidine in rats. *Iran Endod J.* 2009; 4(1): 25-30.
38. Manochehrifar H, Parirokh M, Kakooei S, Oloomi MM, Asgary S, Eghbal MJ et al. The effect of Mineral Trioxide Aggregate mixed with chlorhexidine as direct pulp capping agent in dogs teeth: a histologic study. *Iran Endod J.* 2016; 11(4): 320-4.
39. Hassan ST, Majerova M, Sudomova M, Berchova K. Antibacterial activity of natural compounds - essential oils. *Ceska Slov Farm.* 2015; 64(6): 243-53.
40. Knezevic P, Aleksic V, Simin N, Svircev E, Petrovic A, Mimica-Dukic N. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Ethnopharmacol.* 2016; 178: 125-36.
41. Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS, Baroudi K. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015; 5(5): 335-40.
42. Brilhante RS, de Lima RA, Marques FJ, Silva NF, Caetano EP, Castelo-Branco Dde S et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol.* 2015; 64(Pt 4): 394-9.

43. Gomes F, Leite B, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol as antibiotics adjuvant in *Staphylococcus epidermidis* control in vitro. *Am J Med Sci*. 2011; 341(3): 191-5.
44. Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Curr Microbiol*. 2011; 63(4): 354-9.
45. Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol*. 2009; 59(2): 118-22.
46. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*. 2016; 32(3): 329-38.
47. Alves FR, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res*. 2013; 27(1): 20-5.
48. Mota ML, Lobo LT, Costa JM, Costa LS, Rocha HA, Rocha e Silva LF et al. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta Med*. 2012; 78(7): 658-64.
49. Sanchez ME, Turina AV, Garcia DA, Nolan MV, Perillo MA. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004; 34(2): 77-86.
50. Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40(3): 349-56.
51. Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homooligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol*. 2003; 140(8): 1363-72.
52. de Castro RD, de Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Costa EM, Cavalcanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15: 417.
53. Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(11): 3309-12.
54. Ciandrini E, Campana R, Federici S, Manti A, Battistelli M, Falcieri E et al. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(8): 2001-13.
55. Thosar NR, Chandak M, Bhat M, Basak S. Evaluation of antimicrobial activity of two endodontic sealers: Zinc Oxide with Thyme Oil and Zinc Oxide Eugenol against root canal microorganisms - an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018; 11(2): 79-82.
56. Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res*. 2017; 31: e89.

57. Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med*. 2014; 9(1): 25431.
58. Ocheng F, Bwanga F, Joloba M, Softrata A, Azeem M, Putsep K et al. Essential Oils from Ugandan aromatic medicinal plants: chemical composition and growth inhibitory effects on oral pathogens. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 2015: 230832.
59. Tofino-Rivera A, Ortega-Cuadros M, Galvis-Pareja D, Jimenez-Rios H, Merini LJ, Martinez-Pabon MC. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *J Ethnopharmacol*. 2016; 194: 749-54.
60. Kovac J, Kovac D, Slobodnikova L, Kotulova D. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the dental root canal and periapical infections. *Bratisl Lek Listy*. 2013; 114(12): 716-20.
61. Antunes HS, Rocas IN, Alves FR, Siqueira JF, Jr. Total and specific bacterial levels in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod*. 2015; 41(7): 1037-42.
62. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Lopes WS, Vieira AR, Rocas IN. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod*. 2015; 41(2): 265-73.
63. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burlinson JA, Spangberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112(6): 825-42.
64. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod*. 2013; 39(5): 712-8.
65. Vera J, Siqueira JF, Jr., Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod*. 2012; 38(8): 1040-52.
66. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J Endod*. 2016; 42(7): 1022-8.
67. Fidalgo TK, Barcelos R, Portela MB, Soares RM, Gleiser R, Silva-Filho FC. Inhibitory activity of root canal irrigants against *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Braz Oral Res*. 2010; 24(4): 406-12.
68. Miranda TT, Vianna CR, Rodrigues L, Rosa CA, Correa A, Jr. Differential proteinase patterns among *Candida albicans* strains isolated from root canal and lingual dorsum: possible roles in periapical disease. *J Endod*. 2015; 41(6): 841-5.
69. Mohammadi Z, Shalavi S. The effect of heat-killed *Candida albicans* and dentin powder on the antibacterial activity of chlorhexidine solution. *Iran Endod J*. 2012; 7(2): 63-7.
70. Turk BT, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(3): 457-62.
71. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater*. 2015; 31(4): 351-70.

72. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin -- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol*. 2006; 101(2): 487-95.
73. Karadaglioglu OI, Ulusoy N, Baser KHC, Hanoglu A, Sik I. Antibacterial activities of herbal toothpastes combined with Essential Oils against *Streptococcus mutans*. *Pathogens*. 2019; 8(1) doi: 10.3390/pathogens8010020.
74. Bunte K, Hensel A, Beikler T. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: a systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia*. 2019; 132: 30-9.
75. Li Y, Jiang X, Hao J, Zhang Y, Huang R. Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Arch Oral Biol*. 2019; 102: 74-82.
76. Shakya VK, Luqman S, Tikku AP, Chandra A, Singh DK. A relative assessment of essential oil of *Chrysopogon zizanioides* and *Matricaria chamomilla* along with calcium hydroxide and chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis* in ex vivo root canal models. *J Conserv Dent*. 2019; 22(1): 34-9.
77. Guandalini Cunha B, Duque C, Sampaio Caiaffa K, Massunari L, Arague Catanoze I, Dos Santos DM et al. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Arch Oral Biol*. 2019; 109: 104577.
78. Alves FR, Neves MA, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2013; 24(3): 224-9.
79. Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Basso Bernardi MI, de Toledo Leonardo R, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Arch Oral Biol*. 2019; 107: 104481.
80. Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Gomes-Cornelio AL, Faria G, Bernardi MIB et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Arch Oral Biol*. 2017; 84: 89-93.
81. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(1): 83-90.
82. Lucas CP, Viapiana R, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties and dentin bond strength of a Tricalcium Silicate-based retrograde material. *Braz Dent J*. 2017; 28(1): 51-6.
83. Kaup M, Schafer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med*. 2015; 11: 16.
84. Ferreira CMA, Sassone LM, Goncalves AS, de Carvalho JJ, Tomas-Catala CJ, Garcia-Bernal D et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 3933.
85. International Organization for Standardization Dentistry (ISO). ISO 6876. Root canal sealing materials. London: British Standards Institution; 2012.

86. Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli JA, 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.
87. Ochoa-Rodriguez VM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Faria G. Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. *J Appl Oral Sci.* 2019; 27: e20180429.
88. 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.
89. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set intermediate restorative material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J.* 2013; 46(7): 632-41.
90. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013; 29(5): 580-93.
91. 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.
92. 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.
93. International Organization for Standardization Dentistry. Biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro Cytotoxicity. Geneva: ISO; 2005.
94. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010; 77(1): 4-12.
95. Rodrigues EM, Cornelio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J.* 2017; 50(8): 780-9.
96. Paiva KBS, Granjeiro JM. Matrix Metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 148: 203-303.
97. Boelen GJ, Boute L, d'Hoop J, EzEldeen M, Lambrichts I, Opdenakker G. Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(7): 2823-35.
98. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(1): 86-93.
99. Siqueira Jr. JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34(1): 1-10.
100. Rocas IN, Siqueira Jr. JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.
101. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36(8): 1277-88.

102. Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Cassar G, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ordinola-Zapata R et al. The effect of benzalkonium chloride additions to AH Plus sealer. Antimicrobial, physical and chemical properties. *J Dent.* 2015; 43(7): 846-54.

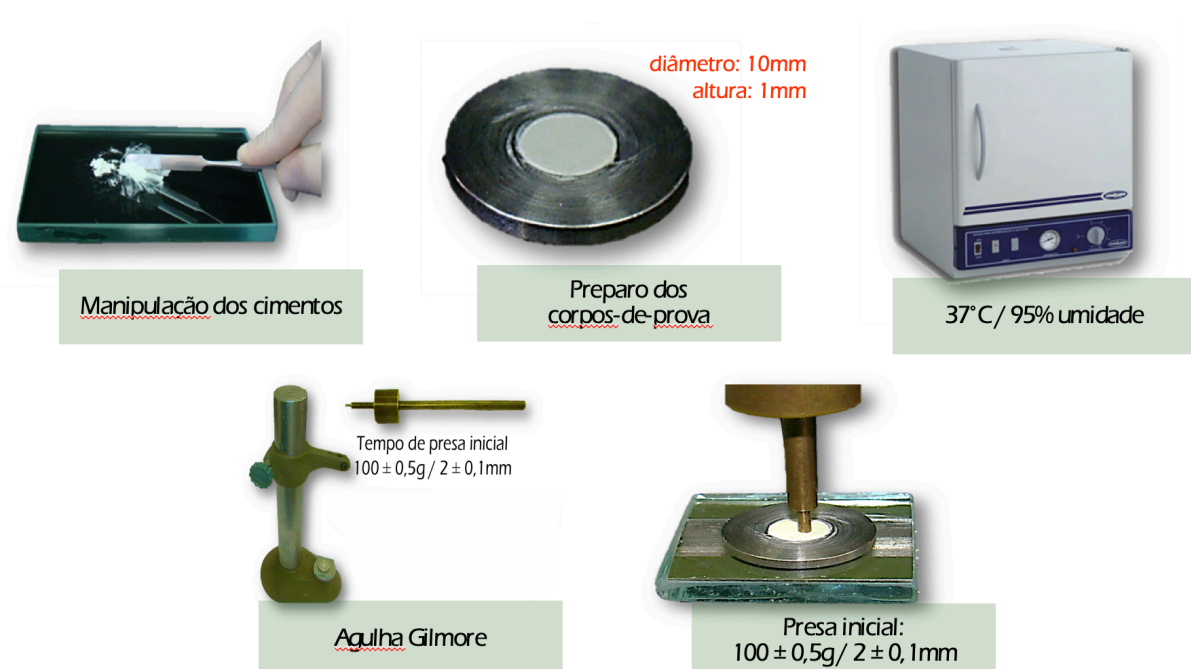
## APÊNDICE A – METODOLOGIA EXPANDIDA

### 1. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 1.1. Tempo de presa

Para determinar o tempo de presa ( $n=5$ ) foram utilizados anéis metálicos com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura, os quais foram preenchidos com o cimento a avaliar, deixando a superfície a mais lisa possível para facilitar a visualização da marca da agulha durante o teste. O tempo de manipulação, desde o começo da mistura até a acomodação nos anéis foi conferido, sendo comparado com o tempo recomendado com o fabricante, no entanto o tempo de presa foi aferido desde o momento em que o material esteve acomodado. A avaliação seguiu as especificações da ISO 6876/2012, as medições foram feitas a cada 3 minutos durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e a cada 15 minutos desse período em diante. Ao atingir a presa as medições continuaram sendo realizadas até a presa final. Para determinar a presa foi utilizada agulha de Gilmore com massa de  $100 \pm 0,5g$  e diâmetro de  $2 \pm 0,1$  mm apoiada sobre a superfície do cimento. Os materiais foram mantidos na estufa a  $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$  com 95% de umidade relativa durante a análise e a agulha foi limpa com gaze a cada medição.

**Figura 1** – Tempo de presa



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

## 1.2 Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado segundo Carvalho-Junior *et al.* (2007). Foram confeccionados corpos-de-prova com 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura ( $n=5$ ), com ajuda de um molde de silicone de adição (fluida). Um lado do molde foi cortado sem profundidade para facilitar a acomodação do fio de nylon, uma vez posicionado cada molde foi preenchido e o fio de nylon impermeável novamente acomodado no interior do material, para que fique o mais centralizado possível; foram armazenados em estufa com temperatura de 37°C e 100% de umidade, durante 3 vezes o tempo de presa (aprox. 15 horas). Os corpos-de-prova foram removidos dos moldes, colocados em dessecador a vácuo com sílica, e a massa foi mensurada em balança de precisão até obter estabilidade da massa inicial (aproximadamente 7 dias). A massa é considerada estável quando em um período de 24 horas o peso não se modifica mais que 0,001 g. Assim quando se confirmou a estabilidade da massa inicial, os corpos-de-prova foram suspensos no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 7,5 ml de água destilada e deionizada com a fixação dos fios de nylon, bem centralizados, de tal forma que os corpos-de-prova não tivessem contato com a superfície interna do recipiente. Os recipientes permaneceram em estufa a 37°C durante 7 dias, após o período, os corpos-de-prova foram removidos da água, lavados com água destilada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final (aproximadamente 15 dias). A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa original. Assim quando o resultado é positivo significa que o corpo perdeu massa, e quando negativo que ganhou.

**Figura 2 - Solubilidade**

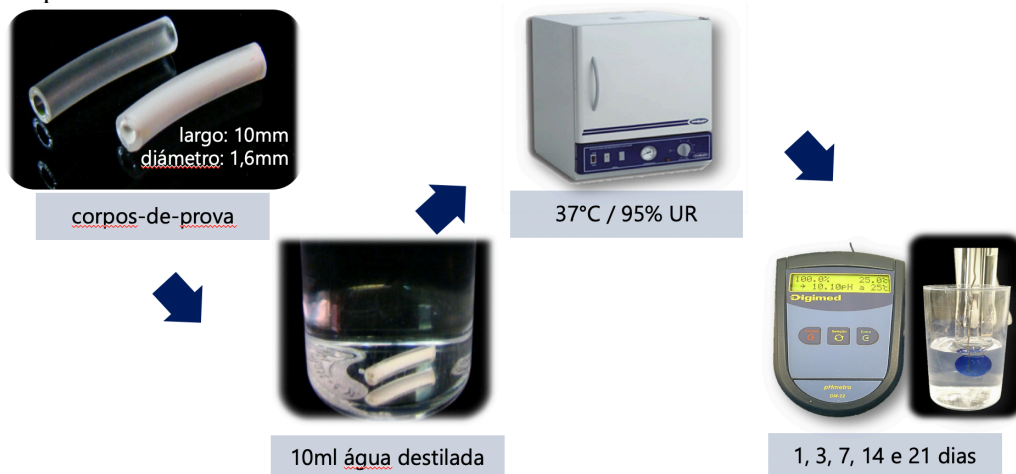


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

### 1.3 pH

Para a mensuração da capacidade de alcalinização do meio dos materiais, foi mensurado o pH da água em contato com o material. Tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n=10). Cada tubo foi imerso em 10 ml de água deionizada cujo pH foi aferido previamente (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2011) e mantido na estufa a 37°C durante os períodos experimentais. Transcorrido cada período de avaliação, 1, 3, 7, 14 e 21 dias, os tubos com o material foram transferidos para novos frascos com o auxílio de uma pinça e a solução resultante de cada um dos frascos utilizados foi utilizada para realizar a aferição do pH, realizada com pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente, 25°C. Previamente à aferição do pH, o dispositivo foi calibrado com soluções-tampão de pH 4, 7 e 10 e estas foram utilizadas para calibragem do pHmetro durante todo o período experimental. Após as mensurações em triplicata, os dados foram tabulados e analisados estatisticamente.

**Figura 3 – pH**



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

## 2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL BIOATIVO

Para a análise da citotoxicidade e bioatividade celular. Foram utilizadas as células imortalizadas SAOS-2 (células osteoblásticas derivadas de osteossarcoma humano).

### 2.1 Preparo dos Eluídos dos Cimentos

Nessa etapa, 0,5 g de cada material foram manipulados nas devidas proporções (Tabela 1) e acomodados no fundo do poço de placas de cultura de 12 poços, mantidos na estufa a 37°C e 95% de umidade por 15 h para completa presa. Depois as placas foram expostas a luz U.V.

durante 30 minutos para prevenção de contaminação, sendo então colocados 5 ml de meio de cultura D-MEM sem soro fetal bovino (SFB- Gibco/Life Technologies) em contato com os materiais por 24 h em estufa (37°C, 95% umidade e 5%CO<sub>2</sub>) para obtenção do eluído de cada material.

## 2.2 Cultura de Células

Foram utilizadas células osteoblásticas humanas (SAOS-2, linha ATCC HTB-85) por meio de monocamada em frascos T-75 (Corning, Union City, CA), contendo meio de cultura D-MEM (Sigma/Aldrich) suplementado com 10% de SFB, penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100 mg/ml). As células foram cultivadas duas vezes por semana a 37°C, 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub>. As células aderentes em fase logarítmica de crescimento foram removidas por uma mistura de tripsina/EDTA 0,25% (Gibco- BRL, Gaithersburg, MD) a 37°C durante 3 minutos, para depois ser distribuídas nas placas de cultura específica para cada ensaio na concentração necessária.

**Figura 4** – Cultura de células e preparo dos eluídos



Fonte: Elaboração própria

## 2.3 Ensaios de Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada com os ensaios de MTT (3-(4,5-dimetyl-thiazoyl)-2,5-diphentl-tetrazolium bromide) e Vermelho Neutro. As células foram plaqueadas a concentrações de  $1 \times 10^5$  em placa de 96 poços contendo meio de cultura D-MEM 5% SFB por 24 h a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> para obter células aderidas antes da exposição ao material. SAOS-2 serão expostas aos eluídos dos materiais nas concentrações de 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 e 1:30, como controle negativo foi utilizado DMEM sem soro e como controle positivo Dimetilsilfóxico (DMSO). durante 24 h, de acordo com a ISO 10993-5 /2009.

### 2.3.1 Ensaio de MTT

MTT está baseado na conversão do sal de tetrazólio para cristais violetas insolúveis de fromazan, determinando a citotoxicidade pela taxa de viabilidade celular. Para este ensaio, os

eluídos dos cimentos foram trocados por 100  $\mu$ l de uma solução de D-MEM sem SFB contendo 5 mg/ml de MTT e as placas incubadas por 3h, a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Depois disso, o conteúdo dos poços foi removido e o produto colorimétrico solubilizado em 100  $\mu$ l de isopropanol acidificado 0.04 N (Sigma-Aldrich). As densidades óticas das soluções foram mensuradas no espectrofotômetro (Elx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT, USA) a 570nm de comprimento de onda (Yoshino *et al.*, 2013). As leituras da absorbância foram normalizadas com o grupo de células expostas a D-MEM (controle), e representou a atividade das células viáveis.

### 2.3.1 Ensaio de Vermelho Neutro

Vermelho Neutro é um corante vital que é incorporado através de endocitose e acumulado no lisossomo de células que possuem suas membranas intactas. Para este ensaio, o eluído dos cimentos foi trocado por uma solução de 0.1 ml de meio D-MEM contendo 50  $\mu$ g VN/ml (Sigma-Aldrich) e as placas incubadas a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 h. Depois, o conteúdo dos poços foi removido e o produto colorimétrico solubilizado em 100  $\mu$ l de solução de etanol (50% etanol e 1% ácido acético) (Sigma-Aldrich). As densidades óticas das soluções foram mensuradas com espectrofotômetro (Elx800) a 570nm (Scelza *et al.*, 2012).

**Figura 5** – Ensaio de citotoxicidade



## 2.4 Ensaios de Bioatividade Celular

A bioatividade foi avaliada com o ensaio da atividade enzimática da fosfatase alcalina e ensaio de Vermelho de Alizarina.

### 2.4.1 Ensaio da Atividade Enzimática da Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é um dos principais marcadores da atividade osteoblástica, presente no processo de mineralização. Sua atividade é avaliada através da formação de timolftaleína, de cor azul, para o qual foi utilizado o kit Fosfatase Alcalina (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Após contagem e plaqueamento das células ( $5 \times 10^4$  células/mL) em placas de 96 poços, foram incubadas 24 horas; para depois ser expostas aos diferentes eluídos dos cimentos avaliados na concentração de 1:15, durante os períodos de 1, 3 e 7 dias. Após cada período, o eluído dos cimentos foi removido e a monocamada de células lavada com 200  $\mu$ l de PBS 1X. Em seguida, foram acrescentados 200  $\mu$ l de uma solução de Lauril sulfato de sódio (Sigma/Aldrich) 1% a cada poço. Após 30 minutos a temperatura ambiente, 12,5  $\mu$ l do conteúdo de cada poço foi transferido para tubos eppendorf contendo, tampão e substrato da enzima, conforme o procedimento padrão do KIT. Os eppendorfs foram incubados 10 minutos a 37°C e 500  $\mu$ l do reagente de cor foram adicionados. Para a obtenção dos resultados, 100  $\mu$ l de cada eppendorf foram passados a uma placa de 96 poços para leitura em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT), com densidade de onda de 590nm, e os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas. O experimento foi realizado em triplicata.

A quantificação da enzima é dada pela seguinte fórmula:

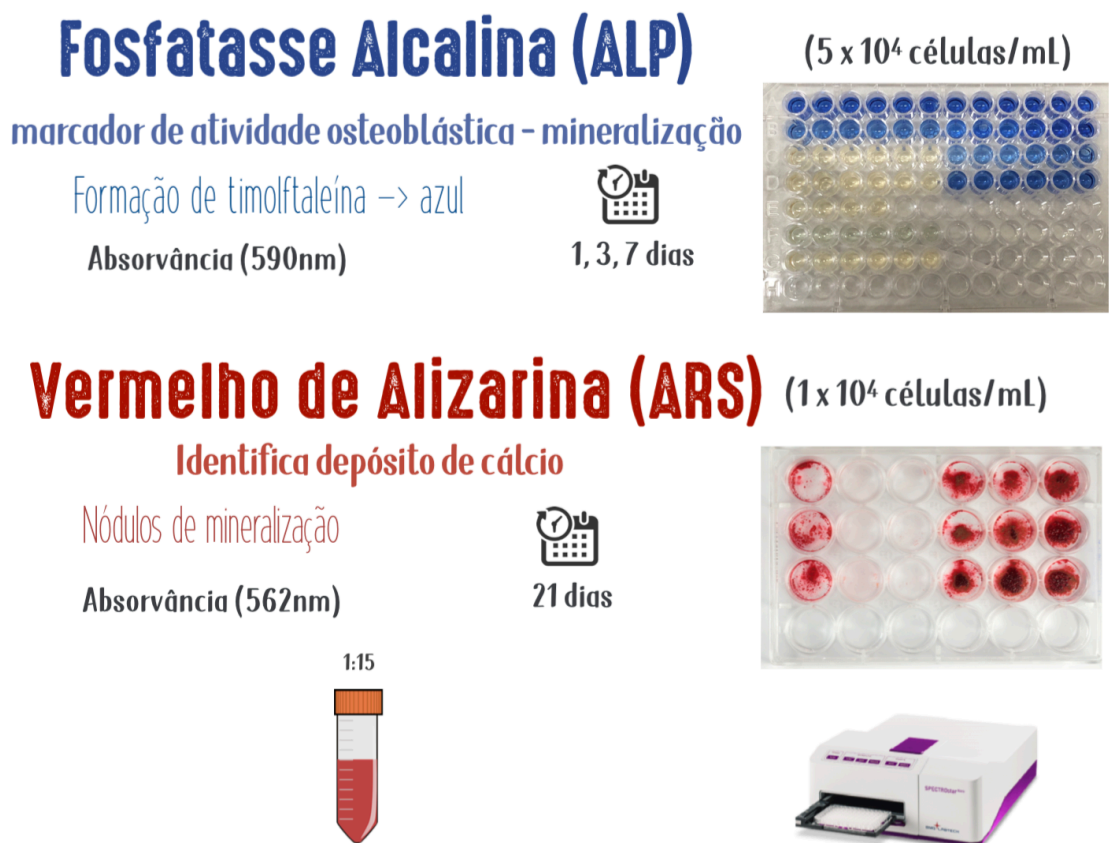
$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \text{Abs da amostra} / \text{Abs padrão} \times 45$$

### 2.4.2 Ensaio De Vermelho de Alizarina

O corante vermelho de alizarina é usado para identificar o depósito de cálcio em cultura de células. As células foram contadas e plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/mL) em placas de cultura de 24 poços (n=3). Durante 21 dias, o meio de cultura D-MEM osteogênico (D-MEM 10% SFB; 100 IU/ml penicilina; 100mg/ml estreptomicina; 0.023 g/ml  $\beta$ -glicerolfosfato; 0.055 mg/ml ácido ascórbico – Sigma/Aldrich) com o substrato dos materiais, em diluição 1:15, foi renovado a cada 48h. O meio foi aspirado, os poços lavados com PBS 1X e as células fixadas com 10% de paraformaldeído (Sigma/Aldrich) a temperatura ambiente por 15 minutos. As monocamadas

foram lavadas 2 vezes com água destilada para a posterior adição de 500  $\mu$ L 40 mM Alizarin Red S (2%/pH 4.1). As placas ficaram a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a aspiração do corante, os poços foram lavados cuidadosamente 2 vezes com 1 ml de água destilada. As placas foram deixadas 2 minutos a temperatura ambiente para secagem, e imediatamente depois fotografadas (Canon EOS Rebel T5i, Canon Inc, Tokyo, Japan). Em seguida, a mineralização foi quantificada pela dissolução dos nódulos com 0,5 mL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridínio (Sigma-Aldrich). Três alíquotas de 100  $\mu$ L da ressuspensão de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 562nm de comprimento de onda. Os ensaios foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ) e repetido três vezes em tempos independentes.

**Figura 6** – Ensaio de bioatividade celular



Fonte: Elaboração própria

### 2.5 Atividade Anti-MMP

A capacidade de inibição de Metaloproteinases de Matriz (MMP) foi realizado segundo Gutierrez *et al.* 2019 usando MMP-2 e MMP-9 recombinante com kits fluorométricos de MMP (SensoLyte assay kits; AnaSpec, Fremont, CA, USA), seguindo as recomendações do

fabricante. Os materiais foram manipulados (tabela 1) para obtenção dos eluídos dos cimentos na mesma concentração utilizada nos ensaios anteriores, e as MMP ativadas (pré-incubadas com 10mM de amino-phenyl mercuric acetate (APMA)) foram misturados com substrato peptídico de transferência de energia de ressonância de fluorescência 5-FAM / QXLTM 520 (FRET) em tampão de ensaio usando placas de 96 poços. Para o peptídeo FRET intacto, a fluorescência de 5-FAM foi anulada por QXL 520. Após a clivagem em 2 fragmentos separados por MMPs, a fluorescência de 5-FAM foi recuperada e monitorada em comprimentos de onda de excitação/emissão (490/520nm, respectivamente). Após 1 h de incubação, o sinal de fluorescência foi lido por um leitor de microplacas (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EUA) e expresso como unidades fluorescentes relativas (RFU) MMPs ativas diluídas foram usadas como controle positivo; O Ilomastat 25µM foi usado como controle inibidor, e os controles do composto de teste sem MMP foram adicionados para avaliar sua autoimunofluorescência. Foram realizadas seis amostras de cada grupo para cada ensaio de MMP.

**Figura 7 – Atividade anti-MMP**

## Kit de MMP - 9 e 2

Metaloproteinase de Matriz

Principal família de proteases responsáveis pela clivagem de proteínas, gerando moléculas bioativas

Presentes em processos:  
diferenciação de osteoblasto/osteócito,  
remodelação óssea (formação e reabsorção).

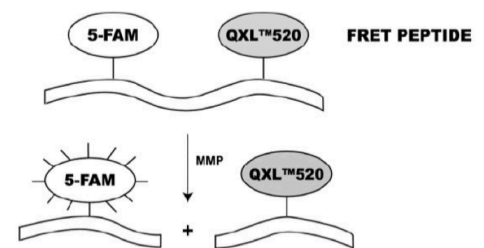


Incubação 1 hora



Fluorescência excitação/emissão (490/520nm)  
Relative Fluorescence Units (RFU)

kits fluorométricos de MMP recombinante



Ilomastat 25µM - controle inibidor

### 3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

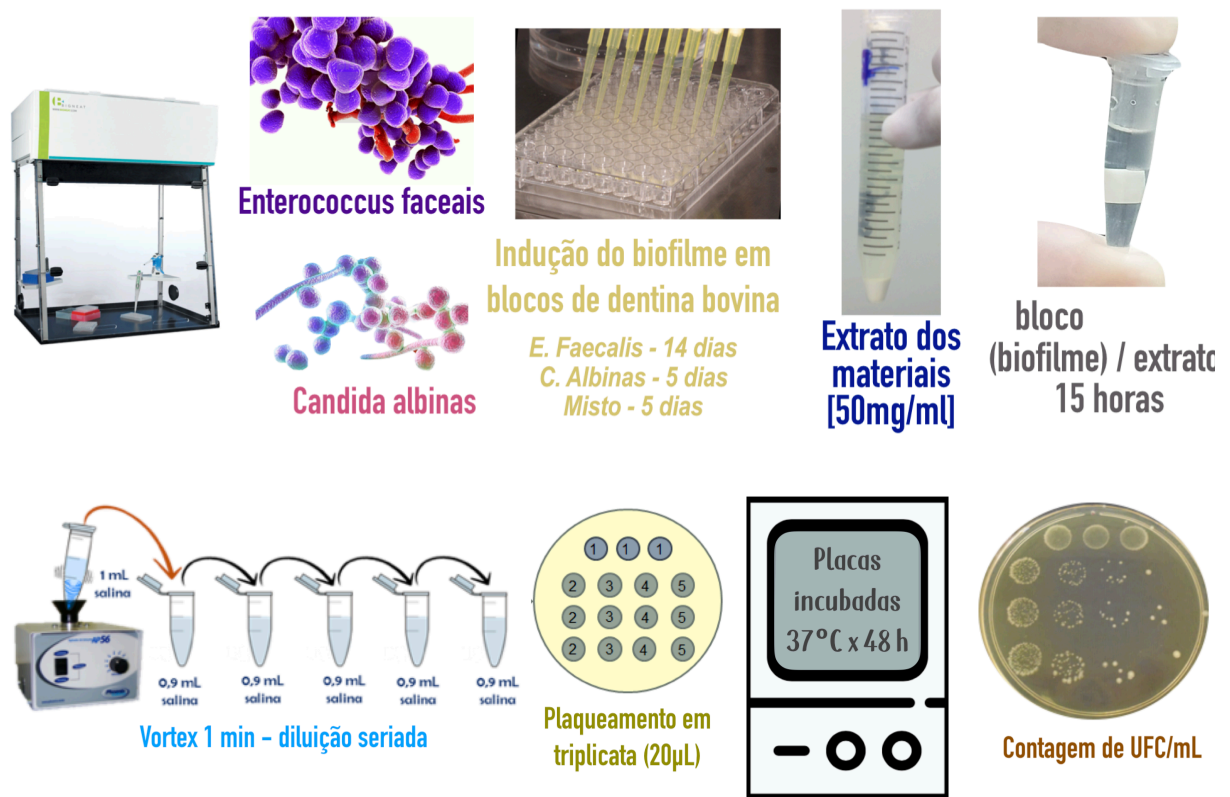
Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Telstar Technologies, S.L.–BV 100, Terrassa, Espanha). Foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Cultura pura *E. faecalis* foi cultivada *overnight* em Tryptic Soy Broth-TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) e de *C. albicans* cultivada em Sabouraud Dextrose Broth – SB (Difco, Detroit, MI, EUA). Os inóculos foram preparados a partir de suspensões microbianas preparadas e ajustadas a uma densidade óptica equivalente a  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, tanto para os biofilmes mono-espécie como para os dual-espécies.

#### 3.1 Atividade Antibiofilme: Teste de Contato Direto Modificado (TCDM)

Blocos de dentina esterilizados medindo 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura) foram submersos em TSb (2 mL) contendo 1% do inóculo ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) nos biofilmes de *E. faecalis*, com trocas do meio de cultura total a cada 48 horas. Os biofilmes de *C. albicans* e os biofilmes com as duas cepas associadas, foram induzidos utilizando meio de cultura RPMI-1640 (+L-glutamine, +25mM HEPES buffer, -sodium bicarbonate) (Gibco, R 23400-013 1L, Life Technologies, USA) e 28 g de glicose, com inóculos na concentração citada acima e trocas a cada 24 h. Os três tipos de biofilmes foram desenvolvidos em Placas de cultura de 24 poços. As placas foram mantidas em ambiente microaerófilo por 14 dias para o biofilme mono-espécie de *E. faecalis*, e em aerofilia por 5 dias para os biofilmes mono-espécie de *C. albicans* e dual de *E. faecalis/C. albicans*. Todos biofilmes foram mantidos em incubadora de bancada shaker (Modelo 0816M28, Quimis aparelhos científicos LTDA, Diadema, SP, Brasil) a 37°C com 80rpm. Após os períodos de indução, os eluídos dos materiais foram preparados, em concentração de 50mg/mL. Os materiais foram manipulados segundo as proporções da Tabela 1, colocados em tubo falcon de 15 mL com 10 mL de água destilada e imediatamente misturados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), mantidos em estufa a 37°C durante 48 h. Em seguida, os blocos de dentina com biofilme formado foram lavados uma vez em PBS para remoção de células microbianas não aderidas e colocados individualmente em um eppendorf de 0,5 mL com 400µL de eluído dos materiais, os quais permaneceram em contato por 15 h, para o controle foi utilizado água destilada. Após este período, cada bloco de dentina foi colocado em um microtubo contendo 1 mL de solução salina e pérolas de vidro e foram agitados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda.,

Diadema, SP, Brasil). Posteriormente, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento de três alíquotas de 20 $\mu$ L de cada uma das suspensões, em placas de Petri contendo meio de cultura de Tryptic Soy Agar (TSa), para *E. faecalis* do biofilme mono-espécie; Sabouraud Dextrose Agar (SBA), para *C. albicans* do biofilme mono- e dual-espécie e m-Enterococcus Agar para isolamento de *E. faecalis* do biofilme dual-espécie. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Foi realizada contagem de UFC/mL e os dados foram submetidos à transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ).

**Figura 8** – Teste de contato direto modificado



Fonte: Elaboração própria

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 23 de março de 2020.**

**Gabriela Mariana Castro Núñez**