



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



Cristiane Lopes Zordan Bronzel

Avaliação de propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas de cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio e novos cimentos endodônticos biocerâmicos em associação a agente antimicrobiano

Araraquara

2021



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



Cristiane Lopes Zordan Bronzel

Avaliação de propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas de cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio e novos cimentos endodônticos biocerâmicos em associação a agente antimicrobiano

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2021

B869a

Bronzel, Cristiane Lopes Zordan

Avaliação de propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas de cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio e novos cimentos endodônticos biocerâmicos em associação a agente antimicrobiano / Cristiane Lopes Zordan Bronzel. -- Araraquara, 2021

104 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Endodontia. 2. Materiais dentários. 3. Propriedades físicas e químicas. 4. Enterococcus faecalis. 5. Candida albicans. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Cristiane Lopes Zordan Bronzel

Avaliação de propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas de cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio e novos cimentos endodônticos biocerâmicos em associação a agente antimicrobiano

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutora em Endodontia

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

2º Examinador: Prof. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo

3º Examinador: Profa. Dra. Roberta Bosso Martelo

4º Examinador: Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis

Araraquara, 13 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES

Cristiane Lopes Zordan Bronzel

NASCIMENTO: 02 de dezembro de 1981, em Mogi-Mirim, São Paulo, Brasil

FILIAÇÃO: Leonilda Aparecida Lopes (*in memoriam*)
Antônio Hélio Zordan (*in memoriam*)

2000 - 2003: Graduação em Odontologia, Universidade Paulista, Ribeirão Preto, SP.

2004 - 2004: Curso de Aperfeiçoamento - Endodontia em dentes com raízes múltiplas, Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas, São Paulo, SP.

2007 - 2007: Curso de Aperfeiçoamento - Prótese sobre implantes, Instituto de Ciência em Implantologia e Reabilitação Oral, Ribeirão Preto, SP.

2010 - 2011: Especialização em Odontologia do Trabalho, Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, Campinas, SP.

2014 - 2014: Curso de Extensão Universitária em Endodontia, Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia, FAEPO, Araraquara, SP.

2015 - 2017: Especialização em Endodontia, Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas, Araraquara, SP.

2016 - 2018: Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP.

2018 - atual: Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP.

Dedico este trabalho à minha filha **Laura**, que trouxe mais luz e cor para minha vida,
e me possibilitou conhecer o verdadeiro significado da palavra **AMOR**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** por me conceder saúde, sabedoria, intuição, disciplina e disposição.

Agradeço à minha mãe, **Leonilda** (*in memoriam*), por todo seu amor, dedicação, pela educação que me deu, por sempre estar ao meu lado me apoiando em cada momento, por todos os conselhos, e pelo seu exemplo de vida, força e dignidade. Agradeço ao meu pai, **Antônio** (*in memoriam*), por todo seu amor e carinho de sempre.

Ao meu querido e amado esposo **João**, por estar sempre ao meu lado me amparando em todos os momentos, por toda sua dedicação como esposo e pai, por todo amor, carinho, incentivo, compreensão e paciência.

À toda minha família pelo amor, apoio e compreensão, em especial aos meus irmãos **Marcelo** e **Marcos**, que sempre foram mais que irmãos, sendo também amigos, companheiros, conselheiros e até mesmo um pouco pais. Ao **Marcelo** que tanto me ajudou e possibilitou que eu me formasse Cirurgiã-Dentista. À minha cunhada **Melissa**, minha quase irmã, amiga e conselheira, por todo seu carinho e apoio de sempre.

Aos meus sogros **João** e **Márcia**, por todo apoio, carinho e compreensão.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pela oportunidade, confiança em mim e no meu trabalho, pela amizade, dedicação, por todo o carinho por mim e pela Laurinha, pelo incentivo, apoio e compreensão. Só tenho a agradecer a senhora, por ter me mostrado que realizar tudo isso seria possível, e por todos os ensinamentos ao longo destes anos, que tornou possível não apenas a construção deste trabalho, mas me proporcionou também obter muito conhecimento e crescimento profissional e pessoal.

Ao **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho** pelo incentivo, por todo apoio de sempre, pela dedicação, paciência, carinho, amizade e por compartilhar seus conhecimentos. Obrigada por me auxiliar e incentivar sempre na busca pela excelência.

Ao longo destes anos aprendi que ninguém faz nada sozinho, e eu tive o privilégio de trabalhar com pessoas muito especiais, que muito me ensinaram, e pelas quais tenho muito carinho e admiração. A começar pela **Roberta Bosso Martelo**, minha conterrânea, que tão bem me recebeu quando cheguei na pós-graduação, e tanto me ensinou. Agradeço muito a **Gisselle M. Chávez Andrade** que acabou se

tornando uma grande amiga, e muito me ajudou em diversos momentos, se mostrando sempre muito solícita. Obrigada Gi, pelo carinho por mim e pela minha pequena! Sou muito grata a **Elisandra Márcia Rodrigues** por toda sua ajuda e por todos os ensinamentos nos estudos com células. Obrigada pela sua paciência, dedicação, pela amizade, pelos conselhos e pelo carinho de sempre por mim e pela Laurinha. Agradeço muito a **Fernanda Ferrari Esteves Torres**, por sua amizade, paciência, pelo carinho, por todo o conhecimento compartilhado, pelo auxílio e amparo de sempre, especialmente nos momentos mais difíceis. Saibam que vocês têm um lugar especial no meu coração e eu quero manter essa amizade pela vida toda.

A pós-graduação me presenteou ainda com amizades que acabaram se tornando praticamente parte da família, especialmente depois do nascimento da Laura. A **Mariana Mena Barreto**, a **Kennia Scapin Viola**, a **Maria Luiza Gioster**, minhas amigas tão queridas, que tanto me apoiaram em diversos momentos, sempre prontas a ajudar. A **Mariana** ainda trouxe para o nosso convívio o seu esposo, **Gabriel**, que acabou se tornando nosso grande e querido amigo! Muito obrigada pela amizade por todo o carinho por mim e por minha família!

Sou muito grata aos meus colegas pós-graduação, **Camila Espir**, **Lauriê G. Belizário**, **Tiago S. Fonseca**, **Giselle Abi Rached**, **Rafaela N. H. Inada**, **Mateus M. Delfino**, **Lívia B. Campi**, **Jader Camilo Pinto**, **Hernán Coaguila Llerena**, **Marcela Borsatto Queiroz**, **Victor M. O. Rodriguez**, **Evelin C. A. Silva**, **Airton O. Santos Júnior**, **Karina I. M. C. Tavares**, **Igma de Araújo**, **Camila Soares**, **Jéssica Arielli Pradelli**, **Gabriela M. C. Núñez** e **Raqueli Viapiana**, por compartilhar conhecimentos, pela amizade e por todo carinho por mim e pela Laurinha, desde que ela ainda estava na barriga!

Agradeço ao **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, ao **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, e à **Profa. Dra. Gisele Faria**, pela oportunidade de conviver com vocês e pelos ensinamentos compartilhados.

Infelizmente a pandemia acabou impedindo nossa convivência, que nos proporcionava, quando estávamos na sala da pós-graduação ou na salinha do café, dividir experiências, porém vou levar sempre comigo todo o carinho que tenho por vocês todos, estarei sempre torcendo pela felicidade e pelo sucesso de cada um de vocês!

Agradeço à técnica responsável pelos escaneamentos em micro-CT, **Me. Luana Elis Sabino**, pela dedicação e paciência, que em muito contribuíram para este trabalho.

À **Profa. Dra. Taylane Soffener Berlanga de Araújo**, que ainda durante a graduação fez despertar em mim o desejo de um dia seguir a carreira acadêmica. Ao **Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard**, ao **Prof. Dr. Fernando Simões Crisci** e à **Prof. Esp. Maria Alice Altarugio Godoy**, pois foi os observando durante o curso de especialização que fez crescer em mim ainda mais o amor pela endodontia e o desejo de seguir a carreira acadêmica.

Aos professores que compuseram a banca do exame de qualificação, **Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis** e **Dra. Elisandra Márcia Rodrigues**, pelas considerações que tanto colaboraram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores que aceitaram o convite para compor a banca de defesa desta tese de doutorado, **Prof. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo**, **Profa. Dra. Roberta Bosso Martelo** e **Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis** pela disponibilidade em contribuir para melhorar nossos trabalhos.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr, Universidade Estadual Paulista - UNESP, representada pelo Prof. Dr. Edson Alves de Campos e pela Profa. Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia, pela infraestrutura desta instituição que foi como minha segunda casa. Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia - FOAr/UNESP, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli. Aos funcionários da pós-graduação José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier por toda paciência e dedicação com a qual exercem suas funções. Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, em especial à Creusa Hortenci, ao Vandelei José Antônio da Silva e à Dona Cida por todo trabalho e dedicação ao nosso departamento. Às funcionárias da biblioteca da FOAr, em especial à Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas pela paciência e disposição em ajudar sempre que precisei.

À **CAPES**:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.” *

* Isaac Newton.

Bronzel CLZ. Avaliação de propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas de cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio e novos cimentos endodônticos biocerâmicos em associação a agente antimicrobiano [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Foram analisados novos cimentos biocerâmicos disponíveis no mercado. Avaliou-se ainda, a associação de hipoclorito de cálcio a um cimento experimental à base de silicatos de cálcio e ao Bio-C Sealer. **Publicação 1** - avaliação das propriedades físico-químicas do Bio-C Sealer (BCS), em comparação ao TotalFill BC Sealer (TF) e AH Plus (AHP). Avaliou-se tempo de presa (n=6), escoamento (n=10), pH (n=10), radiopacidade (n=6), solubilidade (n=6) e alteração volumétrica (n=6). Os dados obtidos foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). BCS e TF apresentaram valores similares de pH, radiopacidade e alteração volumétrica. BCS apresentou o menor tempo de presa, e maior escoamento e solubilidade. AHP demonstrou maior radiopacidade, e menor escoamento, pH, solubilidade e alteração volumétrica. Embora BCS tenha demonstrado elevada solubilidade, ele apresentou baixa alteração volumétrica, pH alcalino, além de escoamento, radiopacidade e tempo de presa adequados. **Publicação 2** – avaliação das propriedades físico-químicas, citocompatibilidade e atividade antimicrobiana do Sealer Plus BC (SPBC), em comparação ao TotalFill BC Sealer (TF) e AH Plus (AHP). Avaliou-se tempo de presa (n=6), escoamento (n=10), pH (n=10), radiopacidade (n=6), solubilidade (n=6), alteração volumétrica (n=6), citocompatibilidade (n=6), e atividade antibiofilme contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* a partir do teste de contato direto modificado (TCDM) (n=6) e ensaio cristal violeta (CV) (n=8). Os dados foram submetidos aos testes ANOVA/Tukey (testes físico-químicos), ANOVA/Bonferroni (testes de citocompatibilidade), e Kruskal-Wallis e Dunn (testes microbiológicos) ($\alpha=0.05$). SPBC apresentou tempo de presa, radiopacidade, escoamento e pH adequados. Solubilidade do SPBC foi maior que a do AHP. Os três materiais apresentaram alteração volumétrica semelhante. SPBC demonstrou citocompatibilidade e atividade antibiofilme. Apesar de o SPBC ter apresentado maior solubilidade, as demais propriedades físico-químicas foram satisfatórias, além de apresentar citocompatibilidade e atividade antibiofilme. **Publicação 3** – avaliação das propriedades físico-químicas, atividade antimicrobiana e citocompatibilidade de um cimento endodôntico experimental à base de silicatos de cálcio (ECS) e do Bio-C Sealer (BCS), com ou sem associação a 2% de hipoclorito de cálcio (CH), em comparação ao AH Plus (AHP). Foram analisados tempo de presa (n=6), escoamento (n=10), radiopacidade (n=6), alteração volumétrica (n=6), solubilidade (n=6), pH (n=10), citocompatibilidade (n=6) e atividade antimicrobiana por TCDM (n=6), frente aos biofilmes de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*. ANOVA e Tukey, Kruskal-Wallis e Dunn; e ANOVA e Bonferroni foram aplicados ($\alpha=0.05$). Tempo de presa de ESC-CH foi menor que de ESC, e do BCS-CH foi semelhante ao BCS. A solubilidade de ESC-CH foi menor que do ESC, e a do BCS-CH foi menor que do BCS em 7 dias. ESC, BCS, ESC-CH e BCS-CH apresentaram radiopacidade e escoamento adequados, além de pH alcalino e baixa alteração volumétrica. ECS, ECS-CH, BCS, BCS-CH e AHP não demonstraram efeito citotóxico para Saos-2. BCS-CH apresentou maior efeito contra o biofilme de *E. faecalis* que BCS. A associação ao hipoclorito de cálcio diminuiu o tempo de presa e solubilidade do ESC, mantendo atividade antimicrobiana e

citocompatibilidade. CH proporcionou maior atividade antibiofilme ao cimento BCS, sem prejudicar as demais propriedades avaliadas.

Palavras-chave: Endodontia. Materiais dentários. Propriedades físicas e químicas. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*

Bronzel CLZ. Evaluation of physicochemical, biological and microbiological properties of hydraulic calcium silicate-based experimental sealer and new bioceramic endodontic sealers in association with an antimicrobial agent [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

New bioceramic sealers available on the market were analyzed. The association of calcium hypochlorite with a calcium silicate-based experimental sealer and with Bio-C Sealer was also evaluated. **Publication 1** - evaluation of the physicochemical properties of Bio-C Sealer (BCS) compared to TotalFill BC Sealer (TF) and AH Plus (AHP). Setting time (n=6), flow (n=10), pH (n=10), radiopacity (n=6), solubility (n=6) and volumetric change (n=6) were evaluated. The obtained data were analyzed by ANOVA and Tukey tests ($\alpha=0.05$). BCS and TF showed similar values of pH, radiopacity and volumetric change. BCS had the shortest setting time, and the highest flow and solubility. AHP showed higher radiopacity, and lower flow, pH, solubility, and volumetric change. Although BCS showed high solubility, it showed low volumetric change, alkaline pH, in addition to adequate flow, radiopacity and setting time. **Publication 2** - evaluation of physicochemical properties, cytocompatibility and antimicrobial activity of Sealer Plus BC (SPBC), in comparison to TotalFill BC (TF) Sealer and AH Plus (AHP). Setting time (n=6), flow (n=10), pH (n=10), radiopacity (n=6), solubility (n=6), volumetric change (n=6), cytocompatibility (n=6), and antibiofilm activity against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* from the modified direct contact test (TCDM) (n=6) and crystal violet test (CV) (n=8) were evaluated. The data were submitted to ANOVA/Tukey tests (physical-chemical tests), ANOVA/Bonferroni (cytocompatibility tests), and Kruskal-Wallis and Dunn (microbiological tests) ($\alpha=0.05$). SPBC showed adequate setting time, radiopacity, flow and pH. The solubility of SPBC was greater than that of AHP. The three materials showed a similar volumetric change. SPBC demonstrated cytocompatibility and antibiofilm activity. Although SPBC showed higher solubility, the other physicochemical properties were satisfactory, in addition to presenting cytocompatibility and antibiofilm activity. **Publication 3** - evaluation of the physicochemical properties, antimicrobial activity and cytocompatibility of a calcium silicate-based experimental sealer (ECS) and Bio-C Sealer (BCS), with or without association with calcium hypochlorite (CH) 2% compared to AH Plus (AHP). Were analyzed setting time (n=6), flow (n=10), radiopacity (n=6), volumetric change (n=6), solubility (n=6), pH (n=10), cytocompatibility (n=6) and antimicrobial activity, by TCDM (n=6), against *E. faecalis* and / or *C. albicans* biofilms. ANOVA and Tukey, Kruskal-Wallis and Dunn; and ANOVA and Bonferroni were applied ($\alpha = 0.05$). ESC-CH setting time was shorter than ESC, and BCS-CH was similar to BCS. The solubility of ESC-CH was lower than that of ESC, and that of BCS-CH was lower than that of BCS in 7 days. ESC, BCS, ESC-CH and BCS-CH showed adequate radiopacity and flow, in addition to alkaline pH and low volumetric change. ECS, ECS-CH, BCS, BCS-CH and AHP did not demonstrate cytotoxic effect for Saos-2. BCS-CH had a greater effect against *E. faecalis* biofilm than BCS. The association with calcium hypochlorite decreased the setting time and solubility of ESC, maintaining antimicrobial activity and cytocompatibility. CH provided greater antibiofilm activity to BCS cement, without harming the other properties evaluated.

Keywords: Endodontics. Dental materials. Physical and chemical properties. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	19
2.1 Proposição Geral.....	19
2.2 Proposições Específicas.....	19
3 PUBLICAÇÕES	20
3.1 Publicação 1	20
3.2 Publicação 2	32
3.3 Publicação 3	50
4 DISCUSSÃO	73
5 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICES	83
ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

A obturação dos canais radiculares visa o melhor selamento possível do espaço endodôntico, a fim de evitar a recontaminação microbiana^{1,2}. Os cimentos endodônticos com características físico-químicas e biológicas adequadas podem contribuir significativamente para o sucesso da terapia endodôntica³. Os materiais à base de silicatos de cálcio merecem destaque pela capacidade de selamento e biocompatibilidade⁴.

Os cimentos à base de silicatos de cálcio foram introduzidos na odontologia na década de 1990, após os estudos de Torabinejad, que resultaram no desenvolvimento do MTA (Agregado Trióxido Mineral)^{5,6}. Este cimento foi utilizado inicialmente como material reparador, em casos de perfuração radicular⁷. Suas propriedades hidráulicas, capacidade de selamento e potencial bioativo, proporcionaram novas aplicações clínicas como proteção pulpar direta e indireta em dentes decíduos e permanentes, apicigênese, apicificação e obturação dos canais radiculares^{4,8}.

Os materiais de primeira geração eram constituídos basicamente por cimento Portland (80%) e o agente radiopacificador óxido de bismuto (20%)^{2,9}. No entanto, estes materiais apresentavam algumas características desfavoráveis como possibilidade de conter metais pesados e contaminantes¹⁰, dificuldade de manipulação e inserção², além de alteração na coloração dentária, causada pelo óxido de bismuto¹¹.

Novos materiais foram desenvolvidos na segunda geração, também denominados biocerâmicos². Estes cimentos apresentam silicato tricálcico puro como principal componente, assim como no cimento Portland^{2,12}. O silicato dicálcico, também presente no cimento Portland, tem sido utilizado no desenvolvimento de novos materiais de silicatos de cálcio¹³. O óxido de bismuto foi substituído por agentes radiopacificadores alternativos, como óxido de zircônio, óxido de tântalo^{2,14} e tungstato de cálcio⁸. Esses materiais apresentam também aditivos que além de potencializar suas propriedades, ainda proporcionam maior facilidade de manipulação². Os cimentos endodônticos surgiram a partir da segunda geração². Estes materiais à base de silicato tricálcico e/ou silicato dicálcico apresentam biocompatibilidade e bioatividade¹⁵⁻¹⁷.

Os materiais à base de silicatos de cálcio necessitam de umidade para reação de hidratação e são denominados, portanto, cimentos hidráulicos^{2,4,18}. Diversos cimentos endodônticos, tanto na apresentação pó-líquido, quanto prontos para uso, foram desenvolvidos e introduzidos no mercado mundial.

Desenvolvido a partir de estudos prévios realizados na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, o cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio (ECS), é um cimento na forma pó-líquido, composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio, tungstato de cálcio e polietilenoglicol. Este material apresenta propriedades físico-químicas adequadas, como tempo de presa, radiopacidade, escoamento e pH. Embora, tenha apresentado solubilidade acima do recomendado pelas normas ISO 6876/2012, o cimento experimental demonstrou baixa alteração volumétrica em análise por micro-CT¹⁹. Constatou-se ainda que este cimento obturador apresentou citocompatibilidade para Saos-2, bioatividade celular, atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans*²⁰, histocompatibilidade e potencial bioativo¹⁶.

Os cimentos endodônticos hidráulicos à base de silicatos de cálcio pré-manipulados e prontos para uso apresentam propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes ou melhores que os cimentos endodônticos na forma de apresentação pó-líquido²¹. O TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça), além de dois cimentos de empresas brasileiras, o Bio-C Sealer (Angelus, Londrina, PR, Brasil) e o Sealer Plus BC (MK Life, Porto Alegre, RS, Brasil) são exemplos de cimentos biocerâmicos prontos para uso.

O TotalFill BC Sealer apresenta pH alcalino, radiopacidade e escoamento que atendem às especificações da ISO 6876²², além de citocompatibilidade²³, biocompatibilidade, potencial bioativo¹⁶, e atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*²⁴. Apesar deste cimento ter apresentado solubilidade acima do recomendado pela ISO 6876, a análise por micro-CT demonstrou baixa alteração volumétrica após 7 e 30 dias de imersão em água destilada²². É composto por óxido de zircônio, silicatos de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio e agentes espessantes.

O Bio-C Sealer é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de silício, óxido de ferro e polietilenoglicol. O Bio-C Sealer demonstrou citocompatibilidade, bioatividade celular²⁵, histocompatibilidade, potencial de induzir o reparo²⁶, além de atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*²⁷.

O Sealer Plus BC apresenta baixa citotoxicidade sobre L929²⁸. Em estudo realizado *in vivo* constatou-se que este material demonstrou biocompatibilidade e

potencial bioativo²⁶. Embora tenha apresentado solubilidade acima do que é recomendado pela ISO 6876/2012, este cimento demonstrou baixa alteração volumétrica, em análise por micro-CT²⁹, além de tempo de presa, pH, liberação de cálcio, escoamento e radiopacidade de acordo com os padrões exigidos³⁰. Segundo as especificações do fabricante, o Sealer Plus BC é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio e propilenoglicol.

Composto principalmente por resina epóxi, o cimento endodôntico AH Plus, é considerado como padrão-ouro quanto às suas propriedades físico-químicas²¹. Assim sendo, este material tem sido utilizado como material de referência para avaliação de propriedades físico-químicas.

Os casos de insucesso da terapia endodôntica estão associados à persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares, principalmente em áreas inacessíveis como no interior dos túbulos dentinários³¹, bem como à reinfecção após obturação³². Nas últimas décadas os microrganismos mais comumente associados aos casos de infecção que resistem ao tratamento endodôntico foram *C. albicans* e *E. faecalis*³³, sendo estes encontrados com maior frequência²⁴. Tal fato se deve à sua habilidade de invadir todo o sistema de canais radiculares, e se organizarem em biofilme³⁴⁻³⁶.

Devido a complexidade do sistema de canais radiculares e a presença de biofilme microbiano, é essencial a realização de preparo biomecânico e desinfecção adequados³⁷. No entanto, apesar da variedade de soluções irrigadoras e estratégias mecânicas disponíveis, é impossível a completa eliminação de microrganismos deste complexo sistema³⁸. Deste modo, a utilização de um cimento endodôntico que apresente atividade antimicrobiana pode contribuir para o combate da infecção endodôntica residual³⁸⁻⁴⁰.

O pH alcalino apresentado pelos cimentos à base de silicatos de cálcio, proporciona um ambiente desfavorável à proliferação e sobrevivência bacteriana⁴¹, e pode ser associado a liberação de íons cálcio, a bioatividade e indução da formação de tecido mineralizado^{42,43}. No entanto, apesar de poderem apresentar alguma atividade antimicrobiana, os cimentos à base de silicatos de cálcio não são capazes de eliminar microrganismos, como *E. faecalis*, *C. albicans* e *Streptococcus aureus*⁴⁴.

Algumas substâncias são estudadas para serem associadas aos cimentos endodônticos, a fim de melhorar sua ação antimicrobiana. Nambu em 1984⁴⁵ avaliou o efeito da associação de dicloridrato de clorexidina à um cimento à base de óxido de

zinco e eugenol, e observou maior efetividade na prevenção da propagação bacteriana. No entanto, embora a clorexidina apresente significativa atividade antimicrobiana, ela promove efeito citotóxico^{46,47}.

O hipoclorito de cálcio $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ pode ser empregado associado a diferentes materiais, como agente antimicrobiano¹⁶. Tradicionalmente utilizado na área industrial para a esterilização e tratamentos para purificação de água, o hipoclorito de cálcio apresenta elevada quantidade de cloro disponível em sua formulação. Seu pH alcalino e a liberação de cloro estão relacionados a sua atividade antimicrobiana^{16,48}. Em endodontia, De almeida et.al (2014)⁴⁹ constataram que a capacidade do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ em eliminar UFC de *E. faecalis* é estatisticamente semelhante a apresentada pelo hipoclorito de sódio (NaOCl). No estudo de Sedigh-Shams et al. (2016)⁵⁰, os autores constataram que o $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a 5% apresentou citotoxicidade semelhante ao NaOCl a 0,5% e foi mais eficaz que o NaOCl na eliminação de biofilme de *E. faecalis*. O cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio (ECS) associado a hipoclorito de cálcio demonstrou biocompatibilidade e potencial bioativo¹⁶. No entanto, ainda não existem estudos que tenham avaliado as propriedades físico-químicas, citocompatibilidade e atividade antimicrobiana deste cimento experimental em associação ao hipoclorito de cálcio (2%).

Considerando o contato de um material endodôntico com os tecidos periapicais, é importante que sejam analisadas as propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas de novos materiais, ou de materiais já conhecidos que possuam modificações em sua composição^{25,51}. Deste modo, este estudo visa a avaliação de dois cimentos endodônticos biocerâmicos prontos para uso, de empresas brasileiras, bem como a avaliação da associação de hipoclorito de cálcio a um cimento endodôntico experimental à base de silicatos de cálcio e ao Bio-C Sealer, a fim de aumentar a atividade antimicrobiana destes.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

2.1 Proposição Geral

Este estudo teve como objetivo analisar dois novos cimentos endodônticos hidráulicos à base de silicatos de cálcio, de empresas brasileiras, bem como avaliar se a adição de hipoclorito de cálcio pode potencializar a atividade antimicrobiana de um cimento experimental à base de silicato tricálcico e do Bio-C Sealer, sem alterar de forma negativa suas propriedades físico-químicas e biológicas.

2.2 Proposições Específicas

Publicação 1: Avaliação das propriedades físico-químicas de tempo de presa, escoamento, radiopacidade, pH, solubilidade e alteração volumétrica de um cimento endodôntico biocerâmico, pronto para uso, produzido no Brasil, Bio-C Sealer (Angelus, Brasil), comparando-o aos cimentos TotalFill BC Sealer e AH Plus.

Publicação 2: Avaliação do Sealer Plus BC (MK Life, Brasil), um cimento à base de silicatos de cálcio, pronto para uso, de uma empresa brasileira, em comparação aos cimentos AH Plus e TotalFill BC Sealer, por meio da análise de suas propriedades físico-químicas de tempo de presa, radiopacidade, escoamento, pH, solubilidade e alteração volumétrica, além de citocompatibilidade e atividade antibiofilme.

Publicação 3: Avaliar, por meio de análise da atividade antimicrobiana, da citocompatibilidade, e das propriedades físico-químicas de tempo de presa, escoamento, radiopacidade, solubilidade, alteração volumétrica e pH, se a associação de hipoclorito de cálcio a um cimento experimental hidráulico à base de silicatos de cálcio e ao Bio-C Sealer possibilita aumento da atividade antimicrobiana destes materiais frente aos biofilmes de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*, sem que essas propriedades sejam prejudicadas.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1*

Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate-based sealer, Bio-C Sealer

Abstract

Introduction: Calcium silicate-based materials have been proposed as root canal sealers for root canal treatment. The aim of this study was to evaluate the physicochemical properties of a new calcium silicate-based sealer (Bio-C Sealer; Angelus, PR, Brazil), compared with a calcium silicate endodontic sealer (TotalFill BC Sealer; FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) and an epoxy-resin sealer (AH Plus; Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany). **Methods:** The setting time and flow were evaluated based on ISO 6876 standard. The pH value was evaluated after different time intervals of storage in deionized water (1, 7, 14, and 21 days). Radiopacity was evaluated by radiographic analysis in millimeters of aluminum. Solubility and volumetric change were evaluated after 30 days of immersion in distilled water. Solubility was assessed by mass loss (%), and volumetric change was evaluated by micro-computed tomography imaging. The data were submitted to analysis of variance and Tukey statistical tests ($P < .05$). **Results:** TotalFill BC Sealer and Bio-C Sealer were similar regarding radiopacity, volumetric change and pH values ($P > .05$). Bio-C Sealer presented the shortest setting time, and the highest flow and solubility ($P < .05$). AH Plus showed the highest radiopacity and the lowest flow, pH, solubility, and volumetric change ($P < .05$). **Conclusions:** Bio-C Sealer showed a short setting time, alkalization ability, and adequate flow and radiopacity, as well as low volumetric change. However, this sealer had higher solubility than the rates required by ISO 6876 standard.

Key Words

Calcium silicate; endodontics; micro-computed tomography; physicochemical properties; root canal sealer.

* Artigo escrito nas normas do periódico *Journal of Endodontics*, no qual foi publicado (<https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.07.006>). A política de copyright e autoarquivo de editores para esta revista está disponível no ANEXO A.

Introduction

Root canal filling is important for the long-term success of endodontic treatment¹. Therefore, root canal sealers should have the appropriate physical and chemical properties¹ to achieve tridimensional sealing².

AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) is an epoxy resin-based root canal sealer considered the gold standard for physicochemical properties³. However, the main limitation of AH Plus is its absence of bioactive properties⁴. Bioactive materials favor the periapical healing process⁴. Therefore, new calcium silicate-based endodontic sealers have been developed based on their excellent biological properties⁵, mainly their bioactive potential⁴. Premixed ready-to-use calcium silicate-based sealers present biocompatibility, bioactivity, and their radiopacity and flow comply with ISO 6876:2012. These sealers promote high pH, allow Ca²⁺ ion release, and present bond strength similar to AH Plus³. However, high solubility is also reported for ready-to-use calcium silicate-based endodontic sealers³. Thus, studies evaluating the physicochemical properties of newly developed calcium silicate-based materials are needed before considering their clinical applications⁶.

TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) is a calcium silicate-based material that presents adequate physicochemical^{7,8} and biological properties^{8,9}, as well as an antimicrobial effect⁹. Bio-C Sealer (Angelus, Londrina, PR, Brazil) is a new root canal sealer containing calcium silicates, calcium aluminate, calcium oxide, zirconium oxide, iron oxide, silicon dioxide and dispersing agent in its composition. According to its manufacturer, this sealer has biocompatibility, bioactivity, and high pH, radiopacity and flow values. However, there is no study in the literature assessing Bio-C sealer.

Standardized evaluation tests defined by American Dental Association (ADA) specification no. 57¹⁰ and International Organization for Standardization (ISO) 6876¹¹ are available to evaluate the physicochemical properties of root canal sealers. However, the conventional methodologies to assess solubility and dimensional stability have some limitations^{12,13}. The difference in material weight before and after immersion in water may not represent solubility. Some materials can absorb water even though they present solubility¹². New methodologies using micro-computed tomography (micro-CT) imaging have been developed to complement the tests performed by ADA and ISO⁷. Solubility and dimensional stability can be evaluated similar to clinical conditions, by assessing the volumetric change of a material after immersion in a fluid^{14,15}.

The aim of this study was to evaluate the physicochemical properties of the new Bio-C Sealer in comparison with TotalFill BC calcium silicate-based sealer, and the gold standard AH Plus epoxy resin-based sealer, using conventional and micro-CT tests. The null hypothesis was that there would be no difference between the physicochemical properties of the new ready-to-use calcium silicate sealer and the already available epoxy resin and silicate-based sealers.

Materials and Methods

The physicochemical properties of setting time, flow, radiopacity, pH, solubility and volumetric change were evaluated (APPENDIX A). The endodontic sealers used in this study, their respective manufacturers, and their compositions and proportions are described in Table 1.

Table 1. Endodontic sealers, their manufacturer, composition and proportion used

Material	Manufacturer	Composition	Proportion
AH Plus	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany	Bisphenol A/F epoxy resin, calcium tungstate, zirconium oxide, silica, iron oxide pigments dibenzyl diamine, amino adamantane, silicone oil	1 g:1 g (Paste/Paste)
TotalFill BC Sealer	FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland	Zirconium oxide, calcium silicates, calcium phosphate monobasic, calcium hydroxide, filler and thickening agents	Ready to use
Bio-C Sealer	Angelus, Londrina, PR, Brazil	Calcium silicates, calcium aluminate, calcium oxide, zirconium oxide, iron oxide, silicon dioxide, dispersing agent	Ready to use

Evaluation of physicochemical properties

Setting Time

Type IV plaster molds (Durone IV Salmon, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brazil), measuring 10 mm diameter by 1 mm high were manufactured and kept immersed in distilled water

for 24 hours at 37°C. Then, the molds were filled with the sealers (n = 6). The setting time was evaluated based on ISO 6876:2012 standard (11). A 100 g Gilmore needle with a 2 mm active tip was placed on the sample surface vertically. The materials were kept in an oven at 37°C and 95% humidity. The setting time was determined starting from beginning of the manipulation of the sealers up to when the marks of the needles could no longer be observed on the sealer surface.

Flow

The flow test was performed based on ISO 6876:2012 Standard¹¹. After manipulation of the sealer, 0.05 mL of the material was placed in the center of a glass plate using a graduated disposable syringe (n = 10). Next, another glass plate (20 g) was placed over the sealer, and a 100 g load was applied centrally to the top plate for 10 minutes. After this period, the longest diameter and the shortest diameter of the resulting sealer disks were measured using a digital caliper. When a difference of less than 1 mm between the diameters was observed, the mean value was recorded. A second evaluation was made by photographing the material on the plate, alongside a millimeter ruler. The images obtained were also evaluated according to Tanomaru-Filho et al¹⁶. The flow area of the material expressed in mm² was obtained using Image Tool 3.0 software (University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA).

Radiopacity

Six specimens measuring 10 mm diameter x 1 mm thick were produced for each group. After the setting process, each sample was positioned on occlusal radiographic films (Insight-Kodak Comp, Rochester, NY, USA) and exposed close to an aluminum scale with variable thickness (from 2 to 16 mm, in 2-mm increments) placed centrally. An X-ray unit (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland) operating at 60 kV, 7 mA, 0.32 pulses per second, and a focus-film distance of 33 cm was used. The films were processed in a standard automatic processor (Dent-X 9000, Dent-X, Elmsford, NY, USA). The radiographs were digitized, and the images were imported into the Image Tool version 3.0 software (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). The area of each degree of the aluminum scale and the area of the sealers were selected to determine the radiopacity of the materials, expressed as equivalent thickness of aluminum (in mm).

pH

The pH values of the sealers were determined by filling polyethylene tubes (Embramed, São Paulo, SP, Brazil) measuring 10 mm high X 1.6 mm diameter with each material (n=10). Each specimen was placed in a flask containing 10 mL deionized water and stored at 37°C. The pH assessment was performed after 1, 7, 14, and 21 days of immersion. The control was based on the pH values of deionized water in which no samples were immersed. The pH of the solutions was analyzed at each timepoint, using a previously calibrated digital pH meter (Digimed, SP, Brazil). The mean pH of each group in each experimental period was calculated after each measurement (in triplicate).

Solubility

The solubility assessment was performed based on the method developed by Carvalho-Junior et al¹⁷. Circular plastic molds (n = 6) measuring 1.5 mm high by 7.75 mm diameter were filled with the sealers, and a nylon thread was embedded in the fresh sealer mixture. The samples were placed between two glass plates covered with cellophane film. TotalFill BC and Bio-C sealers, which require moisture for setting, were assessed by placing two pieces of wet cloth between the mold and the glass plates, as described by Tanomaru-Filho et al⁷. This unit was kept at 37°C and relative humidity three times longer than the duration of their setting time. The test specimens were removed from the molds, kept in a desiccator, and weighed on a precision balance (Adventurer AR2140, Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA), until stabilization of the initial mass. Then, they were placed in closed plastic flasks containing 7.5 mL of distilled water, and kept in an oven at 37°C for 30 days. The nylon threads allowed the sample to be immersed in distilled water without touching the flask walls during the experimental period. After 30 days, the samples were placed in a desiccator and then reweighed until stabilization of the mass, to obtain their final weights. Solubility was obtained by calculating the weight loss after immersion and expressed in percentage terms.

Volumetric change

Specimens 7.75 mm diameter by 1.5 mm high (n = 6) were prepared and kept in an oven at 37°C and relative humidity for 3 times longer than their setting time. Then, the samples were kept in a desiccator for 24 hours and scanned by SkyScan 1176 micro-CT (Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium). The scanning parameters were as follows: 80 kV voltage, 300 µA current, 18 µm voxel size, copper and aluminum (Cu + Al) filter, and

360° rotation. Afterwards, the samples were immersed in plastic flasks containing 7.5 mL of distilled water, and kept in an oven for 30 days. The position of the specimens in the flask was changed after 15 days to allow contact of both sealer surfaces with the water for the same amount of time. After the experimental period, the samples were placed in a desiccator for 24 hours and scanned again. The reconstruction of the images was performed using NRecon software (V1.6.10.4; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium). The correction parameter for smoothing, beam hardening, and ring artefacts was defined for each material. The same parameters were used for the same material at the different timepoints. The reconstructed images were superimposed on the different timepoints using the Data Viewer software (V1.5.2.4; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium). CTAn software (V1.15.4.0; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium) was used for quantitative analysis of the samples, allowing the total volume of material to be calculated in mm³. The volumetric change between the baseline and the experimental period was then calculated.

Statistical Analysis

The normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk test. Statistical analysis was performed with ANOVA and Tukey parametric tests. The level of significance was set at $P < .05$.

Results

The results are represented in Tables 2 and 3. Bio-C Sealer had the shortest setting time, followed by AH Plus and TotalFill BC Sealer ($P < .05$). Bio-C Sealer showed the highest flow, and AH Plus had the lowest in both analyses (mm and mm²) ($P < .05$). AH Plus showed the highest radiopacity, and the lowest solubility and volumetric change ($P < .05$). The solubility rate was higher for Bio-C Sealer ($P < .05$); however, Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer had similar volumetric change ($P > .05$).

The pH was higher for TotalFill BC Sealer, followed by Bio-C Sealer after 1 day ($P < .05$). No statistically significant difference was observed between TotalFill BC Sealer and Bio-C Sealer in the other experimental periods ($P > .05$). AH Plus was similar to the control group ($P > .05$).

Table 2. Setting time, flow, radiopacity, solubility, and volumetric change observed in the different root canal sealers (mean and standard deviation)

	AH Plus	TotalFill BC	Bio-C Sealer
Setting time (min)	385.0 (± 4.5) ^b	582.2 (± 21.5) ^a	220.0 (± 12.7) ^c
Flow (mm)	21.3 (± 1.1) ^c	24.7 (± 0.8) ^b	31.2 (± 1.3) ^a
Flow (mm ²)	409.2 (± 108.6) ^c	537.4 (± 45.0) ^b	868.4 (± 34.9) ^a
Radiopacity (mmAl)	9.2 (± 0.5) ^a	6.1 (± 0.7) ^b	5.5 (± 0.6) ^b
Solubility (% mass loss)	0.2 (0.4) ^c	10.6 (3.2) ^b	17.9 (2.5) ^a
Volumetric change (%)	-0.4 (0.2) ^b	-1.9 (1.0) ^a	-0.9 (0.6) ^a

Negative values in the volumetric change test indicate volume loss.

Different letters on the same line indicate statistically significant differences ($P < .05$)

Table 3. pH values (mean and standard deviation) observed in the different experimental periods (1, 7, 14 and 21 days)

	AH Plus	TotalFill BC	Bio-C Sealer	Control
1 day	6.66 (± 0.24) ^c	10.38 (± 0.19) ^a	9.65 (± 0.17) ^b	6.51 (± 0.32) ^c
7 days	6.12 (± 0.37) ^b	10.23 (± 0.52) ^a	9.74 (± 0.53) ^a	6.53 (± 0.30) ^b
14 days	6.53 (± 0.37) ^b	10.24 (± 0.43) ^a	9.90 (± 0.95) ^a	6.52 (± 0.27) ^b
21 days	6.23 (± 0.24) ^b	9.68 (± 0.89) ^a	9.18 (± 1.01) ^a	6.43 (± 0.38) ^b

Different letters on the same line indicate statistically significant differences ($P < .05$)

Discussion

Successful endodontic treatment outcome is achieved by appropriate sealing of the root canal filling materials⁵. A new generation of bioceramic endodontic sealers has been developed using calcium silicate⁶. The main advantages of bioceramic materials are related to their physical and biological properties. Bioceramics are biocompatible, nontoxic, and chemically stable within the biological environment¹⁸.

The physicochemical properties of root canal sealers should be evaluated by means of standardized methodologies defined by ADA Standard 57¹⁰ and ISO 6876¹¹. The setting time of endodontic sealers should allow enough time for the material to be

placed in the root canals¹⁹. However, prolonged setting time is considered a critical issue in clinical application²⁰. The current study showed that TotalFill BC Sealer had the longest setting time, followed by AH Plus, corroborating a previous study⁷. Bio-C Sealer had the shortest setting time.

Flow is an important property for root canal filling²¹. This property allows the sealer to penetrate into the irregularities of root canal systems²². All the sealers evaluated presented flow rates in compliance with ISO 6876 Standard, corroborating previous studies^{7,23}. However, Bio-C Sealer presented the highest flow rate.

The relative radiopacity of root filling materials is essential for assessing the root canal filling¹⁹, and for distinguishing the material from the surrounding anatomical structures²⁴. In the present study, the endodontic sealers met the ANSI/ADA requirements¹⁰. AH Plus showed the highest radiopacity. TotalFill BC Sealer and Bio-C Sealer presented similar radiopacity. This can most likely be explained by the presence, quantity and proportion of radiopacifying agents in each material¹⁸. The radiopacity results of TotalFill BC Sealer and Bio-C Sealer were significantly lower than that of AH Plus, probably because calcium silicate-based sealers have zirconium oxide in their composition, whereas AH Plus contains not only zirconium oxide, but also calcium tungstate¹⁸.

Solubility indicates the loss of material mass when immersed in water¹⁹. Root canal sealers should present solubility less than 3%^{10,11}, in order to maintain their sealing ability and avoid reinfection²⁵. Our results showed that only AH Plus complied with the ADA¹⁰ and ISO Standards¹¹. The low solubility of AH Plus may be attributed to the strong cross-links in epoxy resin-based materials²⁶. On the other hand, calcium silicate-based sealers have shown high solubility after immersion in water, compared with the standard resin-based sealers⁶. This high solubility can be explained by the hydrophilic nanosized particles that increase their surface area and allow more liquid molecules to come into contact with the sealer²⁷.

Although the high solubility of calcium silicate-based sealers can be considered a disadvantage, their bioactive potential is a consequence of the solubility of these materials even after setting²⁵. Moreover, the solubility of calcium silicate-based sealers can be explained by the release of OH⁻ and Ca²⁺ ions²⁸, thus corroborating our results regarding the alkaline pH for TotalFill BC Sealer and Bio-C Sealer, and low solubility and pH values for AH Plus. An alkaline environment may play a positive role in apical healing, thus contributing to the formation of mineralized tissues²⁹. The effects of

alkaline materials (i.e. calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate, and other alkaline materials) used as root canal dressings or as filling materials, on the mechanical properties of radicular dentin are not conclusive, and require further investigation³⁰. On the other hand, bioceramic sealers has been associated with the penetration of sealers into the dentin tubules³¹. This better penetrability observed for calcium silicate-based sealers may be favorable for root canal sealing³².

The conventional solubility test may not be appropriate to evaluate materials that absorb water^{12,33}. Calcium silicate-based sealers require moisture in order to set, and have a reaction to hydration³⁴. The solubility of these materials could have been overestimated in the drying process when determining the final mass, considering that the water not incorporated during hydration may evaporate in the desiccator, interfering in the result observed for the real mass loss³³. It is worth noting that ISO 4049 may be applied to include the procedures for testing both sorption and solubility³⁵. Considering that solubility of materials can not represent absence of volumetric stability, methodologies using micro-CT can be applied to complement the evaluation of materials^{7,14,15}. Our results showed that TotalFill BC Sealer and Bio-C Sealer had a volumetric change below 2%, even though they showed solubility above 10%. Previous studies also showed low volumetric changes for sealers presenting a large mass loss^{7,14}. The volumetric change tests performed using micro-CT can complement the solubility analysis of calcium silicate-based root canal sealers⁷ in a more clinical setting^{14,15}.

Bio-C Sealer is a new sealer available on the market. More research is required before this sealer can be recommended for clinical application. Based on our results, the authors concluded that Bio-C Sealer has a short setting time, alkalization ability, and adequate flow and radiopacity. Although Bio-C Sealer did not meet the ISO or American National Standards Institute/ADA protocols regarding solubility, this sealer showed low volumetric change.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, and was supported by São Paulo Research Foundation - FAPESP (2016/00321-0, 2017/14305-9 and 2017/19049-0).

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Celikten B, Jacobs R, de Faria Vasconcelos K, et al. Comparative evaluation of cone beam CT and micro-CT on blooming artifacts in human teeth filled with bioceramic sealers. *Clin Oral Investig* 2019;23:3267–73.
2. Vertuan GC, Duarte MAH, Moraes IG, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Root Canal Sealer. *J Endod* 2018;44:501-5.
3. Silva Almeida LH, Moraes RR, Morgental RD, Pappen FG. Are Premixed Calcium Silicate-based Endodontic Sealers Comparable to Conventional Materials? A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod* 2017;43:527-35.
4. Giacomino CM, Wealleans JA, Kuhn N, Diogenes A. Comparative Biocompatibility and Osteogenic Potential of Two Bioceramic Sealers. *J Endod* 2019;45:51-6.
5. Lee BN, Hong JU, Kim SM, et al. Anti-inflammatory and Osteogenic Effects of Calcium Silicate-based Root Canal Sealers. *J Endod* 2019;45:73-8.
6. Jafari F, Jafari S. Composition and physicochemical properties of calcium silicate based sealers: A review article. *J Clin Exp Dent* 2017;9:e1249-e55.
7. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chavez-Andrade GM, et al. Physicochemical Properties and Volumetric Change of Silicone/Bioactive Glass and Calcium Silicate-based Endodontic Sealers. *J Endod* 2017;43:2097-101.
8. Zamparini F, Siboni F, Prati C, Taddei P, Gandolfi MG. Properties of calcium silicate-monobasic calcium phosphate materials for endodontics containing tantalum pentoxide and zirconium oxide. *Clin Oral Investig* 2019;23:445-57.
9. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, et al. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J* 2019;52:979-86.
10. American National Standards/American Dental Association. Specification no. 57 for Endodontic Sealing Materials. Chicago, IL: American National Standards/American Dental Association; 2000.
11. International Organization for Standardization. ISO 6876: Dental Root Canal Sealing Materials. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2012.
12. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 2010;36:16-27.

13. Camilleri J, Mallia B. Evaluation of the dimensional changes of mineral trioxide aggregate sealer. *Int Endod J* 2011;44:416-24.
14. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J* 2017;50:407-14.
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. Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Tanomaru JM, Bier CA. Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Aust Endod J* 2007;33:23-6.
17. 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. *J Endod* 2007;33:1110-6.
18. Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J Endod* 2012;38:842-5.
19. Versiani MA, Abi Rached-Junior FJ, Kishen A, et al. Zinc Oxide Nanoparticles Enhance Physicochemical Characteristics of Grossman Sealer. *J Endod* 2016;42:1804-10.
20. Jang JH, Lee CO, Kim HJ, et al. Enhancing Effect of Elastinlike Polypeptide-based Matrix on the Physical Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2018;44:1702-8.
21. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Bosso-Martelo R, et al. A Novel Model for Evaluating the Flow of Endodontic Materials Using Micro-computed Tomography. *J Endod* 2017;43:796-800.
22. Siqueira JF, Jr., Fraga RC, Garcia PF. Evaluation of sealing ability, pH and flow rate of three calcium hydroxide-based sealers. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:225-8.
23. Seung J, Weir MD, Melo MAS, et al. A Modified Resin Sealer: Physical and Antibacterial Properties. *J Endod* 2018;44:1553-7.
24. Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:e35-8.

25. Donnermeyer D, Burklein S, Dammaschke T, Schafer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology* 2018; <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0400-3> [Epub ahead of print].
26. 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;47:437-48.
27. Al-Haddad A, Che Ab Aziz ZA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater* 2016;2016:9753210.
28. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J* 2012;45:419-28.
29. Urban K, Neuhaus J, Donnermeyer D, Schafer E, Dammaschke T. Solubility and pH Value of 3 Different Root Canal Sealers: A Long-term Investigation. *J Endod* 2018;44:1736-40.
30. Shetty S, Kahler SL, Kahler B. Alkaline Material Effects on Roots of Teeth. *Materials (Basel)* 2017;10:E1412.
31. Balguerie E, van der Sluis L, Vallaey K, Gurgel-Georgelin M, Diemer F. Sealer penetration and adaptation in the dentinal tubules: a scanning electron microscopic study. *J Endod* 2011;37:1576-9.
32. Uzunoglu-Ozyurek E, Erdogan O, Aktemur Turker S. Effect of Calcium Hydroxide Dressing on the Dentinal Tubule Penetration of 2 Different Root Canal Sealers: A Confocal Laser Scanning Microscopic Study. *J Endod* 2018;44:1018-23.
33. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, et al. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater* 2015;13:43-60.
34. Xuereb M, Vella P, Damidot D, Sammut CV, Camilleri J. In situ assessment of the setting of tricalcium silicate-based sealers using a dentin pressure model. *J Endod* 2015;41:111-24.
35. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater* 2011;27:879-91.

3.2 Publicação 2*

Physicochemical properties, cytocompatibility and antibiofilm activity of a new calcium silicate sealer

Abstract

The aim of this study was to evaluate the physicochemical properties, cytocompatibility and antibiofilm activity of a new calcium silicate-based endodontic sealer, Sealer Plus BC (MK Life, Brazil), in comparison with TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, Switzerland) and AH Plus (Dentsply, Germany). Setting time and flow were evaluated based on ISO 6876 standard. The pH was evaluated after different periods, and radiopacity by radiographic analysis (mmAl). Solubility (% mass loss) and volumetric change (by micro-CT) were assessed after 30 days of immersion in distilled water. Cytocompatibility was assessed by methyltetrazolium (MTT) and neutral red (NR) assays, after exposure of Saos-2 cells to the sealer extract for 24 h. An additional analysis was performed by using MTT assay after 1, 3 and 7 days of exposure of Saos-2 to the sealers 1:8 dilution extracts. Antibiofilm activity against *Enterococcus faecalis* and/or *Candida albicans* was evaluated by crystal violet assay and modified direct contact test. The physicochemical properties were analyzed using ANOVA/Tukey tests; MTT and NR data were analyzed by ANOVA and Bonferroni tests; the antimicrobial tests were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn tests ($\alpha=0.05$). Sealer Plus BC had proper setting time, radiopacity, flow and alkalization capacity. Sealer Plus BC was significantly more soluble than AH Plus ($p<0.05$) and presented volumetric change similar to AH Plus and TotalFill BC ($p>0.05$). Sealer Plus BC presented antibiofilm activity and no cytotoxic effect. In conclusion, although Sealer Plus BC had higher solubility, this sealer showed proper physicochemical properties, cytocompatibility, and antibiofilm activity.

Key Words: Biofilms, Calcium Silicate, Materials Testing, Physicochemical Analysis, Root Canal Obturation.

* Artigo escrito nas normas do periódico *Brazilian Dental Journal*, ao qual foi submetido e aceito para publicação. A política de copyright e autoarquivo de editores para esta revista está disponível no ANEXO B

Introduction

An adequate filling of the root canal may prevent its reinfection, acting as a barrier against microorganisms and fluids of the periapical tissue (1), avoiding their permanence in the root canal system after endodontic therapy, which is associated with treatment failure (2). Therefore, since root canal sealers play an important role for success of root canal treatment (3), these materials should present volumetric stability (4) and antimicrobial activity (2, 5). The development of bioceramic and the introduction of new calcium silicate-based endodontic materials contribute to a better prognosis of endodontic treatment (3).

Premixed, ready-for-use bioceramic endodontic sealers have been developed showing adequate biological and physicochemical properties, with similar or better results than conventional endodontic materials (6). TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) is a root canal sealer containing calcium silicates with proper biological and physicochemical properties (7) besides antimicrobial effect (5). AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany) is an epoxy resin-based sealer considered as gold standard to comparison with new root canal sealers (4).

The main advantage of AH Plus in comparison with calcium silicate-based sealers is its low solubility (6). However, the conventional test used to evaluate this property may not reproduce a clinical condition (4). Microcomputed tomography (micro-CT) has been used to evaluate root canal sealer properties (4, 7). As a 3D non-destructive technique, micro-CT results in volumetric reconstruction allowing to measure variables on the same specimen before and after experimental periods (8). This imaging method allows to evaluation of solubility and dimensional changes of root canal sealers after immersion in a fluid by means of the assessment of the volumetric change of the materials (1, 7, 9). The volumetric change test is more appropriate to assess materials with fluid uptake, such as the calcium silicate-based sealers (1, 7, 9).

Recently, a new calcium silicate-based sealer, Sealer Plus BC (MK Life, Porto Alegre, RS, Brazil) was developed. This material has proper physicochemical properties, except for a high solubility (10). Sealer Plus BC also showed low cytotoxicity and more biocompatibility than MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brazil) and AH Plus (11). However, there are no studies considering the antimicrobial properties of Sealer Plus BC, and there is no evaluation of the volumetric change of this material after immersion in distilled water for 30 days.

The aim of this study was to evaluate physicochemical properties (pH, setting time, radiopacity, flow, solubility and volumetric change), cytocompatibility and antibiofilm activity of calcium silicate-based sealers (TotalFill BC and Sealer Plus BC) in comparison with an epoxy resin-based sealer (AH Plus). The null hypothesis was that there is no difference between the sealers in the evaluated physicochemical properties, cytocompatibility and antibiofilm activity against *E. faecalis* and/or *C. albicans*.

Materials and Methods

The endodontic sealers and their respective manufacturers, composition and proportion used are described in Table 1.

Table 1 - Endodontic sealers, their manufacturer, composition and proportion used

Material	Manufacturer	Composition	Proportion
Sealer Plus BC	MK Life, Porto Alegre, RS, Brazil	Zirconium oxide, tricalcium silicate, dicalcium silicate, calcium hydroxide, and propylene glycol.	Ready to use
TotalFill BC	FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland.	Zirconium oxide, calcium silicates, calcium phosphate monobasic, calcium hydroxide, filler and thickening agents.	Ready to use
AH Plus	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany.	Bisphenol A/F epoxy resin, calcium tungstate, zirconium oxide, silica, iron oxide pigments dibenzylidiamine, aminoadamantane, silicone oil.	1 g: 1 g (Paste/Paste)

Physicochemical properties

The physicochemical properties of setting time, radiopacity, flow, pH, solubility and volumetric change were evaluated (APPENDIX A).

Setting time

Plaster models with cavities 10 mm in diameter and 1 mm deep ($n = 6$) were manufactured as recommended by ISO 6876:2012 (12) to assess the setting time of materials which need moisture for setting. Although AH Plus is an epoxy resin-based

sealer, a previous test showed values similar to those obtained by evaluating this sealer in metal rings. Therefore, in order to standardize the assessment, type IV plaster molds (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil) were manufactured based on a previous study (9). The molds were kept immersed in distilled water for 24 hours at 37°C before the test (12). Then, the cavities were filled with the sealers. A Gilmore needle with mass of 100 ± 0.5 g and diameter of 2 ± 0.1 mm was used. The molds with the sealers were kept in an oven (37 ± 1 °C, $95 \pm 5\%$ relative humidity). The setting time was considered as the time when the marks of needle could not be observed on the sealer surface.

Radiopacity

Specimens (10 mm in diameter and 1 mm height) were made ($n = 6$ per group). Each specimen was positioned on occlusal radiographic films (Insight-Kodak Comp, Rochester, NY, USA) and exposed, along with an aluminium step wedge with variable thickness (from 2 to 16 mm, in 2-mm increments). An X-ray unit (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland) operating at 60 kV, 7 mA, 0.32 pulses per second, and focus-film distance of 33 cm was used. The films were processed and digitized. The images were imported to the Image Tool 3.0 software (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA); an equal-density tool was used to identify equal-density areas in the radiographic images. The values recorded for each material were averaged to obtain a single value in mAs.

Flow

The flow test was realized in accordance with ISO standard 6876:2012 (12). After manipulation, 0.05 ± 0.005 mL of the sealer was placed on a glass plate ($n = 10$ per group). At 180 ± 5 seconds after initiating the manipulation, another glass plate (20 g) was placed on the plate with the sealer, and a 100 g weight was put on the top plate, and kept there for 10 minutes. The maximum and minimum diameters of the material on glass plate were measured. When a difference of less than 1 mm between the diameters was observed, the mean value was recorded. A second analysis was made by photographing the material on the plate alongside a millimetre ruler. The images were imported to the Image Tool 3.0 software and the area of flow of the material was expressed in mm².

pH

Polyethylene tubes measuring 10 mm length and 1.6 mm diameter were filled with freshly sealer ($n = 10$ per group). The tubes were immersed in plastic flasks

containing 10 mL of deionized water. The flasks were closed and kept in an oven at 37°C. pH measurements were made after time intervals of 1, 7, 14, and 21 days. The solutions pH was analysed at each period using a previously calibrated digital pH meter (Digimed, São Paulo, SP, Brazil). The mean pH value (in triplicate) in each experimental period was calculated.

Solubility

Solubility evaluation ($n = 6$) was performed based on previous studies (4, 7, 9). Specimens measuring 1.5 mm high and 7.75 mm in diameter were manufactured (13). A nylon thread was inserted in the fresh sealer and the molds were kept at 37°C and 95% humidity for three times the setting time of sealers (7, 9). The sealers were removed from the molds and weighed on a balance (Adventurer - Ohaus, Model AR2140 - Indústria de Balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brazil). Then, each specimen was placed in a closed plastic flask containing 7.5 mL of deionized water (2, 6, 9). The sealers were attached to the containers with nylon threads and kept in an oven at 37°C for 30 days (4, 7, 9). After this period, they were washed in distilled water, and placed in a dehumidifier containing silica until the mass stabilization. Mass was measured before and after the samples were immersed in distilled water, and every 24 hours thereafter, until the mass stabilization (approximately 7 days). The difference between the initial and final weights was recorded as the materials solubility. This difference in mass was transformed into a percentage based on the initial weight (% mass loss).

Volumetric change

This test was performed based on a previous study (9). The specimens ($n = 6$) were prepared with the same dimensions as those used for the solubility test, but with no nylon thread. After setting, the sealers were scanned by micro-computed tomography SkyScan 1176 (Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium). After initial scanning, the sealers were immersed in plastic flasks containing 7.5 mL of distilled water and were kept in an oven for 30 days. After 15 days, the position of the sealers in the flask was changed in order to allow the contact with the water in both superficies of the sealer for the same time. Then, the sealers were placed in a desiccator containing silica for 24 hours and scanned again. The scanning parameters for all materials evaluated were: voltage of 80 kV, 300 μ A current, at 18 μ m voxel size, copper and aluminium (Cu + Al) filter and 360° rotation. These settings were based on Zordan-Bronzel et al. (9) and confirmed an initial test. The reconstruction of the images was performed using NRecon software

(V1.6.10.4; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium). The correction parameters for smoothing, beam hardening, and ring artefacts were defined for each sealer. The parameters for Sealer Plus BC and TotalFill BC Sealer that have similar composition were: 1 for smoothing, 61 for beam hardening correction and 1 for ring artefacts correction; and for AH Plus were 1 for smoothing, 21 for beam hardening correction and 1 for ring artefacts correction. The reconstructed images were superimposed using the Data Viewer software (V1.5.2.4; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium). The 3D images were used for quantitative analysis of the samples, allowing the total volume of sealer to be calculated in mm³ by CTAn software (V1.15.4.0; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium). The volumetric change between the baseline and the experimental period was calculated.

Cell viability assays

Cell viability (APPENDIX C) was evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and neutral red (NR) assays (14). Human osteoblast-like cells, Saos-2 (ATCC HTB-85), were cultivated in T-75 flasks (Jet Biofil, Guangzhou, China), containing DMEM (Dulbecco modified medium; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco/Invitrocell, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100 µg/mL), until confluence. AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) was used as the reference material. For the preparation of extracts, 0.5 g of each evaluated sealer was placed in the bottom of empty wells of 12-well culture plates. The plates were stored at 37 °C, 95% humidity and 5% CO₂, for 24 hours, until the complete setting of the materials. After this period, the plates were exposed to ultraviolet light to prevent contamination. Then, 5 mL of DMEM serum-free was added in each of the plate wells. The plates were kept at 37°C for 24 hours, in 95% humidity and 5% CO₂. Then, the dilutions of the sealer extracts were prepared (1:1, 1:2; 1:4; 1:8, 1:16 and 1:32).

MTT assay

Saos-2 cells were plated (1×10^5 cells mL⁻¹) in 96-well plates (Jet Biofil) containing DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL). Cells were cultured for 24 hours at 37 °C, 95% humidity and 5% CO₂ before exposure to the materials. Saos-2 were exposed to sealer extracts at 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 dilutions, negative control (serum-free DMEM) and the

positive control, 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 24 hours, according to ISO 10993 (15). Additionally, the viability of cells (1×10^4 cells mL⁻¹) exposed to the sealer extracts in the 1:8 dilution was analyzed through MTT assay performed for the experimental periods of 1, 3 and 7 days. The extracts were renewed every 48 hours. Immediately after each trial period, the medium was replaced with 100 μ L of MTT 5 mg mL⁻¹ solution (Sigma-Aldrich) and the plates were incubated for 3 h. Isopropanol (100 μ L) acidified to 0.04 N (Sigma-Aldrich) was added. Optical density was measured at 570 nm in a spectrophotometer UVM 340 (ASYS, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brazil). Three independent experiments were performed in triplicate for each experimental group, and the mean of each experiment was used in the statistical analysis ($n = 3$ per group).

Neutral red (NR) assay

The same procedures described in the MTT assay were performed. After 24-hour exposure of cells to the sealer extracts, the extracts were replaced with 100 μ L of DMEM containing 50 μ g NR mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) and the plates were incubated for 3 hours. The colorimetric product was solubilized in solution (50% ethanol and 1% acetic acid) (Sigma-Aldrich). Optical density was measured in a spectrophotometer at 570 nm. Three independent experiments were performed in triplicate for each experimental group, and the mean of each experiment was used in the statistical analysis ($n = 3$ per group).

Antibiofilm activity

Crystal violet assay

The action against the biomass of mono- and dual-species biofilms of *E. faecalis* (ATCC 29212) and/or *C. albicans* (ATCC 10231) was evaluated by violet crystal assay (APPENDIX B). The biofilms (adjusted to 1×10^8 CFU mL⁻¹) were formed in 96-well plates for 72 hours (*E. faecalis*) and 48 hours (*C. albicans* and dual-species biofilms), with Tryptic soy broth – TSb culture medium (Difco Detroit, MI, USA) supplemented with D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich) for *E. faecalis*; and in Brain Heart Infusion – BHI (Difco) culture medium for *C. albicans* and dual-species biofilms. The sealers were manipulated and placed in contact with 2 mL of saline solution, in an oven, at 37°C for 48 hours to obtain the extracts. After biofilm formation, the wells were washed three times with 200 μ L of PBS 1x (pH 7.2) and 200 μ L of the extracts were applied in each well ($n = 8$ per group), and incubated at 37°C for 24 hours. After this time, the extracts were removed

and each well was washed with PBS 1x. The plates were dried at room temperature for 24 hours. Afterwards, the wells were stained with 200 μ L of 0.1% crystal violet solution (Synth, Diadema, SP, Brazil) at room temperature for 20 minutes. The excess stain was rinsed by washing with distilled water. The plates were dried at room temperature and the dye linked to the adherent cells was solubilized with 200 μ L of 33% acetic acid. To quantify the biofilm biomass remaining after treatment, the absorbance was measured (590 nm). For the positive control (PC), saline solution was used, and the negative control was sterile culture medium. Data were expressed in percentage of biomass reduction.

Modified direct contact test (MDCT)

The modified direct contact (APPENDIX C) test was performed based on previous studies (2, 14). Sterilized bovine root dentine slices ($n = 6$ per group) with a size of 5 mm x 5 mm x 0.7 mm (width x length x thickness) were submerged in TSB (2 mL) containing 1% of the inoculum of *E. faecalis* (1×10^8 CFU mL⁻¹), in 24-well culture plates. The plates were kept in a microaerophilic environment for 14 days. Disks of each sealer were made, measuring 7 mm in diameter x 1 mm in internal thickness, which were kept in an oven at 37 ° C and controlled humidity for 48 hours. Then, the disks of each sealer were placed on dentine slices containing the formed biofilm. In the positive control group, a teflon disc was used. Time of contact was 15 hours. The dentine slices were placed individually in microtubes containing 1 mL of saline solution and glass pearls, and they were agitated in a vortex for 1 minute (Model Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil). Afterwards, serial decimal dilution was performed, and the antibiofilm activity of the sealers was assessed by a colony-forming unit (CFU) counting method. The data were submitted to logarithmic transformation (\log_{10}).

Statistical analysis

All data was analysed with the GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) statistical software package. Physicochemical data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey's tests. Cell viability were analyzed by two-way ANOVA test with Bonferroni correction. The antimicrobial tests were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn tests ($\alpha=0.05$).

Results

The results of physicochemical properties are represented in Table 2. Setting time of Sealer Plus BC was shorter than TotalFill BC and AH Plus ($p < 0.05$). Sealer Plus BC presented proper radiopacity and greater flow by area analysis. Sealer Plus BC presented similar flow to TotalFill BC (diameter analysis). At 1 day, the pH values were greater for TotalFill BC, followed by Sealer Plus BC ($p < 0.05$). No difference was observed between TotalFill BC and Sealer Plus BC in the other periods ($p > 0.05$). AH Plus was similar to control (distilled water) at all periods ($p > 0.05$). Solubility was greater for TotalFill BC when compared with other sealers ($p < 0.05$). AH Plus had the lowest solubility ($p < 0.05$). Regarding volumetric change, all sealers had a volume decrease. Sealer Plus BC had similar values than other sealers ($p > 0.05$).

Table 2 - Mean and standard deviation of setting time, radiopacity, flow, pH, solubility, and volumetric change observed in the different root canal sealers.

Tests	AH Plus	TotalFill BC	Sealer Plus BC	Control (H ₂ O)	
Setting time (min)	383.8 (± 5.31) ^b	580.2 (± 21.74) ^a	195.0 (± 24.29) ^c	-----	
Radiopacity (mmAl)	9.11 (± 0.49) ^a	6.09 (± 0.80) ^b	4.17 (± 0.28) ^c	-----	
Flow (mm)	20.99 (± 0.86) ^b	24.92 (± 1.31) ^a	25.60 (± 1.08) ^a	-----	
Flow area (mm ²)	402.9 (± 98.62) ^c	525.1 (± 47.25) ^b	695.6 (± 67.90) ^a	-----	
pH	1 day	6.49 (± 0.11) ^c	10.46 (± 0.20) ^a	9.83 (± 0.31) ^b	6.35 (± 0.29) ^c
	7 days	6.17 (± 0.71) ^b	10.27 (± 0.56) ^a	9.76 (± 0.68) ^a	6.74 (± 0.14) ^b
	14 days	6.60 (± 0.35) ^b	10.50 (± 0.51) ^a	9.66 (± 0.74) ^a	6.27 (± 0.33) ^b
	21 days	6.11 (± 0.26) ^b	9.65 (± 0.93) ^a	9.98 (± 0.57) ^a	6.51 (± 0.45) ^b
Solubility (% mass loss)	0.33 (± 0.20) ^c	10.09 (± 2.58) ^a	4.71 (± 1.27) ^b	-----	
Volumetric change (%)	-0.41 (± 0.20) ^b	-1.98 (± 1.09) ^a	-1.19 (± 0.56) ^{ab}	-----	

Different letters on the same line indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

In the MTT assay, Sealer Plus BC in the 1:1 and 1:2 dilutions had significantly lower cell viability (51.14% and 84.53%, respectively) compared to the other sealers and the negative control ($p < 0.05$) (Figure 1). NR assay revealed that AH Plus, Sealer Plus BC and TotalFill BC had no cytotoxic effects on Saos-2 cells, as cell viability not significantly different when compared to the negative control ($p > 0.05$) (Figure 1). In the periods of 1 and 7 days (Figure 2), Sealer Plus BC showed greater cell viability in comparison to the control group ($p < 0.05$).

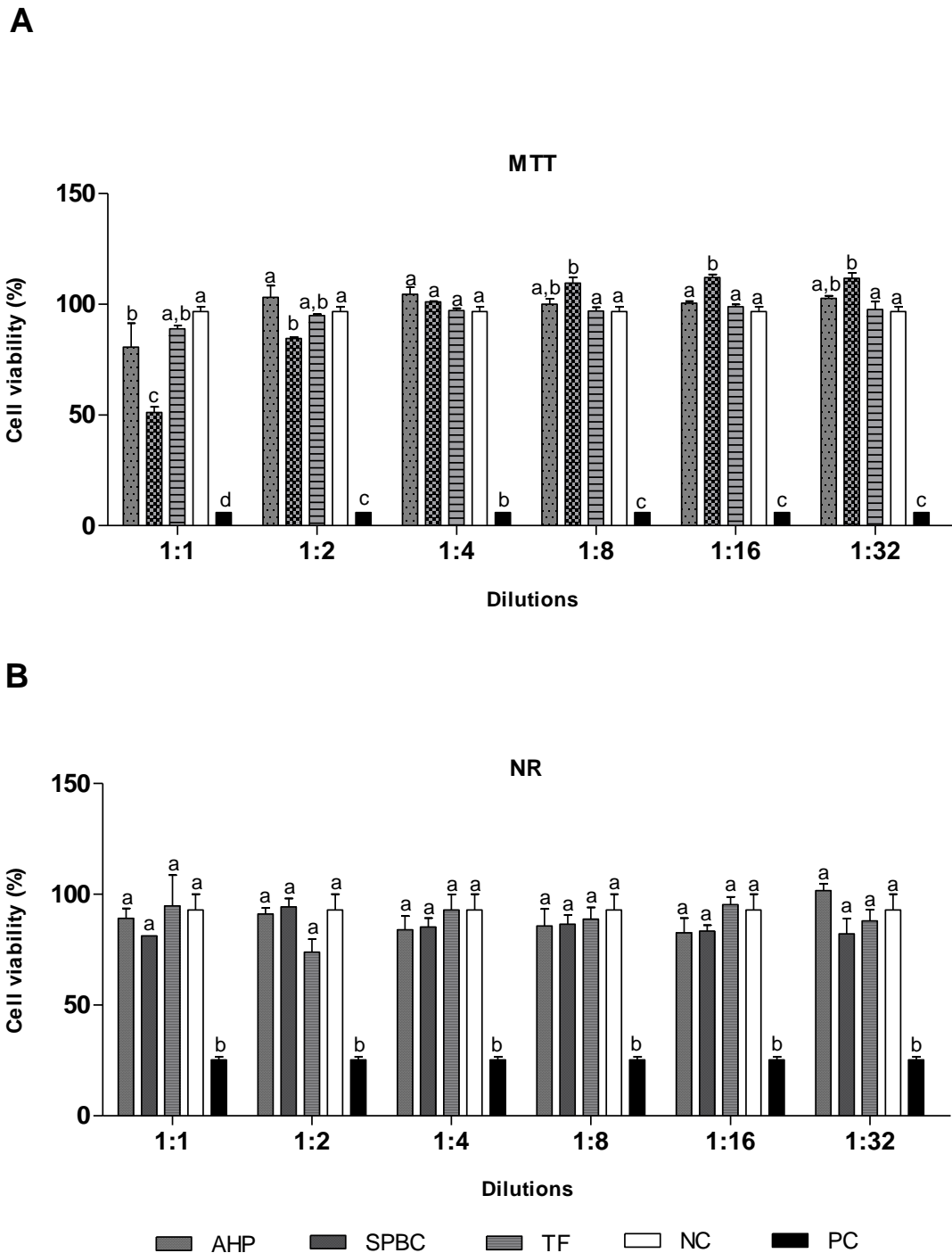


Figure 1 - Saos-2 cell viability evaluated by MTT (a) and NR (b) assays, after 24 hours of exposure to AHP, SPBC and TFBC sealers extracts at 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 dilutions, serum-free culture medium (negative control), and 20% DMSO (positive control). Bars with different letters represent significant differences between sealers (in each dilution), negative control and positive control ($p < 0.05$). AHP- AH Plus; SPBC- Sealer Plus BC; TFBC- TotalFill BC Sealer; NC- negative control; PC- positive control.

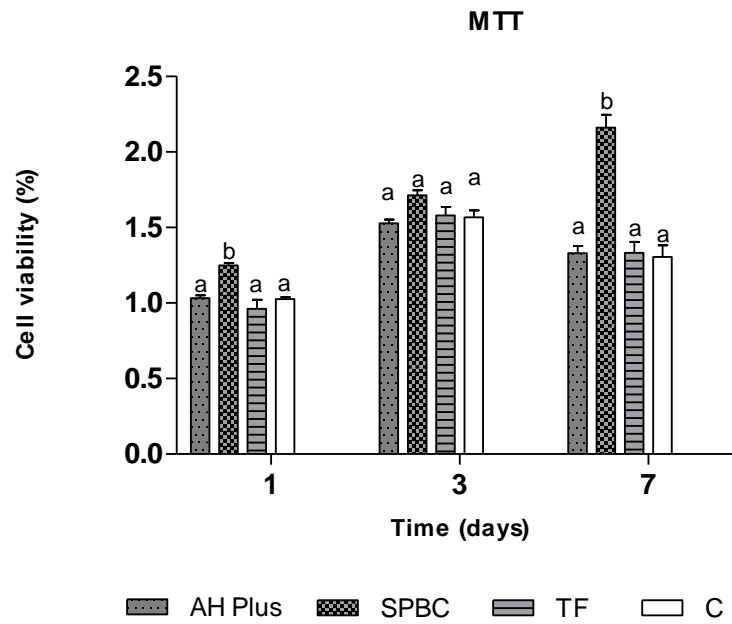


Figure 2 - Saos-2 cell viability evaluated by MTT assay after exposure to AHP, SPBC, TF at 1:8 dilution and serum-free culture medium (negative control), for the time intervals of 1, 3 and 7 days. Bars with different letters represent significant differences between sealer extracts and negative control in each period. AHP- AH Plus; SPBC- Sealer Plus BC; TF, TotalFill BC Sealer; C, negative control.

In the crystal violet assay, Sealer Plus BC and TotalFill BC had significantly greater antibiofilm activity against *E. faecalis* biofilm when compared to AH Plus ($p < 0.05$), without difference between them ($p > 0.05$). Sealer Plus BC was more effective against *C. albicans* ($p < 0.05$). No significant difference in the biomass reduction was observed amongst the sealers ($p > 0.05$) against dual-species biofilm (Table 3). In the MDCT (Table 4), TotalFill BC was more effective than other sealers, followed by Sealer Plus BC ($p < 0.05$). No significant difference was observed amongst AH Plus and positive control ($p > 0.05$).

Table 3 - Mean and standard deviation of percentage biomass reduction after 24 hours in contact with sealer extracts (48 hours) with mono- and dual-species biofilms of *E. faecalis* and/or *C. albicans*

Strain	AH Plus	TotalFill BC	Sealer Plus BC
<i>E. faecalis</i>	15.90 (± 4.1) ^b	52.48 (± 6.8) ^a	57.54 (± 4.2) ^a
<i>C. albicans</i>	12.20 (± 4.8) ^c	52.31 (± 6.5) ^b	71.88 (± 4.9) ^a
<i>Dual-species</i>	21.43 (± 3.5) ^a	14.61 (± 6.3) ^a	21.37 (± 3.5) ^a

Different letters on the same line indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 4 - Mean and standard deviation of antimicrobial activity of the materials evaluated, expressed in CFU mL⁻¹ for modified direct contact test on *E. faecalis* biofilm, after 15 hours of contact

	AH Plus	TotalFill BC	Sealer Plus BC	Positive control
CFU mL ⁻¹	7.413 (±0.09) ^a	4.789 (±0.44) ^c	5.814 (±0.53) ^b	7.583 (±0.27) ^a

Different letters on the same line indicate statistically significant difference (p<0.05).

Discussion

Based on the obtained results, our null hypothesis was partially rejected since in general the sealers showed different physicochemical properties. Overall, both calcium silicate-based materials were associated with flow, solubility and pH greater than AH Plus. However, some differences were also observed between TotalFill BC and Sealer Plus BC. The new sealer when compared to TotalFill BC has shorter setting time, better flow when evaluating in mm², lower solubility, and its volumetric change was similar to AH Plus.

Regarding the setting time of the sealers, our results agree with previous studies that observed shorter setting time to AH Plus when compared with TotalFill BC (7). AH Plus also showed longer setting time than Sealer Plus BC (10). However, the values of the setting time of AH Plus and Sealer Plus BC differ from those obtained in a previous study (10). This difference may be related to the fact that the present study evaluated the setting time according to ISO 6876:2012, while Mendes et al. (10) evaluated the setting time according to ASTM C266-03 (16). ISO 6876 considers setting time as the time from the end of sealers mixing until the moment when the marks of the Gilmore needle could not be observed on the sealer surface (12). ASTM C266 in addition to recommending the evaluation of initial setting time and final setting time, considers that the initial setting time is the time between the initial contact of the sealer and the liquid, and the time when the initial Gilmore needle does not leave a complete circular impression on the surface of the cement (16). Another difference between these methods is related to the Gilmore needle used. ISO 6876 recommends the use of a Gilmore needle with a mass of 100 ± 0.5 g and diameter of 2 ± 0.1 mm (12, 17), while ASTM C266 recommends the use of a Gilmore needle with a mass of 113.4 ± 0.5 g and diameter of 2.12 ± 0.05 mm (16). Although Sealer Plus BC has the shortest setting time, this time is adequate for its clinical applicability.

According to ISO 6876 standard (12), the radiopacity of a root canal filling material should be greater than 3 mm Al. This property is important in order to distinguish the sealer from the anatomical structures (10). The flow ability of root canal sealer allows sealer to penetrate into the irregularities, isthmus and ramifications of root canal system (18). Moreover, the obturation should provide filling of the irregular areas of the root canal (19). All the evaluated sealers presented radiopacity and flow in accordance to the ISO standard, in agreement with previous studies (7, 10).

Solubility and pH after long periods are evaluated to analyze the behaviour of sealers over time (2, 9). The alkalinization ability contributes to the repair process by mineralized tissues (17). The pH and solubility of cements can be related, since solubility can contribute to the release of hydroxyl ions (18). Calcium silicate sealers promoted high pH and high solubility. This result may be related to the hydrophilic property of materials based on calcium silicate, which present greater solubility when evaluated by immersion in water. The alkaline pH is explained by the release of OH⁻ and Ca²⁺ ions and can play an important role in the repair of periapical tissues (19). AH Plus did not promote an increase in pH as observed for epoxy resin-based materials (18). AH Plus is hydrophobic and has no water absorption; consequently, its solubility is significantly lower (20).

Sealer Plus BC and TotalFill BC Sealer have a similar composition. Although the high solubility of Sealer Plus BC and TotalFill BC Sealer may appear to be a disadvantage of calcium silicate-based sealers (19), the tests available considering only mass loss after immersion in water may be inadequate for evaluating these materials (20). In order to compensate the limitations of conventional tests, micro-CT have been proposed as an alternative to evaluate solubility and dimensional changes of sealers by means of the volumetric change of the materials after immersion in a fluid (1, 7). Our findings showed that even with greater values of mass loss, TotalFill BC and Sealer Plus BC showed low volumetric reduction. So, we can assume that the solubility of these sealers could be compensated by their fluid absorption, resulting in a volumetric stability (1). These results suggest that volumetric change test present more similarities with clinical performance of root canal sealers (7).

Cell viability after exposure to the different dilutions of sealer extracts was evaluated by MTT and NR assays in human Saos-2 osteoblast cells (14). Benetti et al. (20) observed that the Sealer Plus BC extract (at 1:50 dilution) had higher cytocompatibility on L929 fibroblast in comparison to MTA Fillapex and AH Plus sealers,

and exhibited reduction in cell viability at 1:100 and 1:200 dilutions. In the analysis performed for periods of 1, 3 and 7 days, it was found that AH Plus, Sealer Plus BC and TotalFill BC Sealer demonstrated cytocompatibility with Saos-2 cells. Moreover, there was a decrease in the cell viability in the period of 7 days with the exception of Sealer Plus BC. Our results corroborate a previous study, which reported that there was a decrease in cell viability in the MTT assay, when cells were tested with DMEM culture medium (Sigma/Aldrich) serum-free (without the presence of FBS) (21). The serum-free medium has nutrients, growth factors, hormones, trace elements and factors that promote adherence (21), and it does not present the undesired effect of FBS, which can interfere with the results of the MTT assay (22).

Although several microorganisms are frequently associated with endodontic infections (5), in this study we chose to evaluate the antimicrobial activity of endodontic sealers against *E. faecalis* and *C. albicans*, since these microorganisms are commonly observed as biofilm, increasing their resistance to antimicrobial agents when compared with the planktonic microorganisms (5, 23). *E. faecalis*, often associated with failure of endodontic treatment, are Gram-positive bacteria that show resistance during endodontic treatment, and are responsible for persistent root canal infection (2). *C. albicans* is the fungal specie observed in isolated pure strains or in association with Gram-positive and negative bacteria, and has the capacity to invade and adhere to dentin tubules, and to survive in severe environmental conditions (23).

The direct contact test (DCT) is an established and widely used methodology in the evaluation of antimicrobial activity (2, 5). However, materials are usually evaluated against bacteria in planktonic form. The modified direct contact test (MDCT) used in the present evaluated materials in direct contact with biofilm. A previous study considered the evaluation of endodontic materials after setting as a disadvantage for MDCT (2). However, studies show that calcium silicate-based endodontic materials have significant antimicrobial activity even after long periods, such as 30 days (6). Therefore, the analysis carried out by the present study approaches a clinical condition, since the sealers were evaluated 48 hours after manipulation. Future studies, using other methodologies, must be carried out in order to better understand the antimicrobial activity of this new material.

In the present study, Sealer Plus BC had antimicrobial activity against *E. faecalis* biofilm, but was more effective against *C. albicans*. TotalFill BC had antimicrobial activity against *E. faecalis* and/or *C. albicans* biofilms. TotalFill BC demonstrated greater

effectiveness against *E. faecalis* when compared with AH Plus, corroborating a previous study (5). The alkalization capacity of calcium silicate-based sealers may be related to their antimicrobial activity.

The techniques used for cleaning and disinfecting of root canals are effective in reducing the microbial load, but due to the complexity of the root canals system, they are not able to eliminate all microorganisms (5). Dimensional change of endodontic sealers may compromise the sealing of the root canal (4), allowing the infiltration of fluids from the periapical tissue and microorganisms (1). Since Sealer Plus BC has volumetric stability and antimicrobial activity, it can contribute to the success of endodontic treatment.

An important limitation of the current study is that results from laboratory studies may not represent a real clinical situation. In addition, we must also take into account that international standards for assessment of root canal sealers may not be ideal, mainly when evaluating calcium silicate-based sealers regarding setting time and solubility (24). However, the results of basic research protocols using *in vitro* studies can contribute to the conduction of subsequent studies in an effort to interpret the behavior of bioceramic materials (25).

In conclusion, Sealer Plus BC has cytocompatibility, antibiofilm activity against *E. faecalis* and/or *C. albicans*, and physicochemical properties as setting time, flow, radiopacity, volumetric change and pH suitable for clinical use. However, this endodontic sealer showed solubility above than that recommend by ISO 6876. Further *in vivo* and clinical researches should be performed to assess new bioceramic sealers.

Declaration of conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-químicas, a citocompatibilidade e a atividade antibiofilme de um novo cimento endodôntico à base de silicato de cálcio, Sealer Plus BC (MK Life, Brasil), em comparação com TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, Suíça) e AH Plus (Dentsply, Alemanha). O tempo de presa e o escoamento foram avaliados com base nas normas ISO 6876. O pH foi avaliado após diferentes períodos, e a radiopacidade por análise radiográfica (mmAl). A solubilidade (% de perda de massa) e alteração volumétrica (por micro-CT) foram avaliadas após

30 dias de imersão em água destilada. Citocompatibilidade foi avaliada pelos ensaios metiltetrazólio (MTT) e vermelho neutro (NR), após exposição das células Saos-2 ao extrato de cimento por 24 horas. Análise adicional foi realizada através do ensaio MTT após 1, 3 e 7 dias de exposição das células Saos-2 aos extratos dos cimentos na diluição de 1:8. Atividade antibiofilme contra *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans* foi avaliada pelos ensaios cristal violeta e contato direto modificado. As propriedades físico-químicas foram analisadas utilizando os testes ANOVA e Tukey; MTT e NR foram analisados pelos testes ANOVA e Bonferroni; os ensaios antimicrobianos foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0.05$). Sealer Plus BC apresentou tempo de presa, radiopacidade e escoamento adequados, além de capacidade de alcalinização. Sealer Plus BC foi significativamente mais solúvel que AH Plus ($p<0.05$) e apresentou alteração volumétrica similar à de AH Plus e TotalFill BC ($p>0.05$). Sealer Plus BC apresentou atividade antibiofilme, sem efeito citotóxico. Como conclusão, embora Sealer Plus BC apresente maior solubilidade, este cimento apresentou propriedades físico-químicas adequadas, citocompatibilidade e atividade antibiofilme.

References

1. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, Belladonna FG, De-Deus GA, Lima IC, et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J* 2017;50:407-414.
2. Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46:755-762.
3. Jafari F, Jafari S, Etesamnia P. Genotoxicity, Bioactivity and Clinical Properties of Calcium Silicate Based Sealers: A Literature Review. *Iran Endod J* 2017;12:407-413.
4. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, Espir CG, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Solubility, Porosity, Dimensional and Volumetric Change of Endodontic Sealers. *Braz Dent J* 2019;30:368-373.
5. Poggio C, Trovati F, Ceci M, Colombo M, Pietrocola G. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. *J Clin Exp Dent* 2017;9:e743-e748.

6. Silva Almeida LH, Moraes RR, Morgental RD, Pappen FG. Are Premixed Calcium Silicate-based Endodontic Sealers Comparable to Conventional Materials? A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod* 2017;43:527-535.
7. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chavez-Andrade GM, de Almeida M, Navarro LG, Steier L, et al. Physicochemical Properties and Volumetric Change of Silicone/Bioactive Glass and Calcium Silicate-based Endodontic Sealers. *J Endod* 2017;43:2097-2101.
8. Pires PM, Santos TP, Fonseca-Goncalves A, Pithon MM, Lopes RT, Neves AA. Mineral density in carious dentine after treatment with calcium silicates and polyacrylic acid-based cements. *Int Endod J* 2018;51:1292-1300.
9. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, Chavez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. *J Endod* 2019;45:1248-1252.
10. Mendes AT, Silva PBD, So BB, Hashizume LN, Vivan RR, Rosa RAD, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of New Calcium Silicate-Based Sealer. *Braz Dent J* 2018;29:536-540.
11. Benetti F, de Azevedo Queiroz IO, Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, Oliveira SHP, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Braz Oral Res* 2019;33:e042.
12. International Organization for Standardization. ISO 6876: Dental Root Canal Sealing Materials. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2012.
13. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod* 2007;33:1110-1116.
14. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chavez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J* 2019;52:979-986.
15. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity. Geneva, Switzerland: International Standards Organizatio; 2005.

16. American Society for Testing and Materials. ASTM C266-08: Standard test method for time and setting of hydraulic-cement paste by Gilmore needles. Philadelphia: ASTM; 2008.
17. Donnermeyer D, Burklein S, Dammaschke T, Schafer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology* 2018;
18. Siqueira JF, Jr., Fraga RC, Garcia PF. Evaluation of sealing ability, pH and flow rate of three calcium hydroxide-based sealers. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:225-228.
19. Vertuan GC, Duarte MAH, Moraes IG, Piazza B, Vasconcelos BC, Alcalde MP, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Root Canal Sealer. *J Endod* 2018;44:501-505.
20. Benetti F, de Azevedo Queiroz Í, Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, Oliveira SHP, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Braz Oral Res* 2019;33:e042.
21. Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, et al. Development and evaluation of reparative tricalcium silicate-ZrO₂ - Biosilicate composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2020;
22. Bilmin K, Kopczynska B, Grieb P. Influence of serum and albumin on the in vitro anandamide cytotoxicity toward C6 glioma cells assessed by the MTT cell viability assay: implications for the methodology of the MTT tests. *Folia Neuropathol* 2013;51:44-50.
23. O'Donnell LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, et al. Polymicrobial Candida biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res* 2015;15.
24. Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J* 2017;50 Suppl 2:e120-e136.
25. Vouzara T, Dimosiari G, Koulaouzidou EA, Economides N. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. *J Endod* 2018;44:849-852.

3.3 Publicação 3*

Associação de hipoclorito de cálcio a cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio: propriedades antimicrobianas, físico-químicas e biológicas

Resumo

Objetivo Avaliar atividade antimicrobiana, propriedades físico-químicas, e citocompatibilidade de cimento endodôntico experimental à base de silicatos de cálcio (ECS) e Bio-C Sealer (BCS), com e sem associação ao hipoclorito de cálcio (CH), comparando ao AH Plus (AHP).

Metodologia Tempo de presa (n=6), escoamento (n=10) e radiopacidade (n=6) foram avaliadas com base na ISO 6876/2012. Alteração volumétrica foi avaliada por microtomografia computadorizada (n=6), e solubilidade (n=6) pela perda de massa após 7 e 30 dias de imersão em água. O pH (n=10) foi mensurado após 1, 7, 14 e 21 dias. A atividade antibiofilme sobre *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans* foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (n=6). Citocompatibilidade (n=6) com Saos-2 foi avaliada por meio dos ensaios vermelho neutro (NR) e metiltetrazólio (MTT). ANOVA e Tukey, Kruskal-Wallis e Dunn; ANOVA e Bonferroni foram aplicados ($\alpha=0,05$).

Resultados Tempo de presa de ECS-CH foi menor que de ECS, e de BCS-CH foi semelhante ao BCS. ECS, BCS, ECS-CH e BCS-CH apresentaram radiopacidade e escoamento de acordo com ISO 6876, e pH alcalino. Solubilidade de ECS-CH foi menor que ECS, e do BCS-CH foi menor que BCS em 7 dias. Todos os cimentos apresentaram baixa alteração volumétrica, e não demonstraram efeito citotóxico para Saos-2. BCS-CH apresentou maior efeito contra o biofilme de *E. faecalis* que BCS.

Conclusões A associação de CH a ECS e BCS não prejudicou a citocompatibilidade. Adição de CH ao ECS promoveu menor tempo de presa e solubilidade, mantendo sua atividade antimicrobiana. CH aumentou atividade antibiofilme do BCS, sem prejudicar suas propriedades físico-químicas.

Palavras-chave: Citocompatibilidade, endodontia, silicato de cálcio, *Enterococcus faecalis*, material obturador do canal radicular.

* Artigo nas normas do periódico *International Endodontic Journal*

Introdução

O cimento obturador pode contribuir para o sucesso da terapia endodôntica (Kebudi Benezra *et al.* 2018). De um modo geral, os cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio apresentam propriedades físico-químicas satisfatórias (Tanomaru-Filho *et al.* 2017), capacidade de selamento (Donnermeyer *et al.* 2019) e biocompatibilidade (Alves Silva *et al.* 2020).

O cimento endodôntico experimental à base de silicatos de cálcio (ECS), é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio e tungstato de cálcio, e o seu veículo é o polietilenoglicol 400. ECS demonstra propriedades físico-químicas adequadas, como tempo de presa, radiopacidade, escoamento, pH e alteração volumétrica (Zordan-Bronzel *et al.* 2021). Este cimento apresenta ainda citocompatibilidade, induz a bioatividade celular (Zordan-Bronzel *et al.* 2019b), é histocompatível e demonstra potencial bioativo (Silva *et al.* 2020).

Bio-C Sealer (Angelus, Londrina, PR, Brasil), é um cimento endodôntico biocerâmico, pronto para uso, que apresenta propriedades físico-químicas (Zordan-Bronzel *et al.* 2019a) e biológicas satisfatórias (López-García *et al.* 2019, Alves Silva *et al.* 2020). AH Plus (AHP, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha) é um cimento à base de resina epóxi, considerado como padrão ouro em propriedades físico-químicas (Silva Almeida *et al.* 2017), embora os cimentos à base de silicatos de cálcio apresentem melhores propriedades biológicas (Giacomino *et al.* 2019).

O insucesso do tratamento endodôntico está relacionado à persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares (Nair *et al.* 2005, Long *et al.* 2020), especialmente *Enterococcus faecalis* (Poggio *et al.* 2017, Prada *et al.* 2019) e *Candida albicans* (Kumar *et al.* 2015). As áreas inacessíveis do sistema de canais radiculares podem servir de abrigo a estes microrganismos, mesmo após o correto preparo biomecânico (Wang *et al.* 2014). Portanto, a atividade antimicrobiana do cimento obturador pode auxiliar no combate a infecção endodôntica residual (Spångberg & Haapasalo 2002, Wang *et al.* 2014), complementando as etapas anteriores do tratamento endodôntico. Deste modo, algumas substâncias são estudadas para serem associadas aos cimentos endodônticos, à fim de melhorar sua atividade antimicrobiana (Del Carpio-Perochena *et al.* 2015, Loyola-Rodríguez *et al.* 2019).

Utilizado tradicionalmente para esterilização industrial e purificação de água (Soligo *et al.* 2018, Dal Bello *et al.* 2019), o hipoclorito de cálcio quando utilizado na endodontia para irrigação de canais radiculares demonstra efetividade na eliminação de *E. faecalis* (de Almeida *et al.* 2014, Soligo *et al.* 2018, Dal Bello *et al.* 2019, Paula *et al.* 2019). O hipoclorito de cálcio pode também ser utilizado como agente antimicrobiano, associado a diferentes materiais (Silva *et al.* 2020). Sua atividade antimicrobiana está relacionada, principalmente, ao seu pH alcalino e a liberação de cloro (Soligo *et al.* 2018, Silva *et al.* 2020).

A adição de 2% de pó de hipoclorito de cálcio aos cimentos ECS e BCS foi proposta com o objetivo de aumentar sua atividade antimicrobiana. Quando associado ao cimento experimental à base de silicatos de cálcio, o hipoclorito de cálcio, não prejudicou sua biocompatibilidade e seu potencial bioativo (Silva *et al.* 2020). Até o momento não existem estudos que tenham analisado a atividade antimicrobiana, citotoxicidade e propriedades físico-químicas desta associação. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar estas propriedades de dois cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio (ECS e BCS), com e sem adição de 2% de hipoclorito de cálcio, em comparação ao AHP. A hipótese nula é de que a associação de hipoclorito de cálcio aos cimentos ECS e BCS não modifica atividade antimicrobiana, citocompatibilidade e propriedades físico-químicas.

Materiais e Métodos

Os materiais avaliados, seus respectivos fabricantes, composição e proporção estão especificados na tabela 1.

Propriedades físico-químicas

Foram avaliadas as propriedades físico-químicas de tempo de presa, escoamento, radiopacidade, solubilidade, alteração volumétrica e pH (APÊNDICE A).

Tempo de presa

O tempo de presa foi avaliado com base na norma ISO 6876:2012. Foram confeccionados moldes de gesso (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura, os quais permaneceram em água destilada por 24 horas antes do preparo dos corpos de prova (n = 6). Logo após a manipulação,

os cimentos foram inseridos nos respectivos moldes, e mantidos em estufa à 37 °C e 95% de umidade, durante o período de avaliação. O tempo de presa foi determinado como o período, em minutos, entre o término da manipulação e o momento em que a agulha de Gilmore (com massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm) já não produzisse marcas quando apoiada sobre a superfície dos cimentos.

Tabela 1 Materiais, fabricantes, composição e proporções utilizadas.

Cimentos	Fabricante/número de lote	Composição	Proporção
ECS (Cimento experimental à base de silicatos de cálcio)	FOAr-Unesp, Araraquara, SP, Brasil.	Silicato tricálcico ^a , silicato dicálcico ^a , fosfato de cálcio monobásico ^b , hidróxido de cálcio ^c , óxido de zircônio ^d e tungstato de cálcio ^d , polietileniglicol ^d .	1g: 0.3g (Pó/Líquido)
ECS-CH (ECS + 2% Hipoclorito de cálcio)	FOAr-Unesp, Araraquara, SP, Brasil.	Silicato tricálcico ^a , silicato dicálcico ^a , fosfato de cálcio monobásico ^b , hidróxido de cálcio ^c , óxido de zircônio ^d e tungstato de cálcio ^d , polietileniglicol ^d , hipoclorito de cálcio ^d .	1g:0.02g (Cimento manipulado: Pó de hipoclorito de cálcio)
BCS (Bio-C Sealer)	Angelus, Londrina, PR, Brasil. Lote: 47094	Silicato tricálcico, Silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de silício, polietilenoglicol, óxido de ferro.	Pronto para uso
BCS-CH (BCS + 2% Hipoclorito de cálcio)	Angelus, Londrina, PR, Brasil, Lote: 47094	Silicato tricálcico, Silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de silício, polietilenoglicol, óxido de ferro, hipoclorito de cálcio ^d .	1 g: 0.02g (Cimento manipulado: Pó de hipoclorito de cálcio)
AHP (AH Plus)	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha. Lot: 1903000431	Resina epóxi de bisfenol-A/F; tungstato de cálcio; óxido de zircônio; sílica, óxido de ferro, amina adamantada; n, dibenzil-diamina; tcd – diamina; e óleo de silicone.	1 g: 1 g (Pasta/Pasta)

^aMineral Research Processing, Meyzieu, França. ^bSynth, Diadema, SP, Brasil. ^cMerck, Darmstadt, Alemanha. ^dSigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil.

Escoamento

Com auxílio de uma seringa, depositou-se $0,05 \pm 0,005$ mL de cada um dos cimentos recém manipulados sobre uma placa de vidro ($n = 10$). Após 180 ± 5 segundos, do início da manipulação dos materiais, outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o material, e sobre esta foi posicionado um dispositivo metálico de 100 g, totalizando 120 g. O dispositivo metálico permaneceu por 10 minutos sobre as placas de vidro.

Duas técnicas foram utilizadas para avaliar o escoamento. Na primeira, o diâmetro médio (mm) de cada espécime foi medido com auxílio de um paquímetro digital, de acordo com as especificações da norma ISO 6876:2012. Na segunda, um método adicional foi usado no qual os corpos de prova foram fotografados juntamente a uma régua milimetrada, e as imagens digitalizadas foram analisadas por meio do programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00, para a mensuração da área de escoamento em mm², como descrito por Tanomaru-Filho *et al.*(2007) .

Radiopacidade

Corpos de prova de cada um dos materiais, com diâmetro interno de 10 mm e altura de 1 mm (n = 6), e uma escala (milimetrada) de alumínio foram posicionados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) para a tomada radiográfica, que foi realizada com o aparelho de raios - X Focus (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland), a 60 kV, 7 mA, 18 pulsos/s e 33 cm de distância focal. Os filmes foram processados, e as imagens foram digitalizadas e avaliadas por meio do programa Image J para Windows. Para a determinação da radiopacidade dos cimentos equivalente em milímetros de alumínio, foram analisadas áreas de cada um dos degraus da escala milimetrada. A conversão, dos valores obtidos, foi realizada por meio de uma equação de conversão, conforme descrito em estudo prévio (Húngaro Duarte *et al.* 2009).

Solubilidade

A avaliação da solubilidade foi realizada com base em estudo prévio (Carvalho-Junior *et al.* 2007). Foram utilizados moldes circulares de silicone com 7,75 mm de diâmetro interno e 1,5 mm de altura (n = 6), os quais foram preenchidos com cada um dos materiais, e um fio de nylon impermeável foi inserido no interior de cada cimento ainda fresco. As amostras foram colocadas entre 2 placas de vidro cobertas com filme de celofane. Sobre os espécimes à base de silicato de cálcio, os quais necessitam de umidade para tomar presa, foram acomodadas gazes umedecidas (em água destilada) entre os moldes e as placas de vidro, conforme descrito por Tanomaru-Filho *et al.* (2017). O conjunto foi armazenado em estufa com temperatura de 37 °C e 95% de umidade por um período correspondente a três vezes o tempo de presa dos materiais. Após este período, os espécimes foram removidos dos respectivos moldes e permaneceram em dessecador a vácuo até a estabilização da massa inicial. Foram

realizadas mensurações das massas a cada 24 horas, em balança de precisão (Analítica Adventurer, Modelo AR2140, Ohaus - Indústria de balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Após estabilização da massa inicial, cada um dos espécimes foi suspenso, por meio da fixação dos fios de nylon, no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 7,5 ml de água deionizada, os quais permaneceram em estufa a 37 °C pelos períodos experimentais de 7 e 30 dias. Decorridos os períodos experimentais, os espécimes foram colocados novamente em desumidificador e foram pesados novamente até a estabilidade da massa final. A solubilidade (S) dos cimentos avaliados correspondeu à perda de massa de cada espécime, expressa em porcentagem.

Alteração volumétrica em micro CT

Esta avaliação foi realizada de acordo com estudo anterior (Zordan-Bronzel *et al.* 2019a). Foram confeccionados corpos de prova, de cada um dos materiais, com dimensões de 7,75 mm de diâmetro por 1,5 mm de altura ($n = 6$), os quais permaneceram em estufa com temperatura de 37 °C e 95% de umidade por um período correspondente a três vezes o tempo de presa. Na sequência, os espécimes foram mantidos em dessecador à vácuo por 24 horas e em seguida foram escaneadas. Os escaneamentos foram realizados utilizando o microtomógrafo SkyScan 1176 (Bruker Micro-CT, Kontich, Bélgica) e os parâmetros empregados foram: voltagem 80 kv, corrente de 300 μ A, 18 μ m de tamanho de pixels, filtro de cobre e alumínio (Cu + Al) e rotação de 360°. Em seguida, cada espécime foi mantido em um frasco de plástico contendo 7,5 mL de água destilada, pelos períodos de 7 e 30 dias. Na metade de cada período, mudou-se a posição dos espécimes, para que os mesmos permanecessem com suas superfícies expostas à água pelo mesmo intervalo de tempo. Decorrido cada um dos períodos experimentais, os corpos de prova foram acondicionados em dessecador à vácuo por 24 horas, e então submetidos a novo escaneamento. O volume total dos materiais foi calculado para cada período. A reconstrução das imagens foi realizada utilizando o software NRecon (V1.6.10.4, Bruker-MicroCT), sendo que os parâmetros foram definidos para cada material. Os mesmos parâmetros de correção de artefatos foram usados para o mesmo material nos diferentes períodos. As imagens reconstruídas dos diferentes períodos foram sobrepostas utilizando o software Data Viewer (V1.5.2.4, Bruker-MicroCT). Para a análise quantitativa, foi utilizado o software

CTAn (V1.15.4.0, Bruker-MicroCT). Deste modo, foi calculada a alteração volumétrica para cada período experimental.

pH

Tubos de polietileno (Embramed, São Paulo, SP, Brasil), com 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro, foram preenchidos com cada um dos materiais avaliados (n = 10). Na sequência, cada tubo foi inserido em um frasco de plástico contendo 10 mL de água deionizada, sendo que o conjunto frasco e tubo contendo cimento foi mantido em estufa durante os períodos de 1, 7, 14 e 21 dias. Após cada período, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco com 10 mL de água deionizada. Como controle foi utilizada água deionizada acondicionada em frascos de plástico pelos respectivos períodos experimentais (n = 10). Imediatamente após o término de cada período experimental, o pH das soluções foi medido com um pHmetro Digimed (São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado, tendo sido realizadas três aferições para cada espécime.

Avaliação de citotoxicidade

Células Saos-2 (ATCC HTB-85) foram cultivadas em frascos T-75 (Jet Biofil, Guangdong, Guangzhou, Luokan, China) contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), penicillina (100 IU/mL), e estreptomicina (100 µg/mL), os quais foram mantidos à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, até a confluência. Estes experimentos foram realizados sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil).

Para o preparo dos extratos dos materiais avaliados, 0,5 g de cada cimento foi acomodado no fundo de poços vazios de placas de cultura de 12 poços (314.0 mm² área e 3.0 mm altura) (Jet Biofil), e permaneceram em estufa a 37 °C, 95% de umidade, 5% CO₂, até a completa presa destes (24 h). Após este período, as placas permaneceram expostas a luz ultravioleta (UV) para prevenir contaminação (Katara *et al.* 2008). Na sequência, adicionou-se 5 mL de meio de cultura DMEM (meio Dulbecco modificado; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sem soro em cada poço da placa contendo o material, e a placa foi armazenada por 24 h, à 37 °C, em 95% de umidade e 5% de CO₂ (ISO 10993-5 2005). O cimento AH Plus (Dentsply) foi utilizado como material de referência (ISO 10993-5 2005).

Ensaio NR e MTT

A citotoxicidade dos materiais (APÊNDICE C) foi avaliada através dos ensaios vermelho neutro (NR) (Repetto *et al.* 2008), e 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5- brometo de difenil-tetrazólio (MTT) (Mosmann 1983). Foram plaqueadas células Saos-2 (1×10^5 células/mL) em placas de 96 poços (Jet Biofil) contendo DMEM suplementado com 10% de FBS (FBS; Gibco, Life Technologies), penicilina (100 IU mL^{-1}), estreptomicina (100 ug mL^{-1}) (Sigma- Aldrich). Antes da exposição aos materiais, as células foram cultivadas por 24 h a 37°C , 95% de umidade e 5% CO_2 . As células foram expostas aos extratos dos cimentos nas concentrações de 1:5, 1:10 e 1:20, controle negativo (DMEM sem FBS), e controle positivo, 20% de dimethyl sulfoxide (DMSO), por 24 h. Para o ensaio NR, estes foram substituídos por 0,1 mL de meio D-MEM incompleto (sem FBS) contendo $50 \mu\text{g NR/mL}$ (Sigma-Aldrich), seguido por incubação a 37°C , 95% de umidade, 5% de CO_2 por 3 horas. Na sequência, o corante foi removido e o produto colorimétrico foi solubilizado em $100 \mu\text{L}$ da solução de 50% de etanol e 1% de ácido acético (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro a 570 nm (Asys - UVM 340, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil). Para o ensaio MTT, cada poço foi lavado com tampão fosfato (PBS 1X) e foi adicionado álcool isopropílico acidificado (Sigma Aldrich, 0.04N) ao extrato para solubilizar o formazan. A densidade óptica (OD) de 570 nm foi mensurada em espectrofotômetro UVM 340. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada grupo experimental, e a média de cada experimento foi utilizada para a análise estatística.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Teste de contato direto modificado (TCDM)

A atividade antimicrobiana foi avaliada a partir do teste contato direto (APÊNDICE C), com base em estudos anteriores (Zordan-Bronzel 2019b). Após aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia de Araraquara (24/2019), conforme ANEXO C, raízes de dentes anteriores bovinos foram utilizadas para a obtenção de blocos de dentina com dimensões de $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 0,7 \text{ mm}$ (largura x comprimento x espessura). Para a formação dos biofilmes mono e dual-espécies de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*, os microrganismos foram reativados em *Triptic soy broth* – TSb (Difco Detroit, MI, EUA) para *E. faecalis*; e em meio de cultura RPMI

para *C. albicans* e dual-espécies, permanecendo em estufa a 37 °C overnight. Foram usadas cepas padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) e/ou *C. albicans* (ATCC 10231), na concentração de 1×10^8 UFC⁻¹. Os blocos de dentina foram submetidos a formação de biofilme em placa de cultura celular de 24 poços, mantidas em incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) a 80 RPM durante 7 dias, com trocas do meio de cultura a cada 48 horas. Foram utilizados eluídos dos materiais na concentração de 25 mg/mL, os quais permaneceram em estufa a 37 °C por 48 h. Cada bloco de dentina foi transferido para um microtubo contendo 500 µL de eluído filtrado em membrana de 0,02 µm. No grupo controle utilizou-se solução salina. O tempo de contato entre os blocos de dentina contendo biofilme e os eluídos foi de 15h, mantidos em estufa a 37°C. Decorrido o período de contato, os blocos de dentina foram individualmente colocados em microtubos contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro e agitados em vortéx por 1 min. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e plaqueamento, em placas de Petri contendo *Tryptic soy agar* (TSa) para biofilmes de *E. faecalis*, *Sabouraud Dextrose agar* (SDa) para biofilmes de *C. albicans*, *m-Enterococcus agar* para *E. faecalis* e SDa + cloranfenicol para *C. albicans* nos biofilmes dual-espécies. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. O número de UFC mL⁻¹ dos biofilmes remanescentes após o período de contato com os eluídos foi calculado. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica e análise estatística.

Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados por meio do software estatístico GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), sendo que aqueles referentes às propriedades físico-químicas e TCDM sobre *E. faecalis* foram analisados pelos testes one-way ANOVA e Tukey. Os demais dados obtidos pelos ensaios microbiológicos foram analisados por Kruskal-Wallis e Dunn. A análise dos valores obtidos pelos testes de viabilidade celular foi realizada por two-way ANOVA com correção de Bonferroni ($\alpha=0.05$).

Resultados

Propriedades físico-químicas

Os resultados correspondentes à avaliação das propriedades físico-químicas estão representados nas Tabelas 2 e 3. AHP apresentou o maior tempo de presa, seguido

por ECS e ECS-CH, respectivamente ($P < 0,05$). BCS e BCS-CH apresentaram o menor tempo de presa ($P > 0,05$). BCS apresentou o maior escoamento ($P < 0,05$), enquanto que ECS e ECS-CH apresentaram os menores valores (mm e mm²) ($P > 0,05$). O AHP apresentou maior radiopacidade e menor solubilidade ($P < 0,05$). A radiopacidade de ECS-CH foi semelhante à de ECS ($P > 0,05$). BCS-CH apresentou radiopacidade maior que de BCS ($P < 0,05$). A solubilidade de ECS-CH foi menor que de ECS (7 e 30 dias) ($P < 0,05$). BCS-CH apresentou solubilidade menor que BCS em 7 dias ($P < 0,05$), porém após 30 dias sua solubilidade foi semelhante a de BCS ($P > 0,05$). A alteração volumétrica de ECS, ECS-CH, BCS e BCS-CH em 7 dias foi semelhante ($P > 0,05$). AHP apresentou pH semelhante ao controle em todos os períodos ($P > 0,05$). O pH de ECS-CH foi semelhante ao de ECS ($P > 0,05$), exceto no período de 1 dia ($P < 0,05$). O pH de BCS-CH foi maior que do BCS nos períodos de 1 e 7 dias ($P < 0,05$), e semelhante nos períodos de 14 e 21 dias ($P > 0,05$).

Tabela 2 Tempo de presa, escoamento, radiopacidade, solubilidade e alteração volumétrica (7 e 30 dias) observados para os diferentes cimentos endodônticos (média e desvio padrão).

	ECS	ECS-CH	BCS	BCS-CH	AHP
Tempo de presa (min)	317,7 ($\pm 20,14$) ^b	262,7 ($\pm 1,21$) ^c	219,2 ($\pm 7,36$) ^d	220,3 ($\pm 7,76$) ^d	378,0 ($\pm 2,19$) ^a
Escoamento (mm)	17,96 ($\pm 0,41$) ^d	17,65 ($\pm 0,79$) ^d	30,95 ($\pm 1,47$) ^a	25,14 ($\pm 0,78$) ^b	21,27 ($\pm 0,73$) ^c
Escoamento (mm ²)	301,5 ($\pm 45,0$) ^d	272,4 ($\pm 41,4$) ^d	884,3 ($\pm 44,58$) ^a	539,7 ($\pm 74,45$) ^b	415,4 ($\pm 90,55$) ^c
Radiopacidade (mmAl)	5,65 ($\pm 0,22$) ^c	6,12 ($\pm 0,27$) ^{b,c}	5,68 ($\pm 0,44$) ^c	6,17 ($\pm 0,25$) ^b	9,14 ($\pm 0,33$) ^a
Solubilidade 7 d (% perda de massa)	11,34 ($\pm 1,79$) ^b	5,56 ($\pm 0,91$) ^c	21,83 ($\pm 3,03$) ^a	8,89 ($\pm 1,84$) ^b	0,06 ($\pm 0,06$) ^d
Solubilidade 30 d (% perda de massa)	11,5 ($\pm 3,26$) ^b	5,10 ($\pm 1,80$) ^c	17,92 ($\pm 2,50$) ^a	17,97 ($\pm 3,17$) ^a	0,18 ($\pm 0,36$) ^d
Alteração volumétrica 7 d (%)	0,18 ($\pm 1,67$) ^{a,b}	-0,98 ($\pm 0,82$) ^a	-0,50 ($\pm 0,23$) ^{a,b}	-1,22 ($\pm 0,16$) ^a	0,91 ($\pm 0,39$) ^b
Alteração volumétrica 30 d (%)	0,38 ($\pm 1,00$) ^b	0,23 ($\pm 0,90$) ^{a,b}	-0,73 ($\pm 0,54$) ^{a,b}	-0,84 ($\pm 0,54$) ^a	-0,45 ($\pm 0,21$) ^{a,b}

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$). Valores negativos indicam perda de volume.

Tabela 3 Valores de pH (média e desvio padrão) observados nos diferentes períodos experimentais (1, 7, 14, e 21 dias)

Período	ECS	ECS-CH	BCS	BCS-CH	AHP	Controle
1 dia	9,98 ($\pm 0,46$) ^b	10,95 ($\pm 0,16$) ^a	9,29 ($\pm 0,48$) ^c	10,76 ($\pm 0,03$) ^a	6,55 ($\pm 0,16$) ^d	6,57 ($\pm 0,10$) ^d
7 dias	10,6 ($\pm 0,47$) ^a	10,48 ($\pm 0,30$) ^a	9,63 ($\pm 0,60$) ^b	10,51 ($\pm 0,32$) ^a	6,27 ($\pm 0,33$) ^c	6,43 ($\pm 0,22$) ^c
14 dias	10,46 ($\pm 0,60$) ^a	10,15 ($\pm 0,39$) ^{a,b}	9,68 ($\pm 1,11$) ^b	10,31 ($\pm 0,20$) ^{a,b}	6,33 ($\pm 0,23$) ^c	6,34 ($\pm 0,19$) ^c
21 dias	9,44 ($\pm 1,01$) ^{a,b}	9,59 ($\pm 0,22$) ^a	8,71 ($\pm 1,13$) ^b	9,46 ($\pm 0,40$) ^{a,b}	6,06 ($\pm 0,20$) ^c	6,06 ($\pm 0,16$) ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Citotoxicidade

Nos ensaios NR (Fig. 1a) e MTT (Fig.1b), os materiais avaliados não demonstraram efeito citotóxico para Saos-2, visto que a viabilidade celular foi semelhante, ou até mesmo maior, em relação ao controle negativo (CN). No ensaio NR, AHP apresentou viabilidade celular maior que CN, na diluição 1:5 ($P < 0,05$). Na diluição 1:10, ECS-CH demonstrou maior viabilidade celular em relação ao CN ($P < 0,05$). Pelo teste de MTT, ECS e ECS-CH demonstraram maior viabilidade celular que o CN ($P < 0,05$), na diluição 1:5. ECS e BCS, na diluição 1:10, apresentaram maior viabilidade celular em comparação ao CN ($P < 0,05$). Na diluição de 1:20, todos os materiais avaliados proporcionaram maior número de células viáveis que o grupo CN ($P < 0,05$).

Atividade antimicrobiana

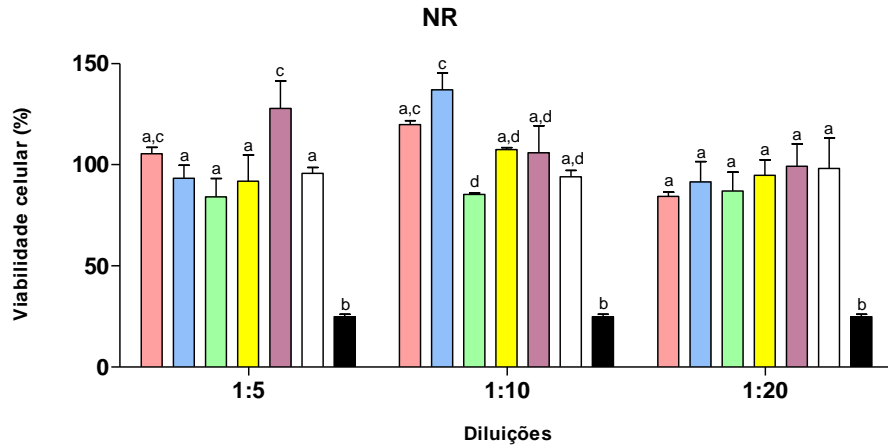
No TCDM (Tabela 4), após 15 h de contato com biofilme de *E. faecalis*, ECS-CH foi o material que apresentou menor número de UFC mL⁻¹, tendo apresentado valores estatisticamente semelhantes aos de ECS ($P > 0,05$). Este por sua vez se assemelha ao BCS-CH, em relação ao número de UFC mL⁻¹ ($P > 0,05$). BCS e BCS-CH proporcionaram maior redução de biofilme dual-espécies sobre *E. faecalis*, em comparação ao controle ($P < 0,05$). Em relação à avaliação da ação dos materiais frente aos biofilmes de *C. albicans* e dual-espécies sobre *C. albicans*, BCS-CH apresentou menor número de UFC mL⁻¹, em comparação ao controle ($P < 0,05$).

Tabela 4 Média e desvio padrão da atividade antimicrobiana dos materiais avaliados, expressos em UFC mL⁻¹ para o teste de contato direto após 15 h de contato com biofilmes mono e dual-espécies de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*

	ECS	ECS-CH	BCS	BCS-CH	AHP	Controle	
<i>E. faecalis</i> (<i>E. f.</i>)	4,55 (±0,48) ^{d,e}	4,19 (±0,52) ^e	6,12 (±0,37) ^c	4,96 (±0,25) ^d	6,74 (±0,14) ^b	7,63 (±0,10) ^a	
<i>C. albicans</i> (<i>C.a.</i>)	7,00 (±0,08) ^a	6,89 (±0,22) ^{a,b}	6,86 (±0,12) ^{a,b}	6,35 (±0,58) ^b	6,73 (±0,14) ^{a,b}	7,34 (±0,44) ^a	
Dual- espécie	<i>E.f.</i>	7,30 (±0,52) ^{a,b}	7,35 (±0,51) ^{a,b}	5,74 (±2,98) ^b	5,16 (±2,89) ^b	7,27 (±0,51) ^{a,b}	8,58 (±0,16) ^a
	<i>C.a.</i>	6,97 (±0,13) ^{a,b}	6,90 (±0,13) ^{a,b}	6,72 (±0,19) ^{a,b}	4,94 (±1,63) ^b	7,19 (±0,53) ^a	7,57 (±0,63) ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

(a)



(b)

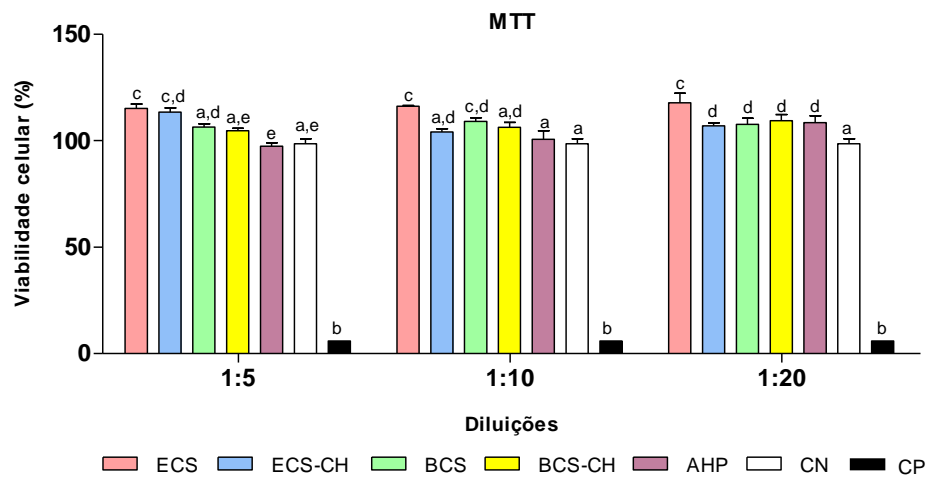


Figura 1 – Viabilidade celular de Saos-2 avaliada pelos ensaios NR(a) e MTT (b), após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos ECS, ECS-CH, BCS, BCS-CH e AHP nas diluições de 1:5, 1:10 e 1:20, meio de cultura sem soro (controle negativo), e DMSO 20% (controle positivo). Barras com letras diferentes representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos, controle negativo e controle positivo em cada diluição. ECS, cimento experimental à base de silicatos de cálcio (composição descrita na Tabela 1); ECS-CH, ECS associado ao hipoclorito de cálcio (2%); BCS, Bio-C Sealer; BCS-CH, Bio-C Sealer associado ao hipoclorito de cálcio (2%); AHP, AH Plus; CN, controle negativo; CP, controle positivo.

Discussão

A hipótese nula foi parcialmente rejeitada, uma vez que de uma forma geral, as propriedades físico-químicas e biológicas dos cimentos associados ao hipoclorito de cálcio foram mantidas ou melhoradas. Houve uma potencialização da atividade antibiofilme na associação de CH ao BCS.

A proporção pó-líquido de 1 g de pó para 400 mg de polietilenoglicol do ECS utilizada em estudos anteriores (Zordan-Bronzel *et al.* 2019b, Zordan-Bronzel *et al.* 2021), foi modificada no presente estudo para 1 g de pó para 300 mg de polietilenoglicol. Nesta proporção, o cimento experimental apresentou melhor consistência, menores valores de tempo de presa, escoamento e solubilidade, além de não alterar as demais propriedades avaliadas.

O hipoclorito de cálcio é disponibilizado em grânulos que quando dissolvidos em solução aquosa, resultam na formação de grande quantidade de ácido hipocloroso, o qual penetra na parede celular bacteriana, contribuindo para a neutralização de microrganismos como o *E. faecalis* (de Almeida *et al.* 2014). Estudos sugerem a utilização de CH em substituição ao hipoclorito de sódio na irrigação dos canais radiculares (Dal Bello *et al.* 2019), visto que ele é relativamente estável, podendo apresentar até 65% mais cloro disponível que o NaOCl, apresenta ainda capacidade de dissolução tecidual (Dutta & Saunders 2012), atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* (Soligo *et al.* 2018), biocompatibilidade (Sedigh-Shams *et al.* 2016), além de não afetar negativamente as propriedades mecânicas da dentina (Soligo *et al.* 2018).

Embora um estudo anterior tenha constatado que o hipoclorito de cálcio quando utilizado na concentração de 5% apresentou citocompatibilidade semelhante ao hipoclorito de sódio a 0,5% (Sedigh-Shams *et al.* 2016), o presente estudo propôs a adição de 2% do pó de hipoclorito de cálcio aos cimentos endodônticos avaliados, levando em consideração que o efeito citotóxico do hipoclorito de sódio está relacionado à sua concentração e ao tempo de contato (Alkahtani *et al.* 2014). Visando não interferir na biocompatibilidade e no potencial bioativo dos cimentos, optou-se pela associação de ECS e BCS ao pó de hipoclorito de cálcio na proporção de 1:0,02 após testes preliminares, nos quais observamos que as propriedades acima não foram prejudicadas, assim como a manipulação e inserção dos materiais.

O tempo de presa observado para o AHP é superior ao de BCS, corroborando estudos anteriores (Tanomaru-Filho *et al.* 2017) (Zordan-Bronzel *et al.* 2019a). O hipoclorito de cálcio associado ao BCS não alterou seu tempo de presa. No entanto,

reduziu o tempo de presa do ECS, mantendo sua consistência e tempo de trabalho adequados, o que favorece a sua aplicabilidade clínica (Jang *et al.* 2018). A redução do tempo de presa pode ser explicada devido a maior quantidade de pó em relação ao líquido (Cavenago *et al.* 2014, Bosso-Martelo *et al.* 2018).

Todos os materiais avaliados apresentaram escoamento linear médio acima dos 17 mm preconizados pela ISO 6876:2012, uma característica importante para o preenchimento do sistema de canais radiculares (Candeiro, Correia *et al.* 2012). A adição de hipoclorito de cálcio ao cimento experimental não alterou o seu escoamento. No entanto, sua adição ao BCS proporcionou menor escoamento. De acordo com a Angelus (Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A), o clínquer composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico e óxido de cálcio apresenta partículas menores que 2 µm. O CH que apresenta maior partícula pode ter promovido menor escoamento ao cimento. Em contrapartida, o cimento experimental é composto por silicato tricálcico puro (Mineral Research Processing, Meyzieu, França), o qual é constituído por partículas maiores que as do Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-fossés Cedex, França) (Grech *et al.* 2013). A semelhança entre os tamanhos de partícula de ECS e CH pode estar relacionada à manutenção do escoamento para este cimento.

A radiopacidade de um cimento endodôntico permite sua visualização por meio de exame radiográfico (Candeiro *et al.* 2012). Todos os cimentos avaliados apresentaram radiopacidade adequada, acima de 3 mm de alumínio, confirmando os resultados para BCS (Zordan-Bronzel *et al.* 2019a), e AHP (Tanomaru-Filho *et al.* 2017), bem como do cimento experimental à base de silicatos de cálcio (Zordan-Bronzel *et al.* 2021). A adição de CH não prejudicou a radiopacidade de BCS e ECS.

A solubilidade de um material é determinada pela perda de massa após imersão em água (Versiani *et al.* 2016), idealmente inferior a 3% (ISO 6876:2012). A solubilidade do AHP é baixa por ser um cimento à base de resina epóxi, com fortes ligações cruzadas (Viapiana *et al.* 2014). Em contrapartida, a solubilidade apresentada pelos cimentos à base de silicatos de cálcio foi superior ao que é recomendado pela ISO 6876:2012 (Siboni *et al.* 2017, Elyassi *et al.* 2019, Torres *et al.* 2019, Zordan-Bronzel *et al.* 2019a).

Os cimentos de silicato de cálcio são hidrofílicos e necessitam de umidade para tomar presa, apresentando maior perda de massa quando avaliados após imersão em água. Os cimentos à base de silicatos de cálcio TotalFill BC Sealer, Sealer Plus BC e

Bio-C Sealer apresentaram solubilidade significativamente menor após imersão em PBS, comparando-se aos valores apresentados após imersão em água destilada (Torres *et al.* 2019). A associação ao hipoclorito de cálcio promoveu menor solubilidade para ECS nos períodos de 7 e 30 dias, e para BCS no período de 7 dias. A maior quantidade de cálcio nas associações com CH pode ter favorecido a precipitação como hidróxido de cálcio (Camilleri 2010). Essa maior quantidade de cálcio disponível e formação de cristais de apatita sobre a superfície do material (Borges *et al.* 2012, Dawood *et al.* 2015) pode estar relacionada a menor solubilidade (Urban *et al.* 2018). Podemos considerar ainda, que o cloro presente em CH pode interagir com os demais componentes dos materiais durante a reação de hidratação (Bortoluzzi *et al.* 2009), podendo resultar em presa mais efetiva dos materiais, e conseqüentemente em menor solubilidade.

A solubilização de cimentos de silicato de cálcio está relacionada a liberação de íons cálcio e hidroxila (Borges *et al.* 2012), promovendo ambiente alcalino (Parirokh & Torabinejad 2010), e favorecendo o potencial bioativo (Donnermeyer *et al.* 2019). Os cimentos à base de silicatos de cálcio apresentaram pH alcalino, e significativamente maior que do AHP, em todos os períodos avaliados. A adição de CH aumentou ou manteve a alcalinização do meio proporcionada pelos cimentos. O pH para o ECS-CH e para o BCS-CH foi mais alcalino que de ECS e BCS, respectivamente, após 24h, indicando que o hipoclorito de cálcio pode contribuir com maior valor inicial de pH (Silva *et al.* 2020). Este resultado pode estar associado à presença de cloro disponível (Silva *et al.* 2020). Quando a água é incorporada ao cimento, os íons cloro (Cl) são rapidamente difundidos e interagem na reação de hidratação dos materiais à base de silicatos. Os íons Cl e OH possuem mesma carga e por isso se repelem, deste modo, quando ocorre a difusão dos íons Cl no cimento, resultando em uma difusão contrária dos íons OH, e conseqüentemente em aumento da concentração deste íon na água (Bortoluzzi *et al.* 2009).

O ambiente alcalino é desfavorável à proliferação e sobrevivência bacteriana (Gandolfi *et al.* 2012), visto que em pH elevado, a atividade enzimática das bactérias é inibida, afetando o metabolismo, o crescimento e a divisão celular (Estrela *et al.* 1995).

No teste de contato direto modificado observamos que o grupo do cimento ECS-CH foi o que apresentou menor número de UFC mL⁻¹ de *E. faecalis*, tendo apresentado valores semelhantes aos de ECS. Embora o BCS tenha demonstrado maior efetividade contra o biofilme *E. faecalis* em comparação ao AHP e ao controle, o BCS-CH foi ainda

mais efetivo na redução da contagem bacteriana, apresentando valores semelhantes aos de ECS. Na análise quanto a atividade antimicrobiana contra o biofilme de *C. albicans*, e contra o biofilme dual-espécies sobre *C. albicans*, o BCS-CH foi o mais efetivo, em comparação ao grupo controle. Os resultados obtidos corroboram estudo prévio que observou que o cimento experimental à base de silicatos de cálcio demonstrou efetividade contra *E. faecalis* e *C. albicans* na forma planctônica, bem como contra o biofilme de *E. faecalis* (Zordan-Bronzel *et al.* 2019b). Assim como observado no presente estudo, Bio-C Sealer apresentou atividade antimicrobiana frente ao biofilme de *E. faecalis* (Barbosa *et al.* 2020). O hipoclorito de cálcio, quando utilizado como solução irrigadora mostrou-se efetivo contra *E. faecalis* (Dal Bello *et al.* 2019, Paula *et al.* 2019). Os resultados do presente estudo evidenciam que o CH quando associado ao ECS manteve sua atividade antibiofilme, ao passo que quando associado ao BCS, aumentou a atividade antimicrobiana frente ao biofilme de *E. faecalis*. A associação de CH ao BCS proporcionou solubilidade significativamente menor após 7 dias de imersão em água deionizada, pH mais alcalino nos períodos de 1 e 7 dias, o que pode estar relacionado com a maior atividade antimicrobiana.

Embora os cimentos à base de silicatos de cálcio tenham apresentado solubilidade acima do recomendado pela ISO 6876:2012, baixa alteração volumétrica foi observada. A análise de alteração volumétrica, por microtomografia computadorizada é uma avaliação complementar à solubilidade (Tanomaru-Filho *et al.* 2017, Torres *et al.* 2017). A análise conjunta de solubilidade por perda de massa e alterações dimensionais permite melhor interpretação do comportamento dos materiais. Os resultados obtidos quanto a alteração volumétrica dos cimentos AHP e BCS corroboram estudos anteriores (Tanomaru-Filho *et al.* 2017, Torres *et al.* 2017, Zordan-Bronzel *et al.* 2019a). A adição de hipoclorito de cálcio aos cimentos ECS e BCS não interferiu na alteração volumétrica.

Os resultados obtidos pelos ensaios MTT e NR revelaram que todos os cimentos à base de silicatos de cálcio avaliados apresentaram citocompatibilidade para células Saos-2, visto que apresentaram percentual igual ou maior de células viáveis em relação ao grupo controle. Assim como em estudos anteriores, ECS (Zordan-Bronzel *et al.* 2019b) e o BCS (López-García *et al.* 2019, Andrade *et al.* 2020) não demonstraram efeito citotóxico. Ainda, em estudo realizado em subcutâneo de ratos, observou-se que o ECS, mesmo quando associado ao CH, mostrou-se biocompatível (Silva *et al.* 2020).

Novos estudos devem ser realizados a fim de adquirir maior conhecimento quanto a efetividade antimicrobiana a longo prazo, da associação de hipoclorito de cálcio aos cimentos à base de silicatos de cálcio.

Conclusões

A associação do hipoclorito de cálcio aos cimentos ECS e BCS não interferiu na citocompatibilidade. Quando adicionado ao cimento ECS, o hipoclorito de cálcio proporcionou menor tempo de presa e menor solubilidade, mantendo sua atividade antimicrobiana. O hipoclorito de cálcio promoveu maior atividade antibiofilme ao cimento Bio-C Sealer, sem prejudicar suas propriedades físico-químicas.

Referências

- Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S (2014) An in vitro evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. *Journal of Contemporary Dental Practice* **15**(4): 473-481.
- Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM (2020) Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *Journal of Endodontics* **46**, 1470-77.
- Andrade LL, Bueno CEDS, Silveira CFM *et al.* (2020) Evaluation of the cytotoxicity of two endodontic cements based on calcium silicate and Pulp Canal Sealer cement in human fibroblasts, *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*. **7**: 298-303.
- Barbosa VM, Pitondo-Silva A, Oliveira-Silva M *et al.* (2020) Antibacterial Activity of a New Ready-To-Use Calcium Silicate-Based Sealer. *Brazilian Dental Journal* **31**, 611-16.
- Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA *et al.* (2012) Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International Endodontic Journal* **45**, 419-28.

- Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM (2009) The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *Journal of Endodontics* **35**, 550-554.
- Bosso-Martelo R, Pivoto-João MMB, Zordan-Bronzel CL, Viola KS, Coaguila-Llerena EH, Tanomaru-Filho M (2018) Influência da proporção pó-líquido nas propriedades físico-químicas do cimento MTA Repair HP. *Dental Press Endodontics* **8**, 46-50.
- Camilleri J (2010) Hydration characteristics of calcium silicate cements with alternative radiopacifiers used as root-end filling materials. *Journal of Endodontics* **36**, 502-508.
- Candeiro GT, Correia FC, Duarte MAH, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G (2012) Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *Journal of Endodontics* **38**, 842-45.
- Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti 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. *Journal of Endodontics* **33**, 1110-16.
- Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MAH *et al.* (2014) Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* **47**, 120-126.
- Dal Bello Y, Mezzalana GI, Jaguszewski LA *et al.* (2019) Effectiveness of calcium and sodium hypochlorite in association with reciprocating instrumentation on decontamination of root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Australian Endodontic Journal* **45**, 92-7.
- Dawood AE, Manton DJ, Parashos P *et al.* (2015) The physical properties and ion release of CPP-ACP-modified calcium silicate-based cements. *Australian Dental Journal* **60**, 434-44.
- de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Dal Bello Y, Cecchin D, Farina AP (2014) Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Journal of Endodontics* **40**, 1953-57.

- 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. *Journal of Endodontics* **41**, 1353-1358.
- Donnermeyer D, Bürklein S, Dammaschke T, Schäfer E (2019) Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology* **107**, 421-36.
- Dutta A, Saunders WP (2012) Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on soft-tissue dissolution. *Journal of Endodontics* **38**, 1395-1398.
- Elyassi Y, Moinzadeh AT, Kleverlaan CJ (2019) Characterization of Leachates from 6 Root Canal Sealers. *Journal of Endodontics* **45**, 623-27.
- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian Dental Journal* **6**, 85-90.
- Gandolfi MG, Siboni F, Prati C (2012) Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *International Endodontic Journal* **45**, 571-79.
- Giacomino CM, Wealleans JA, Kuhn N, Diogenes A (2019) Comparative Biocompatibility and Osteogenic Potential of Two Bioceramic Sealers. *Journal of Endodontics* **45**, 51-56.
- Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013) Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *International Endodontic Journal* **46**, 632-641.
- Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG (2009) Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *Journal of Endodontics* **35**, 737-40.
- ISO 6876 (2012) *International Organization for Standardization: Dentistry — Root Canal Sealing Materials*. London, British Standards Institution
- ISO 10993-5 (2005) *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity*. Geneva, Switzerland: International Standards Organization.
- Jang JH, Lee CO, Kim HJ, Kim SG, Lee SW, Kim SY (2018) Enhancing Effect of Elastinlike Polypeptide-based Matrix on the Physical Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics* **44**, 1702-08.
- Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V, Chitnis DS (2008) Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian Journal of Medical Microbiology* **26**, 241-42.

- Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P, Camilleri J (2018) Interfacial Characteristics and Cytocompatibility of Hydraulic Sealer Cements. *Journal of Endodontics* **44**, 1007-17.
- Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Chowdary CD (2015) Presence of *Candida albicans* in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment. *Journal of Internatinal Oral Health* **7**, 42-5.
- Long J, Kreft JU, Camilleri J (2020) Antimicrobial and ultrastructural properties of root canal filling materials exposed to bacterial challenge. *Journal of Dentistry* **93**, 103283.
- Loyola-Rodríguez JP, Torres-Méndez F, Espinosa-Cristobal LF *et al.* (2019) Antimicrobial activity of endodontic sealers and medications containing chitosan and silver nanoparticles against. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* **17**, 2280800019851771.
- López-García S, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J *et al.* (2019) Comparative Cytocompatibility and Mineralization Potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials (Basel)* **12**, 3087.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63.
- Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J (2005) Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **99**, 231-52.
- Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *Journal of Endodontics* **36**, 16-27.
- Paula KB, Carlotto IB, Marconi DF, Ferreira MBC, Grecca FS, Montagner F (2019) Calcium Hypochlorite Solutions - An In Vitro Evaluation of Antimicrobial Action and Pulp Dissolution. *European Endodontic Journal* **4**, 15-20.
- Poggio C, Trovati F, Ceci M, Colombo M, Pietrocola G (2017) Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* **9**, e743-48.

- Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A (2019) Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **24**, e364-72.
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125–31.
- Sedigh-Shams M, Gholami A, Abbaszadegan A *et al.* (2016) Antimicrobial Efficacy and Cytocompatibility of Calcium Hypochlorite Solution as a Root Canal Irrigant: An in Vitro Investigation. *Iranian Endodontic Journal* **11**, 169-74.
- Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG (2017) Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *International Endodontic Journal* **50**, e83-94.
- Silva Almeida LH, Moraes RR, Morgental RD, Pappen FG (2017) Are Premixed Calcium Silicate-based Endodontic Sealers Comparable to Conventional Materials? A Systematic Review of In Vitro Studies. *Journal of Endodontics* **43**, 527-35.
- Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM (2020) Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an in vivo study in rats. *International Endodontic Journal* **54**, 100-11.
- Soligo LT, Lodi E, Farina AP, Souza MA, Vidal CMP, Cecchin D (2018) Antibacterial Efficacy of Synthetic and Natural-Derived Novel Endodontic Irrigant Solutions. *Brazilian Dental Journal* **29**, 459-64.
- Spångberg LSW, Haapasalo M (2002) Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome. *Endodontic Topics* **2**, 35-58.
- Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Bier CA (2007) Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Australian Endodontic Journal* **33**, 23-26.
- Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM *et al.* (2017) Physicochemical Properties and Volumetric Change of Silicone/ Bioactive Glass and Calcium Silicate-based Endodontic Sealers. *Journal of Endodontics* **43**, 2097-2101.
- Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2017) Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *Journal of Applied Oral Science* **25**, 374-80.
- Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M (2019) 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. *International Endodontic Journal* **53**, 385-91.
- Urban K, Neuhaus J, Donnermeyer D, Schäfer E, Dammaschke T (2018) Solubility and pH Value of 3 Different Root Canal Sealers: A Long-term Investigation. *Journal of Endodontics* **44**, 1736-1740.
- Versiani MA, Abi Rached-Junior FJ, Kishen A, Pécora JD, Silva-Sousa YT, de Sousa-Neto MD (2016) Zinc Oxide Nanoparticles Enhance Physicochemical Characteristics of Grossman Sealer. *Journal of Endodontics* **42**, 1804-10.
- Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, 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.
- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2014) Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of Endodontics* **40**, 505-08.
- Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM (2019a) Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. *Journal of Endodontics* **45**, 1248-52.
- Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Torres FFE, Abi-Rached GPC, Guerreiro-Tanomaru JM (2021) Calcium Silicate-Based Experimental Sealers: Physicochemical Properties Evaluation. *Materials Research* **24**: e20200243.
- Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM (2019b) Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *International Endodontic Journal* **52**, 979-86.

4 DISCUSSÃO

Considerando o papel fundamental do cimento obturador para o sucesso da terapia endodôntica, e a importância de se avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas de novos materiais, ou modificações na composição de materiais já conhecidos, devido ao seu contato com os tecidos periapicais^{25,51}, o presente estudo avaliou dois novos cimentos endodônticos biocerâmicos prontos para uso, de empresas brasileiras (Bio-C Sealer e Sealer Plus BC), bem como a associação do agente antimicrobiano hipoclorito de cálcio (2%) a um destes cimentos (Bio-C Sealer) e a um cimento endodôntico experimental à base de silicatos de cálcio.

As propriedades físico-químicas são avaliadas de acordo com as normas ISO e ADA^{52,53}. Os resultados apresentados pelos cimentos à base de silicatos de cálcio, bem como pelo AH Plus, corroboram estudos anteriores visto que estes materiais demonstraram tempo de presa adequado para o seu emprego clínico, além de radiopacidade e escoamento que atendem às especificações da ISO 6876/2012^{19,22,52}. A radiopacidade apresentada pelos materiais avaliados permite a avaliação da qualidade da obturação⁵⁴, e o bom escoamento favorece o selamento de áreas anatômicas de difícil acesso, como região de istmo, delta apical, canais acessórios⁵⁴ e túbulos dentinários⁵⁵.

De modo geral, os cimentos hidráulicos à base de silicatos de cálcio, avaliados no presente estudo, apresentaram solubilidade elevada, pH alcalino e atividade antimicrobiana. Deve-se considerar que o potencial bioativo destes materiais é uma consequência da sua solubilidade⁴, visto que ela está relacionada à liberação de íons cálcio e hidroxila⁵⁶, o que resulta em um ambiente alcalino⁵, favorecendo a bioatividade destes materiais, e consequentemente induzindo o reparo, por meio do estímulo de formação de tecido duro⁴. Deste modo, a solubilidade destes materiais parece ser fundamental para as características biológicas positivas⁴. O pH alcalino proporcionado pelos cimentos à base de silicatos de cálcio torna o meio impróprio à sobrevivência e proliferação microbiana⁴¹, causando inibição da atividade enzimática das bactérias⁵⁷, e consequentemente contribuindo para o sucesso do tratamento endodôntico. No presente estudo constatamos que o AH Plus, assim como em estudos anteriores, apresentou valores mais baixos quanto à solubilidade⁵⁸, pH²² e atividade antimicrobiana em comparação aos cimentos à base de silicatos de cálcio^{20,38}.

Apesar da elevada solubilidade ser um motivo de preocupação em relação à qualidade de selamento e possível recontaminação microbiana⁴, estudos nos mostram que os cimentos à base de silicatos de cálcio possuem habilidade de sorção de água^{4,59}, que ocorre após a liberação dos íons cálcio e hidroxila, resultando em expansão, e conseqüentemente em bom selamento dos canais radiculares⁶⁰. Nossos resultados, assim como os obtidos por estudos anteriores, nos mostram que embora os cimentos de silicatos de cálcio tenham apresentado solubilidade elevada, demonstraram baixa alteração volumétrica em avaliação realizada por microtomografia computadorizada^{22,29}, que é uma análise complementar ao teste de solubilidade^{22,61}.

Embora os cimentos hidráulicos tenham apresentado atividade antimicrobiana frente aos biofilmes de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*, pudemos observar que não foram capazes de eliminar os microrganismos presentes. Tais resultados corroboram estudos anteriores nos quais se verificou que os cimentos à base de silicatos de cálcio, embora tenham apresentado atividade antibiofilme, não foram capazes de eliminar biofilmes microbianos^{20,38,62}. No estudo de Jacob et al. (2020)⁶², os autores observaram, através de análise por microscopia eletrônica de varredura, que após contato com cimentos à base de silicatos de cálcio, os biofilmes de *E. faecalis*, previamente cultivados sobre blocos de dentina bovina, eram compostos por monocamadas de células que cobriam parcialmente a superfície dos espécimes. Por outro lado, os biofilmes de *C. albicans* revelaram uma densa rede de leveduras e hifas interconectadas, cobrindo completamente a superfície dos espécimes. Enquanto que a estrutura dos biofilmes dual-espécies exibiu uma arquitetura robusta e composta por leveduras e células bacterianas em multicamadas⁶². Estas observações podem nos auxiliar a compreender a complexidade de organização destes biofilmes, nos evidenciando a razão da dificuldade em eliminá-los, especialmente dos biofilmes dual-espécies.

Constatamos que a adição de hipoclorito de cálcio (2%) ao Bio-C Sealer promoveu maior atividade antibiofilme, não prejudicando suas propriedades físico-químicas, enquanto que quando adicionado ao cimento experimental à base de silicatos de cálcio (ECS), o hipoclorito de cálcio manteve sua atividade antimicrobiana, e proporcionou menor tempo de presa e menor solubilidade. Esta associação não interferiu na citocompatibilidade dos materiais avaliados. O presente estudo foi o primeiro a avaliar as propriedades físico-químicas, citocompatibilidade e atividade antimicrobiana da associação de hipoclorito de cálcio (2%) ao cimento experimental à base de silicatos de cálcio e ao Bio-C Sealer. No estudo *in vivo* de Silva et al. (2020) os

autores observaram que o cimento experimental à base de silicatos de cálcio sem e com associação ao hipoclorito de cálcio (2%) demonstrou biocompatibilidade e potencial bioativo¹⁶.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada a partir dos testes Vermelho Neutro e MTT, visto que cada análise avalia uma organela diferente, tornando possível a obtenção de resultados mais confiáveis. O ensaio vermelho neutro (NR) baseia-se na capacidade das células viáveis incorporarem o corante vital vermelho neutro nos lisossomos, nos fornecendo uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em uma determinada cultura⁶³. Enquanto que o ensaio MTT baseia-se na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, que resulta na conversão do sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5- brometo de difenil-tetrazólio), de cor amarela, em cristais de formazan violeta insolúveis, cuja absorbância é proporcional à quantidade de células vivas⁶⁴. Os resultados obtidos evidenciaram que os cimentos à base de silicatos de cálcio avaliados no presente estudo, TotalFill BC Sealer, Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e o cimento experimental à base de silicatos de cálcio desenvolvido na Faculdade de Odontologia de Araraquara, não demonstraram efeito citotóxico, corroborando estudos anteriores^{20,25,28}. Estudos *in vivo* constataram que os cimentos endodônticos TotalFill BC Sealer, Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, bem como o cimento experimental à base de silicatos de cálcio apresentam biocompatibilidade^{16,26,65}.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, podemos concluir que:

1. O Bio-C Sealer apresentou tempo de presa, escoamento e radiopacidade satisfatórios, além de capacidade de alcalinização do meio. Embora tenha apresentado solubilidade acima do que é recomendado pela ISO 6876/212, o Bio-C Sealer apresentou baixa alteração volumétrica.
2. O Sealer Plus BC apresentou tempo de presa, radiopacidade, escoamento e pH adequados, além de citocompatibilidade e atividade antibiofilme. Apesar de apresentar solubilidade elevada, demonstrou baixa alteração volumétrica, em avaliação por micro-CT.
3. A associação ao hipoclorito de cálcio diminuiu o tempo de presa e a solubilidade do cimento experimental à base de silicatos de cálcio, mantendo sua atividade antimicrobiana e citocompatibilidade. Quando associado ao Bio-C Sealer, o hipoclorito de cálcio proporcionou maior atividade antibiofilme, sem prejudicar as demais propriedades avaliadas.

REFERÊNCIAS*

1. Atmeh AR, Hadis M, Camilleri J. Real-time chemical analysis of root filling materials with heating: guidelines for safe temperature levels. *Int Endod J.* 2020; 53(5): 698-708.
2. Camilleri J. Will bioceramics be the future root canal filling materials?. *Current oral Health Reports.* 2017; 4: 228-38.
3. Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P, Camilleri J. Interfacial characteristics and cytocompatibility of hydraulic sealer cements. *J Endod.* 2018; 44(6): 1007-17.
4. Donnermeyer D, Bürklein S, Dammaschke T, Schäfer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology.* 2019; 107(4): 421-36.
5. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010; 36(1): 16-27.
6. 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(2): 177-205.
7. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993; 19(12): 591-5.
8. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015; 31(4): 351-70.
9. Torabinejad M, White DJ, inventores; Loma Linda University, cessionário. Tooth filling material and method of use. United States patent US 5415547. 1995 May 16.
10. Monteiro Bramante C, Demarchi AC, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LS, et al. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(6): 909-13.
11. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimarães 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.
12. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.* 2008; 11(4): 141-3.
13. Primus CM, Tay FR, Niu LN. Bioactive tri/dicalcium silicate cements for treatment of pulpal and periapical tissues. *Acta Biomater.* 2019; 96: 35-54.

* 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>

14. Camilleri J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod.* 2015; 41(7): 1139-45.
15. 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.
16. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an in vivo study in rats. *Int Endod J.* 2020; 54(1): 100-11
17. Wu T, Xu C, DU R, Wen Y, Chang J, Huan Z, et al. Effects of silicate-based composite material on the proliferation and mineralization behaviors of human dental pulp cells: an in vitro assessment. *Dent Mater J.* 2018; 37(6): 889-96.
18. Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P, Camilleri J. Influence of environment on testing of hydraulic sealers. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 17927.
19. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Torres FFE, Abi-Rached GPC, Guerreiro-Tanomaru JM. Calcium silicate-based experimental sealers: physicochemical properties evaluation. *Mat Res.* 2021; 24(1): e20200243.
20. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J.* 2019; 52(7): 979-86.
21. Silva Almeida LH, Moraes RR, Morgental RD, Pappen FG. Are premixed calcium silicate-based endodontic sealers comparable to conventional materials?. A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod.* 2017; 43(4): 527-35.
22. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, de Almeida M, Navarro LG, Steier L, et al. Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive glass and calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017; 43(12): 2097-2101.
23. Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F, et al. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2018; 10(2): e120-6.
24. Poggio C, Trovati F, Ceci M, Colombo M, Pietrocola G. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(6): e743-8.
25. López-García S, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C, et al. Comparative cytocompatibility and mineralization potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials (Basel).* 2019; 12(19): 3087.
26. Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod.* 2020; 46(10): 1470-7.

27. Barbosa VM, Pitondo-Silva A, Oliveira-Silva M, Martorano AS, Rizzi-Maia CC, Silva-Sousa YTC, et al. Antibacterial activity of a new ready-to-use calcium silicate-based sealer. *Braz Dent J.* 2020; 31(6): 611-6.
28. Benetti F, de Azevedo Queiroz Í, Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, Oliveira SHP, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Braz Oral Res.* 2019; 33: e042.
29. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M. 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.* 2019; 53(3): 385-91.
30. Mendes AT, da Silva PB, Só BB, Hashizume LN, Vivian RR, da Rosa RA, et al. Evaluation of physicochemical properties of new calcium silicate-based sealer. *Braz Dent J.* 2018; 29(6): 536-40.
31. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(2): 231-52.
32. Long J, Kreft JU, Camilleri J. Antimicrobial and ultrastructural properties of root canal filling materials exposed to bacterial challenge. *J Dent.* 2020; 93: 103283.
33. Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of root canal infections. *Prim Dent J.* 2016; 5(2): 84-9.
34. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34(5): 399-405.
35. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod.* 2010; 36(4): 630-5.
36. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(5): 632-41.
37. Jeanneau C, Giraud T, Laurent P, About I. BioRoot RCS extracts modulate the early mechanisms of periodontal inflammation and regeneration. *J Endod.* 2019; 45(8): 1016-23.
38. Alsubait S, Albader S, Alajlan N, Alkhunaini N, Niazy A, Almahdy A. Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate- and epoxy resin-based endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. *Odontology.* 2019; 107(4): 513-20.
39. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.* 2014; 40(4): 505-8.

40. Spångberg LSW, Haapasalo M. Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome. *Endod Topics*. 2002; 2(1): 35-58.
41. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J*. 2012; 45(6): 571-9.
42. Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SeC. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95(3): 345-7.
43. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J*. 2010; 43(10): 917-29.
44. Nirupama DN, Nainan MT, Ramaswamy R, Muralidharan S, Usha HH, Sharma R, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of four endodontic biomaterials against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*. *Int J Biomater*. 2014; 2014: 383756.
45. Nambu T. Study on antibacterial root canal sealer containing chlorhexidine dihydrochloride. II. Investigation of antibacterial activity and follow-up study on clinical usage. *Dent Mater J*. 1984; 3(2): 288-311.
46. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010; 43(5): 430-5.
47. Abbaszadegan A, Gholami A, Ghahramani Y, Ghareghan R, Ghareghan M, Kazemi A, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Cuminum cyminum* as an intracanal medicament compared to chlorhexidine gel. *Iran Endod J*. 2016; 11(1): 44-50.
48. Soligo LT, Lodi E, Farina AP, Souza MA, Vidal CMP, Cecchin D. Antibacterial efficacy of synthetic and natural-derived novel endodontic irrigant solutions. *Braz Dent J*. 2018; 29(5): 459-64.
49. de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Dal Bello Y, Cecchin D, Farina AP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *J Endod*. 2014; 40(12): 1953-7.
50. Sedigh-Shams M, Gholami A, Abbaszadegan A, Yazdanparast R, Saberi Nejad M, Safari A, et al. Antimicrobial efficacy and cytocompatibility of calcium hypochlorite solution as a root canal irrigant: an in vitro investigation. *Iran Endod J*. 2016; 11(3): 169-74.
51. Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 3933.
52. International Organization for Standardization Dentistry (ISO). ISO 6876: root canal sealing materials. London: British Standards Institution; 2012.

53. American National Standards Institute/American Dental Association (ANSI/ADA). Specification no. 57 ADA. Laboratory testing methods: endodontic filling and sealing materials: endodontic sealing materials. Chicago: ANSI/ADA; 2000.
54. Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J Endod*. 2012; 38(6): 842-5.
55. Coronas VS, Villa N, Nascimento ALD, Duarte PHM, Rosa RAD, Só MVR. Dentinal tubule penetration of a calcium silicate-based root canal sealer using a specific calcium fluorophore. *Braz Dent J*. 2020; 31(2): 109-15.
56. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus G, Miranda CE, et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J*. 2012; 45(5): 419-28.
57. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J*. 1995; 6(2): 85-90.
58. Elyassi Y, Moizadeh AT, Kleverlaan CJ. Characterization of Leachates from 6 Root Canal Sealers. *J Endod*. 2019; 45(5): 623-7.
59. 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.
60. Ersahan S, Aydin C. Solubility and apical sealing characteristics of a new calcium silicate-based root canal sealer in comparison to calcium hydroxide-, methacrylate resin- and epoxy resin-based sealers. *Acta Odontol Scand*. 2013;71(3-4):857-62.
61. 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.
62. Jacob VP, Paião LI, da Silva ACG, Magario MKW, Kaneko TY, Martins CM, et al. Antimicrobial action of NeoMTA Plus on mono- and dual-species biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: an in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2020; 120: 104925.
63. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008; 3(7): 1125-31.
64. 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(2): e31-9.

65. Santos JM, Coelho CM, Sequeira DB, Marques JA, Pereira JF, Sousa V, et al. Subcutaneous implantation assessment of new calcium-silicate based sealer for warm obturation. *Biomedicines*. 2021; 9(1): 24.

APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA CORRESPONDENTE ÀS PUBLICAÇÕES 1, 2 E 3

A 1 Avaliação de propriedades físico-químicas

A 1.1 Tempo de presa

Conforme recomendação da norma ISO 6876:2012¹ para materiais que dependem de umidade para tomar presa, foram confeccionados moldes de gesso com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura (n=6). Embora o AH Plus seja um cimento à base de resina epóxi, após realização de testes prévios, constatamos que com a utilização de moldes de gesso foram apresentados valores semelhantes aos obtidos quando utilizou-se anéis metálicos. Deste modo, com o objetivo de padronizar a avaliação do tempo de presa, foi utilizado gesso especial tipo IV – micro-granulado (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) para confecção dos moldes de gesso, os quais permaneceram em água destilada por 24 horas antes do preparo dos corpos de prova dos materiais. Os materiais foram inseridos nos respectivos moldes logo após manipulação, e permaneceram em estufa à 37 °C e 95% de umidade, durante o período de avaliação. O tempo de presa (Figura A 1) foi determinado como o período, em minutos, entre o término da manipulação e o momento em que uma agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm já não produzisse marcas quando apoiada sobre a superfície dos cimentos.

Figura A 1 - Representação do teste de tempo de presa



Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 1.2 Escoamento

A análise do escoamento (Figura A 2) foi realizada com base na norma ISO 6876:2012¹. Com o auxílio de uma seringa de 1 mL, depositou-se $0,05 \pm 0,005$ mL de cada um dos materiais recém manipulados sobre o centro de uma placa de vidro de 40 mm x 40 mm x 5 mm de espessura e 20 g de massa (n=10). Decorridos 180 ± 5 segundos, do início da manipulação dos materiais, outra placa de vidro, com as mesmas dimensões e mesma massa da primeira, foi cuidadosamente posicionada sobre o centro do cimento. Em seguida, um dispositivo metálico de 100 g foi posicionado sobre a segunda placa, totalizando 120 g. Dez minutos após o início da manipulação, o dispositivo metálico foi removido e foram realizadas as mensurações de cada um dos espécimes. Foram utilizadas duas técnicas para a avaliação do escoamento. Na primeira, conforme especificações da norma ISO 6876:2012¹, foi medido o maior e o menor diâmetro produzido pelo cimento, com o auxílio de um paquímetro digital. Quando a diferença observada entre o maior e o menor diâmetro foi menor que 1 mm, o valor médio foi registrado. Na segunda, um método adicional foi realizado no qual os corpos de prova foram fotografados, juntamente a uma régua milimetrada, e as imagens digitalizadas foram analisadas por meio do programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00, para a mensuração da área de escoamento em mm², como descrito por Tanomaru-Filho et al.²

Figura A 2 - Representação do teste de escoamento



Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 1.3 Radiopacidade

A avaliação da radiopacidade dos materiais (Figura A 3) foi realizada com base na ISO 6876:2012¹. A partir de moldes de silicone com diâmetro interno de 10 mm e altura de 1 mm, foram confeccionados corpos de prova (n=6), os quais foram

armazenados em estufa (37 °C e 95% de umidade) por 48 horas. Cada um dos espécimes, juntamente a uma escala de alumínio (milimetrada), foi posicionado sobre um filme radiográfico oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY). Um aparelho de raios-X Focus (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland) operando a 60 kV, 7 mA, 0.32 pulsos por segundo foi utilizado para a tomada radiográfica, que foi realizada a uma distância focal de 33 cm. Na sequência, os filmes foram processados e em seguida foram fotografados com uma câmera semiprofissional (Canon, Tokio, Japão) e uma lente macro de 100 mm, utilizando os seguintes parâmetros: distância lente-objeto de 40 cm, ISO 100, abertura do obturador de 7,1 e velocidade do obturador de 1/100³. As imagens digitalizadas foram analisadas através do programa Image J. Deste modo, para a determinação da radiopacidade dos cimentos em milímetros de alumínio, foram analisadas as áreas de cada um dos degraus da escala milimetrada. Para a conversão dos valores obtidos foi utilizada uma equação de conversão, conforme descrito por Húngaro-Duarte et al⁴:

$$\frac{A \times 2}{B} + \text{mm Al imediatamente anterior a DRM}$$

Onde:

DRM = Densidade radiográfica do material avaliado

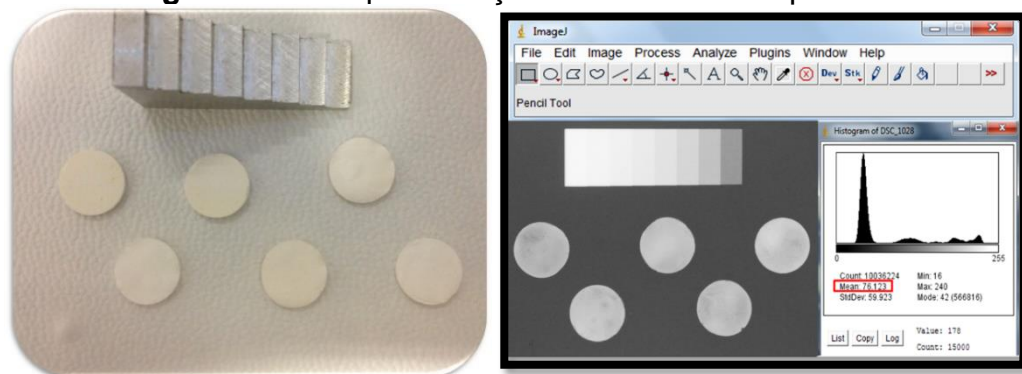
DR = Densidade radiográfica (escala de alumínio)

A = DRM – DR do incremento da escala de Al imediatamente anterior a DRM;

B = DR do incremento da escala de Al imediatamente posterior a DRM - DR do incremento de alumínio imediatamente anterior a DRM;

2 = 2 mm de incremento da escala de Al

Figura A 3 – Representação do teste de radiopacidade

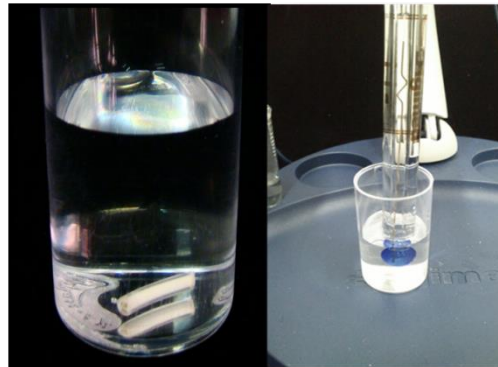


Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 1.4 pH

A análise da capacidade de alcalinização dos cimentos endodônticos foi realizada com base em estudos anteriores^{5,6}. Tubos de polietileno (Embramed, São Paulo, SP, Brasil), com 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro (n=10), foram preenchidos com cada um dos cimentos (Figura A 4). Cada tubo, preenchido por cimento, foi inserido em um frasco de plástico contendo 10 mL de água deionizada. O grupo controle foi composto por frascos de plástico contendo 10 mL de água deionizada. Os conjuntos formados por frasco com água + tubo contendo cimento, bem como o grupo controle, foram armazenados em estufa a 37 °C durante os períodos experimentais de 1, 7, 14 e 21 dias. Após cada período experimental, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco contendo 10 mL de água deionizada. No grupo controle os frascos foram trocados por novos frascos contendo 10 mL de água deionizada, após cada período experimental. O pH das soluções foi mensurado imediatamente após cada período experimental com um pHmetro Digimed (São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado, com o auxílio de soluções tampão com pH de 4.01, 6.86, e 10.01 (Digimed). Foram realizadas três aferições para cada espécime.

Figura A 4 – Representação do ensaio de pH



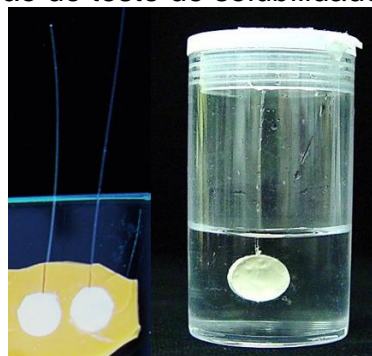
Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 1.5 Solubilidade

A solubilidade (Figura A 5) foi avaliada com base em estudos anteriores^{7,8}. Foram confeccionados moldes de silicone, a partir dos quais foi possível produzir corpos de prova com 7,75 mm de diâmetro interno e 1,5 mm de altura (n=6). Sobre uma placa de vidro coberta com papel celofane, foram acomodados os moldes de silicone, os quais foram preenchidos com cada um dos materiais avaliados. Na sequência, foi inserido

um fio de nylon no interior de cada um dos espécimes. Em seguida, foi colocada, cuidadosamente sobre os moldes, uma outra placa de vidro, também coberta com celofane, realizando uma leve pressão manual. Nos grupos de cimentos hidráulicos, que dependem de umidade para tomar presa, gazes umedecidas (com água destilada) foram acomodadas sobre os moldes, conforme descrito por Tanomaru-Filho *et al.*⁵. Os conjuntos (moldes e cimentos) foram mantidos em estufa à 37 °C e 95% de umidade por um período correspondente a três vezes o tempo de presa. Decorrido este período, os espécimes foram transferidos para um dessecador a vácuo até a estabilização da massa inicial (período de aproximadamente de 7 dias). Obtida a estabilização da massa inicial, os corpos de prova foram então suspensos no interior de frascos plásticos contendo 7,5 mL de água deionizada, por meio da fixação do fio de nylon em suas respectivas tampas, o que permitiu que os espécimes permanecessem imersos, sem que tocassem nenhuma das paredes dos frascos. Os frascos de plástico, contendo água deionizada e os espécimes, foram armazenados em estufa a 37 °C pelos períodos de 30 dias nos estudos realizados para as Publicações 1 e 2, e de 7 e 30 dias no estudo realizado para a Publicação 3. Após os períodos experimentais, os espécimes foram removidos dos recipientes, lavados com água deionizada, secos com papel absorvente e novamente mantidos em desumidificador até a estabilização da massa final. As pesagens foram realizadas a cada 24 horas, três vezes para cada espécime, utilizando balança de precisão (Analítica Adventurer, Modelo AR2140, Ohaus - Indústria de balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A solubilidade, dos cimentos endodônticos, foi determinada pelo percentual de perda de massa de cada espécime¹, tendo sido calculada através da fórmula: $S = (MI - MF) / MI \times 100$, conforme descrito por Lim *et al.*⁹.

Figura A 5 – Representação do teste de solubilidade dos cimentos obturadores



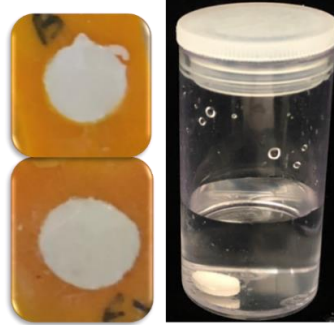
Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 1.6 Alteração volumétrica

O ensaio de alteração volumétrica foi realizado com o objetivo de complementar a avaliação da solubilidade dos cimentos obturadores. Deste modo, assim como no ensaio de solubilidade, foram confeccionados corpos de prova (Figura A 6) com 7,75 mm de diâmetro interno e 1,5 mm de altura ($n=6$), os quais foram armazenados em estufa com temperatura de 37 °C e 95% de umidade por um período correspondente a três vezes o tempo de presa. Após a presa dos materiais, as amostras foram mantidas em dessecador a vácuo por 24 horas e em seguida foram escaneadas. Os escaneamentos (Figura A 7) foram realizados utilizando o microtomógrafo SkyScan 1176 (Bruker Micro-CT, Kontich, Bélgica), e os parâmetros empregados foram: voltagem 80 kv, corrente de 300 μ A, 18 μ m de tamanho de pixels, filtro de cobre e alumínio (Cu + Al) e rotação de 360°. Na sequência, cada espécime foi mantido em um frasco de plástico contendo 7,5 mL de água deionizada (Figura A 6), pelos mesmos períodos experimentais do ensaio de solubilidade, ou seja, de 30 dias nos estudos realizados nas Publicações 1 e 2, e de 7 e 30 dias na Publicação 3. Para que a superfície dos corpos de prova permanecesse em contato com a água pelo mesmo período de tempo em ambos os lados, a posição destes foi alterada na metade de cada período. Após cada período experimental os espécimes foram acondicionados em dessecador à vácuo por 24 horas, e então submetidos a um novo escaneamento. Foi calculado o volume de preenchimento das amostras para cada um dos períodos. Com o auxílio do software NRecon (V1.6.10.4, Bruker-MicroCT), foi realizada a reconstrução das imagens (Figura A 8). Os parâmetros de *smoothing*, *beam hardening*, e *ring artifacts* foram definidos para cada material e utilizados para o mesmo cimento nos diferentes períodos experimentais. Os parâmetros utilizados para o Bio-C Sealer (Publicações 1 e 3) e para o Bio-C Sealer associado ao hipoclorito de cálcio (Publicação 3), foram de 1 para *smoothing*, 2 para *ring artefacts correction*, e 40 para *beam hardening correction*. Para o TotalFill BC Sealer (Publicações 1 e 2), e para o Sealer Plus BC (Publicação 2) os parâmetros utilizados foram: 1 para *smoothing*, 1 para *ring artefacts correction*, e 61 para *beam hardening correction*. O AH Plus (Publicações 1, 2 e 3) foi analisado segundo os seguintes parâmetros: 1 para *smoothing*, 1 para *ring artefacts correction*, e 21 para *beam hardening correction*. Para avaliação do cimento experimental à base de silicatos de cálcio, com e sem associação ao hipoclorito de cálcio (Publicação 3), os parâmetros usados foram: 1 para *smoothing*, 1 para *ring artefacts correction*, e 30 para *beam hardening correction*. As imagens reconstruídas

dos diferentes períodos foram sobrepostas (Figura A 9) utilizando o software Data Viewer (V1.5.2.4, Bruker-MicroCT). Para a realização da análise quantitativa (Figura A 10), foi utilizado o software CTAn (V1.15.4.0, Bruker-MicroCT). Deste modo, foi calculada a alteração volumétrica, em porcentagem, para cada período experimental.

Figura A 6 – Imagem demonstrativa, ilustrando corpos de prova utilizados para avaliação da alteração volumétrica, que foram mantidos em frascos com água destilada pelos períodos de 7 e 30 dias.



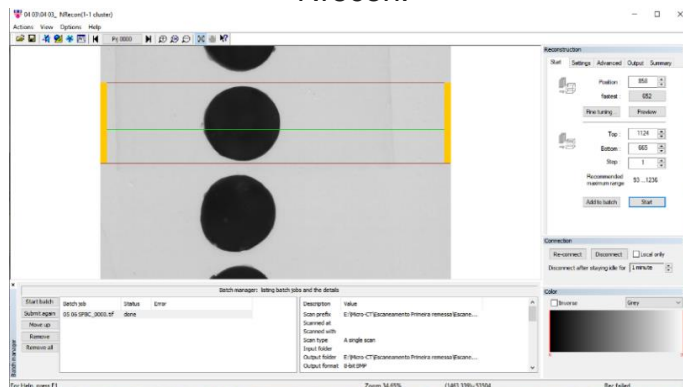
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura A 7 – Imagem demonstrativa, ilustrando corpos de prova dispostos para escaneamento pelo microtomógrafo SkyScan 1176



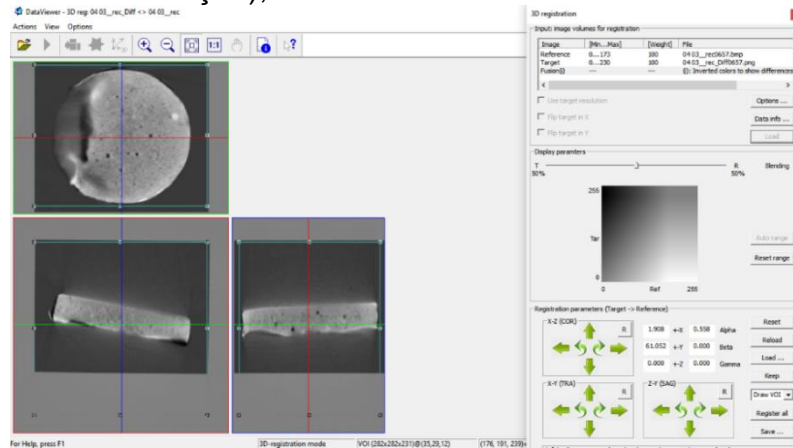
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura A 8 – Imagem demonstrativa, ilustrando a reconstrução, com o programa Nrecon.



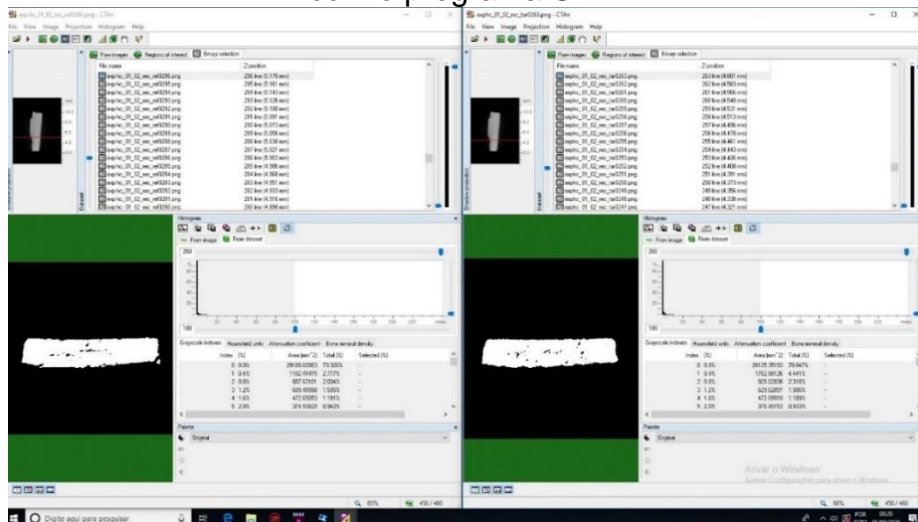
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura A 9 – Imagem demonstrativa da sobreposição das imagens (após reconstrução), utilizando o software Data Viewer



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura A 10 – Imagem demonstrativa da análise de imagem reconstruída, realizada com o programa CTAn



Fonte: Arquivo pessoal do autor

APÊNDICE B – METODOLOGIA DETALHADA EMPREGADA NA PUBLICAÇÃO 2

B 1 Avaliação da atividade antibimicrobiana

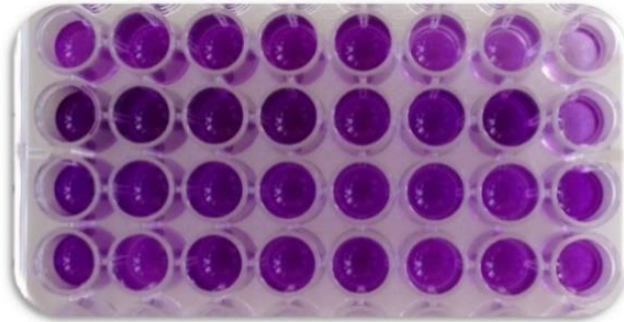
Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Telstar Technologies, S.L.–BV 100, Terrassa, Espanha), utilizando cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Para a reativação dos microrganismos, utilizou-se meio de cultura *Tryptic soy broth* – TSb (Difco Detroit, MI, EUA) para *E. faecalis*; RPMI Medium 1640 (Gibco, NY, EUA) para *C. albicans* e dual-espécies, permanecendo em estufa a 37 °C overnight. A concentração dos inóculos microbianos foi de 1×10^8 UFC mL⁻¹, e o ajuste da densidade ótica (DO) foi realizado em espectrofotômetro (600 Plus, Femto, SP)

B 1.1 Ensaio cristal violeta

O ensaio cristal violeta (Figura B 1) foi realizado para a quantificação da redução de biomassa dos biofilmes mono- e dual-espécies de *E. faecalis* e/ou *C. albicans* (ajustados em 1×10^8 CFU mL⁻¹), após contato com os materiais avaliados. Para a formação dos biofilmes mono- e dual-espécies de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*, 200 µL de alíquotas de suspensão bacteriana padronizada foram distribuídas em cada um dos poços de placas de cultura de 96 poços, sendo uma placa para cada cepa. Após a realização de testes piloto, foram estabelecidos os períodos para formação dos biofilmes. O período para a formação dos biofilmes de *C. albicans* e dual-espécies foi de 48 horas, utilizando RPMI (Difco Detroit, MI, EUA), enquanto que para a formação do biofilme de *E. faecalis* foi de 72 h, utilizando meio TSb ambos suplementados com D-(+)-Glucose. Para a obtenção dos eluídos dos cimentos, cada um deles foi mantido em contato com 2 mL de solução fisiológica, em microtubos, permanecendo em estufa a 37 °C por 48 horas. O sobrenadante foi removido e os eluídos foram filtrados em filtro de 0,20 µm, para evitar que cristais de cimento se precipitassem sobre o corante e eliminar possível contaminação. Decorrido o período de formação do biofilme, foi realizada a lavagem de cada um dos poços por duas vezes com 200 µL de PBS 1x (pH 7,2), e então aplicou-se 200 µL dos eluídos em cada poço (n = 8 por grupo). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Na sequência, os eluídos foram removidos e cada poço foi lavado com água destilada. As placas foram secas à temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, foi adicionado 200 µL de solução cristal violeta a 0,1% (Synth, Diadema, SP, Brazil), em cada um dos poços das placas de

cultura, permanecendo em contato durante 20 minutos, em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido após lavagem com água destilada. Após secagem das placas em temperatura ambiente, o corante ligado às células aderentes foi solubilizado com ácido acético a 33% durante 5 minutos. Para quantificar a biomassa de biofilme remanescente após o tratamento, foi medida a absorbância ($DO=590\text{ nm}$) usando espectrofotômetro UVM 340 (ASYS, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil). Para o controle positivo foi utilizada solução salina estéril. O experimento foi realizado em triplicata em dois momentos diferentes.

Figura B 1 – Imagem representativa de uma placa utilizada no ensaio cristal violeta, após leitura em espectrofotômetro.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

APÊNDICE C – METODOLOGIA DETALHADA CORRESPONDENTE ÀS PUBLICAÇÕES 2 E 3

C 1 Avaliação da atividade antibimicrobiana

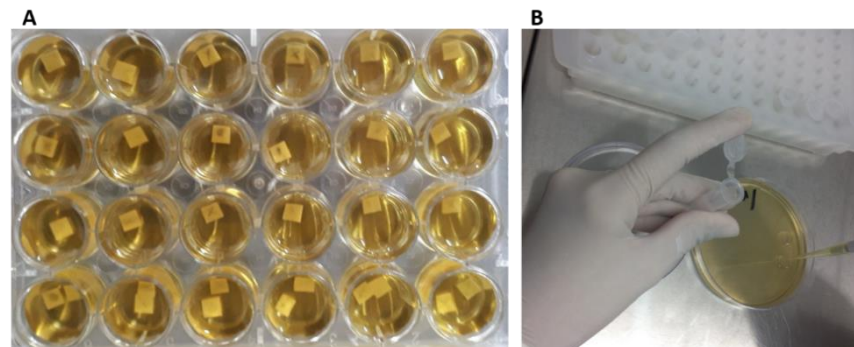
C 1.1 Teste de contato direto modificado

Esta análise (Figura C 1) foi realizada, após aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia de Araraquara (24/2019), conforme ANEXO C. Para a obtenção do substrato para a formação do biofilme, foram utilizados incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas. As raízes foram fixadas em placas de madeira (4,5 cm X 4,5 cm) com o auxílio de cera pegajosa em bastão (Asfer, Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil). O corte das coroas foi realizado com o uso de discos de carborundum, em baixa rotação, com peça reta. Na sequência, as raízes foram seccionadas para a obtenção de blocos de dentina com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura). Todos os cortes foram realizados em uma máquina de corte de precisão (Isomet 1000 – Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). A seleção dos blocos de dentina a serem utilizados foi feita após conferirmos as dimensões dos mesmos com o auxílio de um paquímetro digital. Em seguida, os blocos de dentina foram colocados em um frasco contendo EDTA (5%), o qual foi levado à cuba ultrassônica por 1 minuto. Após enxague, os blocos de dentina bovina foram então inseridos em um tubo de ensaio contendo água destilada, e foram esterilizados a 120 °C por 20 min. Para o grupo no qual foi analisada a atividade antimicrobiana frente ao biofilme de *E. faecalis*, foram dispensados 2 mL de meio TSb puro contendo 1% do inóculo, em cada poço de uma placa de cultura de 24 poços, deixando os blocos de dentina totalmente submersos. Para os grupos nos quais foi avaliada a ação dos materiais frente aos biofilmes de *C. albicans* e dual-espécies utilizou-se 2 mL de meio RPMI Medium 1640 (Gibco, NY, EUA) contendo 1% do inóculo. Na avaliação realizada na Publicação 2, as placas, contendo os blocos de dentina e o inóculo de *E. faecalis*, permaneceram em incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) em ambiente de microaerofilia, a 37 °C, durante 14 dias. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas, sem a adição de novos microrganismos. A atividade antibiofilme dos materiais foi determinada após 15 horas de contato entre os blocos de dentina bovina contendo biofilme e os discos dos cimentos avaliados, conforme estudos anteriores^{10,11}.

Para a confecção dos discos de cimentos, estes foram manipulados e inseridos em moldes de silicone medindo 7 mm de diâmetro x 1 mm de espessura interna, e mantidos em estufa a 37 °C e umidade controlada, durante 48 horas. Transcorrido o período pós-manipulação, os corpos de prova foram removidos da matriz, esterilizados em luz ultravioleta (30 minutos cada lado), e colocados sobre cada um dos blocos de dentina contendo o biofilme formado e lavados previamente em solução salina para remoção de bactérias planctônicas. Os conjuntos formados pelos blocos de dentina e os discos de cimentos (n=6) foram acomodados em Placas de Petri. Para evitar o ressecamento, foi gotejado 20 µL de solução salina estéril sobre cada um dos conjuntos. No grupo controle os biofilmes entraram em contato com discos de teflon, servindo de comparação para os resultados. Na análise desenvolvida para a Publicação 3, foi feita uma modificação na metodologia, e a avaliação da atividade antibiofilme foi realizada após 15 horas de contato entre os blocos de dentina contendo biofilme e os eluídos de cada um dos materiais, na concentração de 25 mg/mL. Nesta análise, as placas contendo os blocos de dentina e os inóculos (*E. faecalis*, *C. albicans* e dual-espécies) permaneceram durante 7 dias em incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) em ambiente de microaerofilia, a 37 °C. O meio de cultura de cada uma das placas foi renovado a cada 48 horas, sem a adição de novos microrganismos. Para a formação dos eluídos dos materiais avaliados, depositou-se 250 mg de cada cimento em tubos Falcon de 15 mL, e adicionou-se 10 mL de água destilada estéril. Os tubos contendo os eluídos foram agitados em vórtex por 1 minuto, e em seguida permaneceram por 30 minutos em câmara de fluxo e luz ultravioleta, e foram colocados em estufa a 37 °C, onde permaneceram por 48 h. Na sequência, cada um dos blocos foi transferido para um microtubo contendo 500 µL de cada eluído filtrado. Foi incluído um grupo controle onde os blocos de dentina contendo biofilme entraram em contato com solução salina, para servir como comparação para os resultados. O tempo de contato entre os blocos de dentina contendo biofilme e os eluídos foi de 15 h, e os microtubos permaneceram em estufa a 37°C. Após o período de contato, em ambas as análises (Publicação 2 e Publicação 3) os blocos de dentina contendo o biofilme remanescente, inclusive o grupo controle, foram individualmente colocados em microtubos contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro, e depois agitados em vórtex (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 minuto, para permitir a suspensão dos microrganismos. Na sequência, foi realizada a diluição decimal seriada

da seguinte maneira: transferiu-se 100 μL da suspensão deste tubo “mãe” para outro microtubo contendo 900 μL de solução salina estéril, e assim por diante, totalizando quatro diluições. Deste modo, foram plaqueadas três alíquotas de 20 μL de cada uma das suspensões, sendo distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura *Tryptic soy agar* (TSa) para os grupos contaminados por *E. faecalis*, *Sabouraud Dextrose agar* (SDa) para os grupos contaminados por *C. albicans*, m-Enterococcus e Das-cloranfenicol para a análise dos biofilmes dual-espécies. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. A leitura dos resultados de cada uma das placas de cultura foi realizada de modo a obter a média do número de UFC mL^{-1} das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição onde apresentou um número de colônias entre 5 e 50 em cada área. A partir destas médias foi calculado o número de UFC mL^{-1} após o período de contato. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica (\log_{10}) e o resultado de cada grupo foi calculado a partir da média dos seus espécimes.

Figura C 1- Imagens representativas do teste de contato direto modificado, demonstrando os blocos de dentina bovina submersos em meio de cultura contendo o inóculo, em uma placa de cultura de 24 poços (A); e plaqueamento de três alíquotas de 20 μL de cada uma das suspensões, em placa de Petri (B).



Fonte: Arquivo pessoal do autor

C 2 Avaliação de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil).

C 2.1 Cultura celular

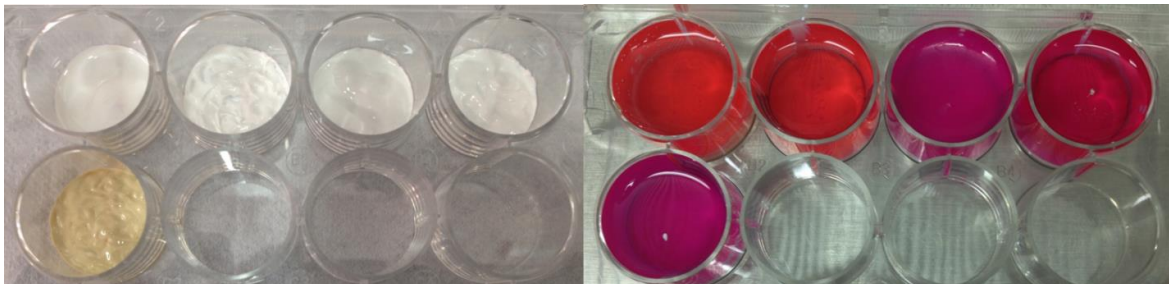
Para o estudo da viabilidade celular foram utilizadas células Saos-2 (ATCC HTB-85), que são células osteoblásticas derivadas de osteossarcoma humano(12). Deste modo, as células Saos-2 foram cultivadas em frascos T-75 (Jet Biofil, Guangdong,

Guangzhou, Luokan, China), contendo meio Dulbecco modificado (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), penicillina (100 IU/mL), e estreptomicina (100 Ig/mL), sendo mantidos à 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂, até a confluência. Na sequência, as células aderentes em fase de crescimento logarítmico foram então detectadas pela mistura de tripsina/ácido etilenodiaminotetracético (0,25%) (Sigma-Aldrich), por 3 minutos à uma temperatura de 37 °C.

C 2.2 Preparo dos extratos

Os cimentos avaliados foram manipulados sobre uma placa de vidro estéril, com exceção daqueles prontos para uso, que foram avaliados sem a adição de hipoclorito de cálcio. No fundo de poços vazios de placas de cultura de 12 poços (314.0 mm² área e 3.0 mm altura) (Jet Biofil) colocou-se 0,5 g de cada um dos materiais. Estas placas foram armazenadas por 24 horas em estufa a 37 °C, 95% de umidade, 5% CO₂ (até a completa presa dos materiais). Em seguida, com o objetivo de prevenir contaminação, as placas contendo os materiais foram expostas a luz UV¹³. Na sequência, para criar o extrato de cada um dos materiais avaliados (ISO 10993-5 2005)¹⁴, 5 mL de meio de cultura DMEM sem soro foi colocado em cada um dos poços contendo os cimentos, e as placas foram mantidas por 24 h em estufa a 37 °C, 95% de umidade, 5% CO₂ (Figura C 2). Após este período foram preparadas as diluições dos extratos dos cimentos (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 na Publicação 2; e 1:5, 1:10 e 1:20 na Publicação 3). O cimento AH Plus foi utilizado como material de referência¹⁴.

Figura C 2 – Imagem demonstrativa do preparo dos extratos utilizados para os ensaios de viabilidade



Fonte: Arquivo pessoal do autor

C 2.3 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular frente aos extratos dos cimentos endodônticos foi realizada por meio dos ensaios vermelho neutro (NR) e 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-brometo de difenil-tetrazólio (MTT). Com o objetivo de obter células aderentes antes da exposição aos materiais, as células Saos-2 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços (Jet Biofil) contendo DMEM suplementado com 10% de SFB, e foram cultivadas por 24 horas a 37 °C, 95% de umidade e 5% CO₂. Na sequência as células foram expostas aos extratos dos cimentos em diferentes diluições, além do controle negativo, meio DMEM sem soro, e controle positivo, DMSO 20%¹⁵.

C 2.3.1 Ensaio vermelho neutro (NR)

Para a realização do ensaio NR (Figura C 3), as células Saos-2 permaneceram por 24 horas em contato com os extratos dos cimentos nas diferentes diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 na Publicação 2; e 1:5, 1:10 e 1:20 na Publicação 3), bem como ao controle negativo (meio DMEM sem soro) e controle positivo (DMSO 20%). Decorrido este período, os extratos foram substituídos por 0.1 mL de meio DMEM incompleto (sem SFB) contendo 50 µg NR/mL (Sigma-Aldrich), seguido de incubação a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂ por 3 horas. Na sequência, procedeu-se a remoção do corante e solubilização do produto colorimétrico com 100 µL de etanol a 50% e solução de ácido acético a 1% (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro UVM 340 (ASYS, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil), a 570 nm. Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3).

Figura C 3 – Imagem representativa de uma placa de cultura de 96 poços após realização de ensaio vermelho neutro.

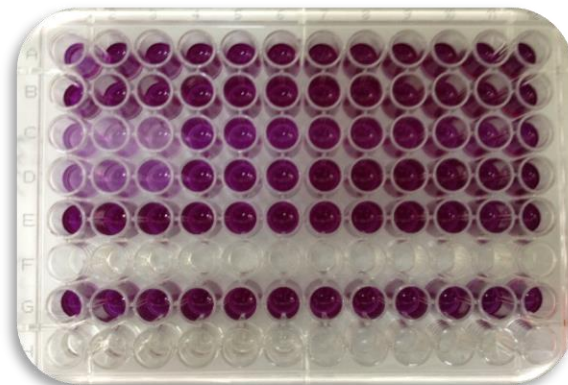


Fonte: Arquivo pessoal do autor

C 2.3.2 Ensaio MTT

O ensaio MTT (Figura C 4) foi realizado simultaneamente ao ensaio NR, e as células Saos-2 foram expostas por 24 horas aos extratos dos cimentos nas diferentes diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 na Publicação 2; e 1:5, 1:10 e 1:20 na Publicação 3), bem como ao controle negativo (meio DMEM sem soro) e controle positivo (DMSO 20%). Uma segunda análise foi realizada para o estudo da Publicação 2, na qual a viabilidade celular (1×10^4 células/mL) foi avaliada pelos períodos de 1, 3 e 7 dias, utilizando extratos dos materiais na diluição de 1:8. Nesta análise os extratos foram renovados a cada 2 dias. Imediatamente após cada período experimental, o meio foi trocado por 100 μ L de DMEM contendo solução de MTT 5 mg/mL (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas durante 3 horas, a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Em seguida, cada um dos poços foi lavado com PBS 1X (tampão fosfato) e adicionou-se 100 μ L de isopropanol acidificado 0,04 N (Sigma-Aldrich) para solubilizar o formazan. Um espectrofotômetro UVM 340 (ASYS, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil), foi utilizado para mensurar a densidade óptica (570 nm). Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3).

Figura C 4 – Imagem representativa de uma placa de cultura de 96 poços após realização de ensaio MTT



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Análise dos resultados

Para todos os subprojetos, os resultados obtidos foram submetidos a teste de normalidade, e posteriormente submetidos aos testes estatísticos adequados (ANOVA/Tukey, ANOVA/Bonferroni, Kruskal-Wallis/Dunn), com 5% de significância.

Referências do Apêndice

1. International Organization for Standardization Dentistry (ISO). ISO 6876: root canal sealing materials. London: British Standards Institution; 2012.
2. Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Tanomaru JM, Bier CA. Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Aust Endod J.* 2007; 33(1): 23-6.
3. Ochoa-Rodríguez VM, Wilches-Visbal JH, Roma B, Coaguila-Llerena H, Tanomaru-Filho M, Gonçalves A, et al. Radiopacity of endodontic materials using two models for conversion to millimeters of aluminum. *Braz Oral Res.* 2020; 34: e080.
4. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivian RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35(5): 737-40.
5. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, de Almeida M, Navarro LG, Steier L, et al. Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive lass and calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017; 43(12): 2097-101.
6. Mendes AT, da Silva PB, Só BB, Hashizume LN, Vivian RR, da Rosa RA, et al. Evaluation of physicochemical properties of new calcium silicate-based sealer. *Braz Dent J.* 2018; 29(6): 536-40.
7. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod.* 2007; 33(9): 1110-6.
8. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, Espir CG, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Solubility, porosity, dimensional and volumetric change of endodontic sealers. *Braz Dent J.* 2019; 30(4): 368-73.
9. Lim ES, Park YB, Kwon YS, Shon WJ, Lee KW, Min KS. Physical properties and biocompatibility of an injectable calcium-silicate-based root canal sealer: in vitro and in vivo study. *BMC Oral Health.* 2015; 15(1): 129.
10. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J.* 2019; 52(7): 979-86.
11. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 755-62.
12. Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Cytotoxicity and bioactivity of calcium silicate cements combined with niobium oxide in different cell lines. *Braz Dent J.* 2017; 28(1): 65-71.

13. Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V, Chitnis DS. Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian J Med Microbiol.* 2008; 26(3): 241-2.
14. International Organization for Standardization. ISO 10993-5 : biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO; 2005.
15. Margunato S, Taşlı PN, Aydın S, Karapınar Kazandağ M, Şahin F. In Vitro Evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on human alveolar bone marrow stem cells in terms of biocompatibility and mineralization. *J Endod.* 2015; 41(10): 1646-52.

ANEXO A – POLÍTICAS DE COPYRIGHT E DE AUTOARQUIVO DE EDITORES EM SHERPA/ROMEO: JOURNAL OF ENDODONTICS

Jisc Digital Resources > Open Access

Sherpa Romeo

About Search Statistics Help Support Us Contact Admin

Journal of Endodontics

Publication Information

Title	Journal of Endodontics [English]
ISSNs	Print: 0099-2399
URL	http://www.journals.elsevier.com/journal-of-endodontics/
Publishers	Elsevier [Commercial Publisher] American Association of Endodontists [Associate Organisation]

Publisher Policy

Open Access pathways permitted by this journal's policy are listed below by article version. Click on a pathway for a more detailed view.

Published Version [pathway a]	None CC BY-NC-ND	PMC, Non-Commercial Repository, Research for Development Repository, +2 +
Published Version [pathway b]	None CC BY	Institutional Repository, Subject Repository, PMC, Research for Development Repository, +2 -
OA Fee	This pathway has an Open Access fee associated with it	
OA Publishing	This pathway includes Open Access publishing	
Embargo	No Embargo	
Licence	CC BY	
Location	Institutional Repository Named Repository (PubMed Central, Research for Development Repository, ESRC Research Catalogue) Subject Repository Journal Website	
Conditions	Published source must be acknowledged with citation	



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)

This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the license. [Exoneração de Responsabilidade.](#)

Você tem o direito de:

Compartilhar — copiar e redistribuir o material em qualquer suporte ou formato

O licenciante não pode revogar estes direitos desde que você respeite os termos da licença.

De acordo com os termos seguintes:



Atribuição — Você deve atribuir o [devido crédito](#), fornecer um link para a licença, e [indicar se foram feitas alterações](#). Você pode fazê-lo de qualquer forma razoável, mas não de uma forma que sugira que o licenciante o apoia ou aprova o seu uso.



NãoComercial — Você não pode usar o material para [fins comerciais](#).



SemDerivações — Se você [remixar, transformar, ou criar a partir do material](#), não pode distribuir o material modificado.

Sem restrições adicionais — Você não pode aplicar termos jurídicos ou [medidas de caráter tecnológico](#) que restrinjam legalmente outros de fazerem algo que a licença permita.

Avisos:

Não tem de cumprir com os termos da licença relativamente a elementos do material que estejam no domínio público ou cuja utilização seja permitida por uma [exceção ou limitação](#) que seja aplicável.

Não são dadas quaisquer garantias. A licença pode não lhe dar todas as autorizações necessárias para o uso pretendido. Por exemplo, outros direitos, tais como [direitos de imagem, de privacidade ou direitos morais](#), podem limitar o uso do material.

ANEXO B – POLÍTICAS DE COPYRIGHT E DE AUTOARQUIVO DE EDITORES EM BRAZILIAN DENTAL JOURNAL



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

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

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

Escopo e política

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

ENDEREÇO ELETRÔNICO PARA SUBMISSÃO:
<http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>

SERÃO CONSIDERADOS APENAS TRABALHOS REDIGIDOS EM INGLÊS. Autores cuja língua nativa não seja o Inglês, devem ter seus manuscritos revisados por profissionais proficientes na Língua Inglesa. **Os trabalhos aceitos para publicação serão submetidos à Revisão Técnica, que compreende revisão lingüística, revisão das normas técnicas e adequação ao padrão de publicação do periódico. O custo da Revisão Técnica será repassado aos autores. A submissão de um manuscrito ao BDJ implica na aceitação prévia desta condição.** A decisão de aceitação para publicação é de responsabilidade dos Editores e baseia-se nas recomendações do corpo editorial e/ou revisores "ad hoc". Os manuscritos que não forem considerados aptos para publicação receberão um e-mail justificando a decisão. Os conceitos emitidos nos trabalhos publicados no BDJ são de responsabilidade exclusiva dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do corpo editorial.

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

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

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

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

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

ANEXO C – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Número do protocolo: 24/2019.

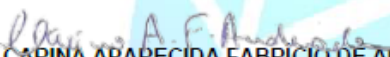
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia
Campus de Araraquara****Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA****CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº 24/2019 referente à pesquisa “ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE CIMENTO EXPERIMENTAL E DE NOVO CIMENTO ENDODÔNTICO HIDRÁULICO ASSOCIADOS AO HIPOCLORITO DE CÁLCIO” sob a responsabilidade da Profª Drª Juliane Maria Guerreiro Tanomaru está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pela legislação brasileira atualmente em vigor, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

CERTIFICATE

We certify that the protocol 24/2019 referring to the research “ANTIBIOFILM ACTIVITY OF EXPERIMENTAL SEALER AND NEWHYDRAULIC ENDODONTIC SEALER ASSOCIATED WITH CALCIUM HYPOCHLORITE” under responsibility of Profª Drª Juliane Maria Guerreiro Tanomaru in agreement with the nowadays specific Brazilian laws and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEUA).

Araraquara, 24 de junho de 2021.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA/FOAr/UNESP

Não autorizo a publicação deste trabalho até 13 de setembro de 2023

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 13 de setembro de 2021.

Cristiane Lopes Zordan Bronzel