



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



Cristiane Lopes Zordan Bronzel

Desenvolvimento e avaliação de cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Cristiane Lopes Zordan Bronzel

Desenvolvimento e avaliação de cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Endodontia.

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

Araraquara

2018

Bronzel, Cristiane Lopes Zordan

Desenvolvimento e avaliação de cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio / Cristiane Lopes Zordan Bronzel. – Araraquara: [s.n.], 2018

76 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Materiais biocompatíveis 2. Endodontia 3. Enterococcus faecalis

I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Maria Inês Carlos, CRB-8/7200
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Cristiane Lopes Zordan Bronzel

Desenvolvimento e avaliação de cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Endodontia

Presidente e orientador: Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2ºExaminador: Evandro Watanabe

3ºExaminador: Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 23 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Cristiane Lopes Zordan Bronzel

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

FILIAÇÃO: Leonilda Aparecida Lopes (*In memorian*)

Antônio Hélio Zordan

2000 – 2004: 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, Araraquara, SP.

2015-2017: Especialização em Endodontia

Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas, Araraquara, SP.

2016-2018: Mestrado em Odontologia – Área de Endodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp, Araraquara, SP.

Dedico este trabalho à minha querida mãe, **Leonilda**, responsável por eu ter me tornado quem sou. Pelo exemplo seu de vida, força e dignidade que sua vida se traduz. Por todo amor, doçura, pela educação que me deu, sempre se esforçando para me ensinar a ser forte, correta, e nunca desistir dos meus sonhos. Por sempre ter estado a meu lado, me apoiando, em todos os momentos importantes, bons e ruins, e por ter me ensinado a valorizar cada vitória. E tenho a plena certeza de que está sempre presente em cada momento de felicidade e conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido e amado esposo, **João**, meu melhor amigo e companheiro de todas as horas, que me incentivou a fazer mestrado, e está sempre presente me ajudando e me apoiando em todos os momentos.

À toda minha família, em especial aos meus irmãos **Marcelo** e **Marcos**, que são meu porto seguro, me ajudaram a ser quem sou e sempre estiveram presentes em minha vida e me apoiaram nas mais diversas situações da vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pela confiança depositada em mim, pela sua amizade e convivência harmoniosa, por todo o ensinamento compartilhado ao longo desse tempo e por me incentivar a continuar.

Ao Prof. Dr. **Mário Tanomaru Filho** por todo o apoio, incentivo, ensinamentos compartilhados, paciência, amizade, e por toda confiança depositada em mim.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araraquara**, na figura da diretora, Prof.^a Dr.^a **Elaine Maria Sgavioli Massucato**, e do vice-diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos**, pela infraestrutura necessária para a execução deste trabalho.

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

Aos Professores do programa da Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração: Endodontia, Prof.^a Dr.^a **Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, Prof. Dr. **Mário Tanomaru Filho**, Prof. Dr. **Idomeo Bonetti Filho**, Prof. Dr. **Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, Prof.^a Dr.^a **Gisele Faria**, Prof. Dr. **Renato de Toledo Leonardo**, pelos ensinamentos compartilhados e por estarem sempre com dispostos a ajudar e a esclarecer dúvidas.

À minha banca de qualificação de Mestrado, Prof.^a Dr.^a **Morgana Rodrigues Guimarães Stabili** e Prof. Dr. **Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, pela análise criteriosa e importantes sugestões atribuídas a este trabalho.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro na forma de concessão de bolsa de Mestrado.

Aos funcionários da **Seção da Pós-Graduação**, **José Alexandre e Cristiano**, que foram sempre muito prestativos e dispostos a ajudar.

A todos os funcionários da FOAr, especialmente o **Marinho**, por sua simpatia e disposição em ajudar sempre.

Aos meus queridos amigos da Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, **Mariana Mena Barreto Pivoto João, Roberta Bosso-Martelo, Gisselle Moraima Chávez Andrade, Elisandra Márcia Rodrigues, Kennia Scapin Viola, Lauriê Garcia Belizário, Gabriela Mariana Castro Nuñez, Camila Galletti Espir Passador, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Fernanda Ferrari Esteves Torres, Raqueli Viapiana, Tiago Silva da Fonseca, Maria Luiza Gioster Ramos** por todo apoio, amizade, incentivo, por compartilharem seus conhecimentos e por toda a ajuda nos mais diversos momentos.

À minha turma de mestrado no programa da Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, **Ariel Zogbi Barbosa Mançanares, Eric Hernán Coaguila Llerena, Giovanna Righetti Bravo, Jader Camilo Pinto, Lucas David Galvani, Luciana Guilherme Navarro, Marcela Borsatto Queiroz, Mateus Machado Delfino, Patrícia Conde Vital, Rafaela Nanami Handa Inada, Victor Manuel Ochoa Rodriguez**, por toda amizade criada ao longo desse tempo, pela troca de experiências e pelo apoio compartilhado nos momentos mais difíceis.

E também a todos aqueles que de forma direta ou indireta fizeram parte desta história e contribuíram para o desenvolvimento não apenas deste trabalho, mas também pelo meu desenvolvimento.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

Bronzel CLZ. Desenvolvimento e avaliação de cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Novos cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio são propostos na busca de materiais com potencial bioativo. **Publicação 1:** Desenvolvimento e avaliação físico-química de dois cimentos endodônticos experimentais compostos por silicato tricálcico, silicato dicálcico, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio e tungstato de cálcio; manipulados com polietilenoglicol - Experimental 1 (EXP1) ou com polietilenoglicol e hidrogel de quitosana - Experimental 2 (EXP2). TotalFill BC sealer (TF) e AH Plus (AHP) foram usados para comparação. Tempo de presa, escoamento e radiopacidade foram avaliados com base nas normas ISO 6876. Avaliou-se pH por um pHmetro digital, nos períodos de 3 e 12 horas, 1, 7, 14 e 21 dias. Avaliou-se solubilidade pela perda de massa após imersão em água destilada por 7 e 30 dias. Os dados obtidos foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). EXP2 e EXP1 apresentaram maior tempo de presa ($P<0,05$). Radiopacidade e escoamento de EXP1 e EXP2 atendem às normas da ISO 6876. EXP1 apresentou radiopacidade semelhante à TF ($P>0,05$) e maior que EXP2 ($P<0,05$). EXP1 apresentou escoamento semelhante à AHP ($P>0,05$) e maior que EXP2 ($P<0,05$). EXP1 e EXP2 apresentaram maior solubilidade após 7 dias ($P<0,05$). Após 30 dias de imersão, solubilidade de EXP1 foi semelhante à TF ($P>0,05$). EXP1, EXP2 e TF apresentaram pH alcalino em todos os períodos experimentais. Conclui-se que EXP1 apresenta tempo de presa, radiopacidade, escoamento, solubilidade e pH adequados, e potencial para utilização como cimento endodôntico. **Publicação 2:** Avaliação das propriedades biológicas e antimicrobianas do cimento Experimental (EXP1), que apresentou melhores resultados em avaliação de propriedades físico-químicas, agora denominado EXP. AHP e TF foram usados para comparação. Citocompatibilidade foi avaliada pelos ensaios de metil tetrazólio (MTT) e vermelho neutro (NR), após exposição de Saos-2 aos extratos dos cimentos por 24 h. Bioatividade celular foi analisada pela atividade de fosfatase alcalina (ALP). Ensaio coloração vermelho de alizarina (ARS) foi realizado para avaliação do potencial de mineralização. Atividade antimicrobiana foi avaliada por testes de contato direto sobre células planctônicas (TCDCP) e de contato direto modificado (TCDM). Dados obtidos em MTT, NR e ALP foram analisados por Two Way ANOVA e Bonferroni, os obtidos por ARS pelos testes ANOVA e Tukey, e os microbiológicos pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$). EXP, TF e AHP não apresentaram citotoxicidade para Saos-2 nos ensaios MTT e NR, e foram similares ao controle negativo ($P>0,05$). Maior ALP foi observada após sete dias de exposição de Saos-2 ao extrato de AHP e EXP. Maior formação de nódulos de mineralização ocorreu para TF e EXP ($P<0,05$). EXP e TF, no TCDCP, reduziram mais UFC de *Enterococcus faecalis* em comparação a AHP e controle ($P<0,05$), e eliminaram *Candida albicans*. No TCDM, EXP e TF apresentaram maior redução de UFC de *E. faecalis* em comparação a AHP e controle ($P<0,05$). Conclui-se que EXP apresenta biocompatibilidade, bioatividade celular, induz a formação de nódulos de mineralização e apresenta atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. EXP apresenta potencial para uso clínico em endodontia.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Endodontia. *Enterococcus faecalis*.

Bronzel CLZ. Development and evaluation of calcium silicate-based endodontic sealers [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

New calcium silicate-based endodontic cements are proposed in the search for materials with bioactive potential. **Publication 1:** Development and physical-chemical evaluation of two experimental endodontic cements composed of tricalcium silicate, dicalcium silicate, monobasic calcium phosphate, calcium hydroxide, zirconium oxide and calcium tungstate; handled with polyethylene glycol - Experimental 1 (EXP1) or with polyethylene glycol and chitosan hydrogel - Experimental 2 (EXP2). TotalFill BC sealer (TF) and AH Plus (AHP) were used for comparison. Setting time, flow and radiopacity were evaluated based on ISO 6876. pH was evaluated with a digital pH meter, in the periods 3 and 12 hours, 1, 7, 14 and 21 days. Solubility was evaluated by mass loss after immersion in distilled water for 7 and 30 days. Data were submitted to ANOVA and Tukey tests ($\alpha=0.05$). EXP2 and EXP1 presented higher setting time ($P<0.05$). Radiopacity and flow of EXP 1 and EXP2 meet ISO 6876 standards. EXP1 presented radiopacity similar to TF ($P>0.05$) and higher than EXP2 ($P<0.05$). EXP1 presented similar flow to AHP ($P>0.05$) and higher than EXP2 ($P<0.05$). EXP1 and EXP2 presented higher solubility after 7 days ($P<0.05$). After 30 days of immersion, solubility of EXP1 was similar to TF ($P>0.05$). EXP1, EXP2 and TF presented alkaline pH in all experimental periods. It is concluded that EXP1 presents proper setting time, radiopacity, flow, solubility and pH, and it has potential for use as endodontic cement. **Publication 2:** Evaluation of the biological and antimicrobial properties of Experimental cement (EXP1) that presented better results in the evaluation of physicochemical properties, and now denominated EXP. AHP and TF were used for comparison. Cytocompatibility was evaluated by the methyl tetrazolium (MTT) and neutral red (NR) assays, after exposure of SAOS-2 to the extracts of the cements for 24 h. Cell bioactivity was analyzed by alkaline phosphatase activity (ALP). Red alizarin staining test (ARS) was performed to evaluate the mineralization potential. Antimicrobial activity was evaluated by modified direct contact tests (TCDM) and direct contact with planktonic cells (TCDGP). Data obtained in MTT, NR and ALP were analyzed by Two Way ANOVA and Bonferroni, and those obtained by ARS by the ANOVA and Tukey tests, and the microbiological ones by the Kruskal-Wallis and Dunn tests ($\alpha=0.05$). EXP, TF and AHP showed no cytotoxicity for Saos-2 in the MTT and NR assays, and were similar to the negative control ($P>0.05$). Higher ALP was observed after seven days of exposure of Saos-2 to the extract of AHP and EXP. Greater formation of mineralization nodules occurred for TF and EXP ($P<0.05$). EXP and TF, in the TCDGP, reduced more CFU of *Enterococcus faecalis* compared to AHP and control ($P<0.05$), and eliminated *Candida albicans*. In the TCDM, EXP and TF showed greater reduction of CFU of *E. faecalis* compared to AHP and control ($P<0.05$). It is concluded that EXP presents biocompatibility, cellular bioactivity, induces the formation of mineralization nodules and presents antimicrobial activity on *E. faecalis* and *C. albicans*. EXP has potential for clinical use in endodontics.

Keywords: Biocompatible materials. Endodontics. *Enterococcus faecalis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	17
3 PUBLICAÇÕES	18
3.1 Publicação 1	18
3.2 Publicação 2	32
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
 APÊNDICE A - METODOLOGIA EXPANDIDA CORRESPONDENTE À PUBLICAÇÃO 1.....	 63
 APÊNDICE B - METODOLOGIA EXPANDIDA CORRESPONDENTE À PUBLICAÇÃO 2.....	 68
 ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	 76

1 INTRODUÇÃO

Os cimentos à base de silicatos de cálcio foram introduzidos na odontologia como materiais reparadores (MTA)¹, sendo atualmente empregados também como materiais obturadores de canais radiculares^{2, 3}. As principais vantagens dos materiais de silicato de cálcio em endodontia decorrem de suas propriedades físico-químicas e biológicas².

O MTA apresenta na sua composição 80% de cimento Portland e 20% de óxido de bismuto como agente radiopacificador⁴. Cimento Portland é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico e aluminato tricálcico⁵. O silicato tricálcico puro, principal componente do Cimento Portland, é utilizado no desenvolvimento de biomateriais reparadores e cimentos endodônticos⁴, com a vantagem de não apresentar metais pesados que podem estar presentes no cimento Portland⁶. O silicato tricálcico, demonstra bioatividade⁷ e capacidade de promover formação de hidroxiapatita^{8, 9}. O silicato dicálcico, também presente no MTA, apresenta biocompatibilidade, bioatividade, e também é usado na composição de cimentos endodônticos¹⁰.

As excelentes propriedades físico-químicas e biológicas dos silicatos de cálcio levam ao desenvolvimento de cimentos endodônticos para obturação de canais radiculares¹¹. Como exemplos destes materiais, o Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc, New York, USA), o iRoot SP (Inovate BioCeramix, Inc., Vancouver, Canadá), o Sealer Plus BC – Cimento Biocerâmico (MK Life, Porto Alegre, RS, Brasil), além dos cimentos EndoSequence BC Sealer (Brasseler USA, Savannah, GA) e o TotalFill BC Sealer (FKG, La Chaux-de-Fonds, Switzerland; Brasseler, Savannah, Georgia, USA). Deste modo, estes materiais servem de base para o desenvolvimento de novos materiais de silicato de cálcio.

Os cimentos à base de silicatos de cálcio podem apresentar dificuldade de manipulação e escoamento¹². Assim, diferentes veículos são utilizados no desenvolvimento de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio. De acordo com o fabricante, o veículo do Neo MTA Plus é um gel que contém agente espessante e polímeros solúveis em água. O Sealer Plus BC apresenta como veículo o propilenoglicol. O polietilenoglicol é amplamente utilizado como veículo em pastas de hidróxido de cálcio, utilizadas como medicação intracanal¹³. Até o

momento, não existem estudos utilizando polietilenoglicol como veículo de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio.

A quitosana tem merecido atenção, por apresentar ação antibacteriana, citocompatibilidade, e a capacidade de se ligar a fatores de crescimento microbiano¹⁴. A incorporação de quitosana em cimentos endodônticos pode promover a inibição da penetração e a colonização bacteriana na interface cimento-dentina após o tratamento endodôntico¹⁵. Esta propriedade da quitosana pode dificultar a persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares, em áreas inacessíveis como no interior dos túbulos dentinários, favorecendo o sucesso do tratamento endodôntico¹⁶.

Enterococcus faecalis estão frequentemente associadas aos casos de fracasso do tratamento endodôntico e lesões periapicais persistentes^{17, 18}. Estes microrganismos são resistentes¹⁹, apresentam a capacidade de invadir os túbulos dentinários, mantendo-se viáveis no interior dos mesmos, além de aderir ao colágeno²⁰ e se organizarem em biofilme aderido à dentina²¹. Deste modo, este é o microrganismo mais comumente utilizado em estudos in vitro para avaliar a eficácia antimicrobiana de cimentos endodônticos²².

Candida albicans são fungos encontrados em infecções endodônticas, que apresentam capacidade de penetração na dentina e túbulos dentinários²³. Estes microrganismos apresentam resistência à antibióticos e soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico, estando também relacionados aos casos de insucesso do tratamento endodôntico²⁴.

Os microrganismos acima citados podem permanecer em áreas inacessíveis do sistema de canais radiculares, mesmo após a irrigação, instrumentação e utilização de medicação intracanal. Portanto, o uso de um cimento endodôntico com atividade antimicrobiana pode auxiliar no combate à infecção endodôntica residual^{25, 26}, associada aos casos de fracasso na terapia endodôntica¹⁶.

Alguns materiais à base de silicatos de cálcio como o MTA e o MTA Plus²⁷ apresentam em sua composição óxido de bismuto como agente radiopacificador. No entanto, há evidências de que este agente radiopacificador inibe a proliferação celular⁽²⁸⁾, diminui a estabilidade mecânica²⁹ e aumenta a porosidade do cimento³⁰, além de causar manchamento dental²⁷. O óxido de bismuto é substituído por óxido de tântalo no Neo MTA Plus, promovendo radiopacidade satisfatória, não interferindo no processo de hidratação, além de não causar descoloração dental²⁷. O

tungstato de cálcio proporciona radiopacidade adequada³¹. O óxido de zircônio e o tungstato de cálcio são os agentes radiopacificadores do AH Plus, que apresenta radiopacidade satisfatória^{2, 32, 33}. Alguns cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio, como o Endosequence BC sealer² e o TotalFill BC sealer, apresentam o agente radiopacificador óxido de zircônio, e adequada radiopacidade³².

O BC Sealer, que é um material hidrofílico, demonstrou capacidade seladora maior que dos sistemas de obturação guta-percha e cimentos hidrofóbicos³⁴, e pode promover maior resistência à fratura³⁵⁻³⁷. O BC Sealer apresenta maior citocompatibilidade e bioatividade celular em relação aos cimentos AH Plus e MTA Fillapex³⁸. Suas propriedades físico-químicas atendem as especificações ISO 6876/2001³⁹, é biocompatível^{11, 40}, promove formação de fase fosfato de cálcio quando em contato com solução fisiológica⁴¹, proporciona pH alcalino e liberação íons cálcio², além de apresentar ação antimicrobiana sobre *E. faecalis* que continua mesmo após a presa do material²⁶.

As propriedades físico-químicas dos cimentos obturadores podem ser caracterizadas por meio de testes como tempo de presa, escoamento e solubilidade⁴². Outra propriedade importante é a radiopacidade, que permite a observação do cimento endodôntico em relação às estruturas anatômicas^{43, 44}. A citotoxicidade de novos cimentos endodônticos deve ser avaliada⁴⁵, uma vez que seu efeito tóxico sobre os tecidos periapicais pode interferir no sucesso do tratamento endodôntico^{40, 46}. A atividade antimicrobiana de um cimento endodôntico é uma propriedade importante podendo favorecer a eliminação de microrganismos residuais após obturação dos canais radiculares¹⁹.

Os materiais à base de silicatos de cálcio, devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas, apresentam papel importante como material reparador e obturador dos canais radiculares, substituindo muitos materiais utilizados em diversas aplicações clínicas¹². Estes materiais apresentam ainda ação alcalinizante⁴⁷ e contínua difusão de hidróxido de cálcio, que contribuem para sua ação antimicrobiana por longos períodos²⁶.

Diante do exposto, este estudo visa o desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas, biológicas e antimicrobianas de cimentos endodônticos experimentais compostos por silicato tricálcico, silicato dicálcico, hidróxido de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, óxido de zircônio e tungstato de cálcio. Serão avaliados como agentes espessantes, o polietilenoglicol, e associação de hidrogel de

quitosana e polietilenoglicol, com o intuito de obter um cimento endodôntico com aplicabilidade clínica.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de cimentos experimentais à base de silicatos de cálcio, assim como a avaliação de suas propriedades físico-químicas. Ainda, foram avaliadas as propriedades biológicas e antimicrobianas do cimento experimental com melhores resultados nos testes físico-químicos.

Publicação 1

Desenvolvimento e avaliação de dois cimentos experimentais à base de silicatos de cálcio, e avaliação de suas propriedades físico-químicas por meio de:

1. Tempo de presa
2. Radiopacidade
3. Solubilidade
4. Escoamento
5. pH

Publicação 2

Avaliação das propriedades biológicas e antimicrobianas do cimento experimental que apresentou melhores resultados na publicação 1, por meio de:

1. Ensaio MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5- brometo de difenil-tetrazólio)
2. Ensaio Vermelho Neutro
3. Atividade de fosfatase alcalina
4. Coloração vermelho de alizarina
5. Teste de contato direto modificado: atividade antibiofilme
6. Teste de contato direto sobre células planctônicas

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1*

Desenvolvimento e avaliação físico-química de cimento endodôntico experimental à base de silicatos de cálcio

Resumo

Objetivo: Avaliar propriedades físico-químicas de cimentos experimentais compostos por silicato tricálcico, silicato dicálcico, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio e tungstato de cálcio, manipulados com polietilenoglicol (Experimental 1 - EXP1) ou polietilenoglicol e hidrogel de quitosana (Experimental 2 - EXP2). AH Plus (AHP) e TotalFill BC sealer (TF) foram utilizados para comparação.

Metodologia: Tempo de presa, escoamento e radiopacidade foram avaliados com base nas normas da ISO 6876. O pH foi avaliado por meio de pHmetro digital, nos períodos de 3 e 12 horas, 1, 7, 14 e 21 dias. Solubilidade foi avaliada pela perda de massa após imersão em água por 7 e 30 dias. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com significância de 5%.

Resultados: EXP2 e EXP1 apresentaram os maiores tempos de presa e radiopacidade, e escoamento de acordo com ISO 6876. EXP1 apresentou radiopacidade maior que de EXP2 ($P < 0.05$), e semelhante à de TF ($P > 0.05$). EXP2 apresentou solubilidade maior que EXP1, e ambos apresentaram solubilidade maior que AHP e TF ($P < 0.05$), após 7 de imersão. Após 30 dias de imersão, solubilidade de EXP1 foi semelhante ao TF ($P > 0.05$). Escoamento (mm e mm²) de EXP1 foi semelhante ao de AHP ($P > 0.05$), e maior que de EXP2 ($P < 0.05$). Em todos os períodos experimentais EXP1, EXP2 e TF apresentaram pH alcalino.

Conclusões: EXP1 apresenta tempo de presa, radiopacidade, escoamento, solubilidade e pH adequados, com potencial para aplicação clínica.

Palavras-chave: biomateriais, endodontia, silicato tricálcico.

*Artigo nas normas do periódico *International Endodontic Journal*, ao qual será submetido.

Introdução

Introduzidos na odontologia como materiais reparadores (Parirokh *et al.* 2018), os cimentos à base de silicatos de cálcio são também utilizados para obturação dos canais radiculares (Candeiro *et al.* 2012, Zhou *et al.* 2015). Como exemplos, Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc.), Endosequence BC Sealer (Brasseler USA, Savannah, GA) e TotalFill BC Sealer (FKG, La Chaux-de-Fonds, Switzerland; Brasseler, Savannah, Georgia, USA) são cimentos à base de silicatos de cálcio para obturação dos canais radiculares.

Neo MTA Plus é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, sulfato de cálcio, sílica e óxido de tântalo. É um cimento biocompatível, que induz atividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização (Tanomaru-Filho *et al.* 2017 a), e não causa descoloração dental (Camilleri 2015).

Endosequence BC Sealer e TotalFil BC Sealer são cimentos biocerâmicos, pré-misturados, prontos para uso e apresentam composição semelhante. O BC Sealer é composto por óxido de zircônio, silicatos de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio e agentes espessantes (Hess *et al.* 2011). Apresenta citocompatibilidade (Rodríguez-Lozano *et al.* 2017), pH alcalino, liberação de íons cálcio, e propriedades físico-químicas que atendem as recomendações da ISO 6876, como radiopacidade, escoamento (Candeiro *et al.* 2012) e solubilidade (Zhou *et al.* 2013). A partir da composição destes cimentos comerciais, novos materiais obturadores podem ser desenvolvidos com silicatos de cálcio, radiopacificadores e veículos.

O AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany) é um cimento à base de resina epóxi, considerado padrão-ouro em relação às suas propriedades físico-químicas (Almeida *et al.* 2017). Apresenta escoamento, radiopacidade, tempo de presa adequados, além de estabilidade dimensional e baixa solubilidade (Garrido *et al.* 2010).

O óxido de zircônio proporciona adequada radiopacidade aos cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio Endosequence BC Sealer (Candeiro *et al.* 2012) e TotalFill BC Sealer (Tanomaru-Filho *et al.* 2017 b). O tungstato de cálcio, quando associado ao cimento à base de silicato de cálcio, proporciona radiopacidade satisfatória (Bosso-Martelo *et al.* 2016). O AH Plus apresenta radiopacidade adequada por meio da associação de óxido de zircônio e tungstato de

cálcio em sua composição (Candeiro *et al.* 2012, Tanomaru-Filho *et al.* 2017 b, Viapiana *et al.* 2014).

Veículos são propostos para a manipulação de cimentos à base de silicatos de cálcio visando adequada consistência e aplicabilidade clínica (Prati e Gandolfi 2015). O polietilenoglicol, é utilizado como veículo em pastas de hidróxido de cálcio como medicação intracanal (Athanasissiadis e Walsh, 2017). Até o presente momento não há estudo com utilização do polietilenoglicol como veículo de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio. A associação de quitosana ao silicato de cálcio pode promover aumento da atividade antimicrobiana e rápida formação de hidroxiapatita (Panahi *et al.* 2017), podendo contribuir para inibição da penetração e colonização bacteriana na interface cimento-dentina após o tratamento endodôntico (Del Carpio-Perochena *et al.* 2015), além de biomineralização dentinária (Budiraharjo *et al.* 2010).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas de dois cimentos endodônticos experimentais à base de silicato tricálcico, silicato dicálcico, hidróxido de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, óxido de zircônio e tugstato de cálcio. Polietilenoglicol, e a associação de hidrogel de quitosana e polietilenoglicol foram avaliados como veículos. Os cimentos experimentais foram comparados aos cimentos endodônticos AH Plus, e TotalFill BC Sealer. A hipótese nula é de que não há diferença entre as propriedades físico-químicas dos cimentos experimentais (EXP1 e EXP2), TotalFill BC Sealer e AH Plus.

Materiais e métodos

Foram desenvolvidos dois cimentos experimentais, cujas propriedades físico-químicas foram comparadas aos cimentos AH Plus e TotalFill BC Sealer (Apêndice A). Os materiais avaliados, assim como as proporções utilizadas estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1: Materiais e proporções utilizadas

Materiais	Fabricante/composição	Proporção pó-líquido
EXP1 ¹	Pó: silicato tricálcico ² , silicato dicálcico ² , fosfato de cálcio monobásico ³ , hidróxido de cálcio ⁴ , óxido de zircônio ⁵ e tungstato de cálcio ⁵ . Líquido: polietilenoglicol 400 ⁵ .	1 g/400 µL
EXP2 ¹	Pó: silicato tricálcico ² , silicato dicálcico ² , fosfato de cálcio monobásico ³ , hidróxido de cálcio ⁴ , óxido de zircônio ⁵ e tungstato de cálcio ⁵ . Líquido: polietilenoglicol 400 ⁵ e hidrogel de quitosana ⁶ .	1 g/600 µL
TF	TotalFill BC Sealer (Brasseler, Savannah, GA, USA. Lote: 15002SP. Val. 06.2017). Pré-manipulado e pronto para uso, em seringa, contendo óxido de zircônio, silicatos de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, agentes espessantes.	---
AHP	AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany. Lote: 199415L. Val: 02.2018). 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

Cimento Experimental 1 (EXP1); Cimento Experimental 2 (EXP2); TotalFill BC Sealer (TF); AH Plus (AHP). ¹ FOAr-Unesp, Araraquara, SP, Brasil; ² Mineral Research Processing, Meyzieu, France; ³ Synth, Diadema, SP, Brasil; ⁴ Merck, Darmstadt, Germany; ⁵ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; ⁶ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR), UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Tempo de presa

O tempo de presa foi avaliado de acordo com a norma ISO 6876 (2012). Para os cimentos à base de silicatos de cálcio, que necessitam de umidade para tomarem presa, foram confeccionados moldes de gesso tipo IV (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura (n=6). Para o AH Plus foram utilizados anéis metálicos com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura (n=6). Agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm, foi utilizada sobre a superfície de cada um dos cimentos. Os materiais foram mantidos em estufa (37 °C, 95% de umidade) durante todo o período. O tempo de presa foi determinado como o período, em minutos, entre a manipulação e o momento em que a agulha já não produzisse marcas na superfície dos cimentos.

Radiopacidade

A avaliação da radiopacidade dos cimentos foi realizada com base nas especificações ISO 6876. Foram confeccionados corpos de prova dos materiais com diâmetro interno de 10 mm e altura de 1 mm (n=5). Após a presa (37 °C, 95% de

umidade, 48 horas), um disco de cada material e uma escala de alumínio foram colocados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) para realização de tomada radiográfica, a qual foi realizada com o aparelho de raios-X Focus (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland), operado a 60 kV, 7 mA, 18 pulsos/s e 30 cm de distância focal. Os filmes foram processados, digitalizados e avaliados usando o programa ImageJ, onde foram selecionadas áreas de cada um dos degraus da escala milimetrada de Alumínio, para determinar a equivalência da radiopacidade dos cimentos em milímetros de alumínio. A conversão dos valores obtidos foi realizada conforme descrito por Húngaro-Duarte *et al.* (2009).

Solubilidade

A solubilidade foi avaliada segundo Carvalho-Junior *et al.* (2007). Foram confeccionados corpos de prova medindo 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura (n=5). Moldes de silicone, posicionados sobre uma placa de vidro, foram preenchidos com cada um dos cimentos avaliados, e um fio de nylon impermeável foi colocado no interior dos mesmos. Uma placa de vidro, coberta com uma película de celofane, foi colocada sobre o molde e pressionada manualmente. Para TF, EXP1 e EXP2 foram acomodadas gazes umedecidas entre os moldes e as placas (Tanomaru-Filho *et al.* 2017 b). 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. Após a presa dos materiais, os espécimes foram removidos dos respectivos moldes, colocados em dessecador a vácuo até a estabilização inicial da massa (aproximadamente 7 dias). As mensurações da massa foram realizadas em balança de precisão (Analítica Adventurer, Modelo AR2140, Ohaus - Indústria de balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Após estabilização inicial da massa, os espécimes foram suspensos pela fixação dos fios de nylon em recipientes plásticos com tampa, contendo 7,5 mL de água destilada. Os recipientes permaneceram em estufa a 37 °C pelos períodos experimentais, quando os espécimes foram removidos dos mesmos, lavados com água destilada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final (aproximadamente 7 dias). O teste foi realizado mantendo os corpos-de-prova em água destilada pelos períodos de 7 e 30 dias. As pesagens foram realizadas três vezes para cada espécime. A solubilidade (S) dos cimentos avaliados correspondeu à perda de massa de cada espécime [massa inicial (MI) menos massa

final (MF)], expressa em porcentagem (Marciano *et al.* 2016), que foi calculada através da seguinte fórmula: $S = (MI - MF) / MI \times 100$ (Lim *et al.* 2015).

Escoamento

A avaliação do escoamento foi realizada com base na norma ISO 6876. Após a manipulação de cada material, 0,05mL de cimento foi colocado em placa de vidro (n=10). Na sequência, outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o cimento com um dispositivo de 100 gramas, totalizando 120 g. Duas técnicas foram utilizadas para realizar a mensuração. Na primeira, com auxílio de um paquímetro digital, foi medido o diâmetro médio de cada espécime. Para o segundo método, os corpos-de-prova foram fotografados ao lado de uma régua milimetrada, as imagens obtidas foram digitalizadas e a área do cimento foi medida em mm² no programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00, como descrito por Tanomaru-Filho *et al.* (2007).

pH

A análise de pH foi realizada utilizando tubos de polietileno, com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro, preenchidos com cada material (n=10). Em seguida cada tubo foi imerso em 10 ml de água destilada e mantido em estufa durante os períodos experimentais, sendo que a cada período, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco com 10 ml de água destilada. Os períodos experimentais foram de 3 e 12 horas, 1, 7, 14 e 21 dias. O pH das soluções foi medido imediatamente após o término de cada período experimental com um pHmetro (Digimed, São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado.

Avaliação estatística

Os dados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade, e posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA e ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Tempo de presa

EXP2 e EXP1 apresentaram os maiores tempos de presa, respectivamente ($P < 0.05$), sendo que o tempo de presa de EXP2 foi maior que de EXP1 ($P < 0.05$), e o menor tempo de presa foi apresentado por AHP ($P < 0.05$). Todos os materiais avaliados apresentaram diferença estatística entre si ($P < 0.05$) (Tabela 2).

Radiopacidade

EXP1 e EXP2 apresentaram valores para radiopacidade acima do mínimo recomendado pela ISO 6876. EXP1 apresentou radiopacidade maior que EXP2 ($P < 0.05$), e similar à apresentada por TF ($P > 0.05$) (Tabela 2).

Solubilidade

Após 7 dias de imersão em água destilada, EXP1 e EXP2 apresentaram maior solubilidade que AHP e TF ($P < 0.05$). EXP2 apresentou solubilidade estatisticamente maior que EXP1 ($P < 0.05$). No entanto, após 30 dias de imersão em água destilada, a solubilidade de EXP1 foi semelhante à apresentada por TF ($P > 0.05$) (Tabela 2).

Escoamento

Exp.1 apresentou escoamento (mm e mm²) estatisticamente semelhante ao AHP ($P > 0.05$), e maior que o apresentado por EXP2 ($P < 0,05$) (Tabela 2). Escoamento de EXP1 e EXP2 atendem as especificações da ISO 6876/2012.

Tabela 2 – Tempo de presa, radiopacidade, solubilidade (7 e 30 dias) e escoamento – mm e mm² (média e desvio padrão) observados nos diferentes cimentos endodônticos.

	AHP	TF	EXP1	EXP2
Tempo de presa (minutos)	384 (± 0,0) ^a	581,5 (± 27,18) ^b	785 (± 23,45) ^c	870 (± 0,0) ^d
Radiopacidade (mmAl)	9,11 (± 0,44) ^a	5,88 (± 0,67) ^b	5,49 (± 0,39) ^b	4,51 (± 0,50) ^c
Solubilidade 7 d	0,037 (± 0,48) ^a	7,48 (± 0,77) ^b	14,05 (± 1,77) ^c	23,84 (± 1,51) ^d
Solubilidade 30 d	0,313 (±0,327) ^a	10,84 (±3,208) ^b	12,70 (±2,998) ^b	24,44 (±1,798) ^c
Escoamento (mm ²)	407,2 (± 114,2) ^a	535,4 (± 52,75) ^b	382,8 (± 42,43) ^a	250,5 (± 46,61) ^c
Escoamento (mm)	21,41 (±1,139) ^a	24,63 (±0,57) ^b	20,96 (±0,639) ^a	17,46 (±1,391) ^c

AH Plus (AHP), TotalFill BC Sealer (TF), Experimental 1 (EXP1), Experimental 2 (EXP2).

mm Al = milímetros de alumínio; Solubilidade: valores referentes à porcentagem de perda de massa.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa.

pH

Os cimentos EXP1 e EXP2, assim como TF, apresentaram pH alcalino e significativamente mais elevado que o pH apresentado por AHP em todos os períodos experimentais ($P < 0.05$). No período de 3 horas o pH dos grupos TF e EXP2 foram semelhantes ($P > 0.05$). EXP1 e EXP2 apresentaram valores semelhantes de pH ($P > 0.05$) em todos os períodos, exceto em 21 dias. Sendo que no período de 14 dias ambos foram, também, semelhantes à TF ($P > 0.05$). EXP1 apresentou valores semelhantes aos apresentados por TF nos períodos de 7, 14 e 21 dias ($P > 0.05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de pH (média e desvio padrão) observados nos diferentes períodos experimentais (7 e 12 horas, 1, 7, 14 e 21 dias)

Períodos	AHP	TF	EXP1	EXP2	Controle
3 h	7,044 ($\pm 0,34$) ^b	10,7 ($\pm 0,25$) ^c	10,13 ($\pm 0,41$) ^d	10,42 ($\pm 0,14$) ^{c,d}	6,15 ($\pm 0,29$) ^a
12 h	7,419 ($\pm 0,38$) ^b	11,39 ($\pm 0,33$) ^c	9,784 ($\pm 0,41$) ^d	9,88 ($\pm 0,25$) ^d	6,36 ($\pm 0,22$) ^a
1 d	6,584 ($\pm 0,16$) ^a	10,37 ($\pm 0,20$) ^b	9,489 ($\pm 0,43$) ^c	9,492 ($\pm 0,41$) ^c	6,50 ($\pm 0,17$) ^a
7 d	5,727 ($\pm 0,29$) ^b	10,29 ($\pm 0,21$) ^c	10,36 ($\pm 0,77$) ^{c,d}	10,93 ($\pm 0,54$) ^d	6,392 ($\pm 0,42$) ^a
14 d	6,441 ($\pm 0,43$) ^a	10,57 ($\pm 0,13$) ^b	10,58 ($\pm 0,47$) ^b	10,84 ($\pm 0,43$) ^b	6,107 ($\pm 0,29$) ^a
21 d	6,050 ($\pm 0,20$) ^a	9,50 ($\pm 0,93$) ^b	10,05 ($\pm 0,91$) ^b	10,89 ($\pm 0,30$) ^c	6,084 ($\pm 0,34$) ^a

AH Plus (AHP), TotalFill BC Sealer (TF), Experimental 1 (EXP1), Experimental 2 (EXP2), Controle = água destilada. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa.

Discussão

O polietilenoglicol 400, utilizado como veículo dos cimentos experimentais, proporcionou consistência adequada, facilidade de manipulação, bom escoamento e pH alcalino. Polietilenoglicol é bastante usado como veículo de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio (Athanasiadis & Walsh, 2017). As propriedades físico-químicas de materiais de silicato podem ser potencialmente melhoradas por polímeros como o polietilenoglicol (Zhou *et al.* 2017). Quando associado às pastas de hidróxido de cálcio, o polietilenoglicol permite a difusão de íons Ca^{2+} e OH^- para a dentina radicular (Camões *et al.* 2004). Polietilenoglicol quando adicionado a um biomaterial à base de fosfato de cálcio (ICPC 1%), proporcionou estabilidade ao material, aumento da viscosidade, e permitiu proliferação celular (Chen *et al.* 2011). O propilenoglicol, que é similar ao polietilenoglicol, quando utilizado para a manipulação do MTA, juntamente com água destilada, pode contribuir para o aumento do tempo de presa, melhora da fluidez, aumento do pH e da liberação de

íons cálcio (Duarte *et al.* 2012), além de aumento da sua capacidade seladora (Brito-Júnior *et al.* 2010).

A quitosana, presente no cimento EXP2, pode contribuir para maior atividade antimicrobiana (Del Carpio-Perochena *et al.* 2015). Panahi *et al.* (2017) observaram que a adição de quitosana ao MTA aumenta sua ação antimicrobiana, além de proporcionar rápida formação de hidroxiapatita e maior biocompatibilidade.

O escoamento é uma propriedade física importante para um cimento endodôntico, visando o selamento de áreas de difícil acesso, como áreas de istmos e canais acessórios (Candeiro *et al.* 2012). EXP1 e EXP2 atendem ao padrão de escoamento estabelecido pela ISO 6876 (2012), no qual o valor mínimo necessário para escoamento é de 17 mm. EXP1 apresentou valores de escoamento (mm e mm²) estatisticamente semelhantes aos apresentados por AHP, e maiores que os apresentados por EXP2. Os valores obtidos do escoamento de TF e AHP são concordantes com os observados por Tanomaru-Filho *et al.* (2017 b).

Os cimentos EXP1 e EXP2 apresentaram pH alcalino e maiores que AHP em todos os períodos experimentais. Ambos apresentaram valores semelhantes de pH em todos os períodos, exceto aos 21 dias. EXP1 e EXP2 apresentaram pH semelhante à TF no período de 14 dias. TF demonstrou elevados valores de pH, assim como observado em estudos anteriores (Zhou *et al.* 2013, Tanomaru-Filho *et al.* 2017 b). Os cimentos à base de silicato de cálcio apresentam ação alcalinizante, com aumento de pH durante seu processo de hidratação (Prati & Gandolfi 2015). A reação de hidratação produz silicato de cálcio e hidróxido de cálcio, elevando o pH. A água participa do ciclo de reações, produzindo mais silicato de cálcio hidrogel e hidróxido de cálcio, mantendo o pH alcalino (Zhang *et al.* 2009, Wang *et al.* 2014). O pH alcalino, assim como a liberação de íons cálcio, estão relacionados à bioatividade e a indução de mineralização (Húngaro-Duarte *et al.* 2003, Gandolfi *et al.* 2010).

Os cimentos experimentais, assim como TF, apresentaram maior tempo de presa. Longo tempo de presa para o cimento BC Sealer, mesmo em presença de umidade é observado (Loushine *et al.* 2011, Xuereb *et al.* 2015). A presença de quitosana pode ter colaborado para o aumento no tempo de presa de EXP2, que foi maior que de EXP1. A adição de quitosana ao MTA resulta em maior tempo de presa (Panahi *et al.* 2017). Não há um tempo de presa estipulado para os cimentos

endodônticos, mas ele deve ser suficiente para a correta obturação dos canais radiculares (Resende *et al.* 2009).

A análise da solubilidade dos materiais estudados demonstra que os cimentos à base de silicatos de cálcio apresentaram os maiores valores de solubilidade. A presença no EXP2 de maior quantidade de veículo pode ter influenciado na solubilidade do mesmo. Outro fator a ser considerado é a presença da quitosana no EXP2, visto que sua adição pode afetar as propriedades físicas e mecânicas do cimento (Panahi *et al.* 2017). Os resultados obtidos no presente estudo são concordantes com os obtidos por Gandolfi *et al.* (2015) em avaliação de cimentos experimentais contendo silicatos de cálcio e fosfato de cálcio, com elevados valores de solubilidade para ambos após 24 horas de imersão em água destilada. Os autores observaram solubilidade de 19.5% para CaSi- α TCP, 28.46% para CaSi-DCPD e de 24.40% para CaSi. Do mesmo modo, Borges *et al.* (2012), obtiveram elevado valor de solubilidade do cimento iRoot SP, que apresenta composição semelhante à TF, EXP1 e EXP2. Os valores de solubilidade do BC Sealer (TF), são concordantes com os observados por Tanomaru-Filho *et al.* (2017 b), porém diferem dos obtidos por Zhou *et al.* (2013), que empregou metodologia diferente. Após 30 dias de imersão em água destilada, a solubilidade de EXP1 foi menor do que em 7 dias de imersão, e semelhante à solubilidade de TF. Estes resultados sugerem ter ocorrido estabilização da massa e consequentemente menor solubilização após 30 dias de imersão em água destilada.

Os cimentos à base de silicato de cálcio são materiais hidrofílicos, podendo absorver água em excesso, e por isso apresentar maior diferença de massa após evaporação da água (Húngaro-Duarte *et al.* 2012). Tanomaru-Filho *et al.* (2017 b) consideram que o estudo da alteração volumétrica, em micro-CT (Microtomografia computadorizada de raios-X – modelo 3D), pode ser considerado como uma avaliação complementar ao teste de solubilidade e apresentar correlação com o desempenho clínico. Os autores observaram que, na avaliação tradicional da solubilidade, o TotalFill BC Sealer apresentou valores elevados de solubilidade, porém o mesmo não ocorreu em avaliação da alteração volumétrica. Tais resultados podem ser decorrentes da absorção de fluidos, resultando em estabilidade volumétrica do material (Silva *et al.* 2017).

Os resultados deste estudo demonstraram que todos os cimentos avaliados apresentaram radiopacidade acima dos 3 mmAl, conforme recomendações da

ISO 6876. Sendo que EXP1 apresentou radiopacidade semelhante à apresentada por TF, e maior que EXP2. Estudos anteriores demonstraram que o óxido de zircônio, é capaz de promover radiopacidade satisfatória (Húngaro-Duarte *et al.* 2009), podendo ser considerado como agente radiopacificador para ser associado ao cimento de silicato de cálcio, por proporcionar propriedades físico-químicas adequadas (Bosso-Martelo *et al.* 2016). Húngaro-Duarte *et al.* (2012) observaram que tanto o óxido de zircônio quanto o tungstato de cálcio são capazes de promover radiopacidade satisfatória.

Conclusão

Os resultados deste estudo mostraram que EXP1 e EXP2 apresentam tempo de presa, radiopacidade e escoamento de acordo com ISO 6876, além de pH alcalino em todos os períodos experimentais. Contudo, EXP1 apresentou tempo de presa, radiopacidade, escoamento e solubilidade mais favoráveis que EXP2, o que o confere maior potencial para aplicabilidade clínica.

Referências

- Almeida LHS, 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.
- Athanassiadis B, Walsh LJ (2017) Aspects of Solvent Chemistry for Calcium Hydroxide Medicaments. *Materials* **10**, 1219. doi:10.3390/ma10101219.
- Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus G, Miranda CES, Pécora JD (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.
- Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Vipiana R, Berbert FLC, Húngaro Duarte MA, Tanomaru-Filho M (2016) Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clinical Oral Investigation* **20**, 83–90.
- Brito-Júnior M, Viana FA, Pereira RD, *et al.* (2010) Sealing ability of MTA-Angelus with propyleneglycol in furcal perforations. *Acta Odontologica Latinoamericana* **23**, 124-128.

- Budiraharjo R, Neoh KG, Kang ET, Kishen A (2010) Bioactivity of novel carboxymethyl chitosan scaffold incorporating MTA in a tooth model. *International Endodontic Journal* **43**, 930–39.
- Camilleri J (2015) Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *Journal of Endodontics* **41**, 1139-45.
- Camões IC, Salles MR, Chevitaese O, Gomes LN (2004) Diffusion of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associated with different vehicles: chromatographic study (high-performance liquid chromatography). *Journal of Endodontics* **30**, 30-4.
- Candeiro GTM, Correia FC, Húngaro-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**, 842-845.
- 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.
- Chen F, Changsheng L, Wei J, Chen X, Zhao Z, Gao Y (2011) Preparation and characterization of injectable calcium phosphate cement paste modified by polyethylene glycol-6000. *Materials Chemistry and Physics* **125**, 818–24.
- 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**, 1353-8.
- Duarte MAH, Alves de Aguiar K, Zeferino MA, *et al.* (2012) Evaluation of the propylene glycol association on some physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* **45**, 565–70.
- Gandolfi M, Spagnuolo G, Siboni F *et al.* (2015) Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clinical Oral Investigations* **19**, 2075-2089.
- Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C (2010) Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *International Endodontic Journal* **43**, 917-29.
- Garrido ADB, Lia RCC, França SC, da Silva JF, Astolfi- Filho S, Sousa-Neto MD (2010) Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *International Endodontic Journal*, **43**, 283–91.
- Hess D, Solomon E, Spears R, He J (2011) Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. *Journal of Endodontics* **37**, 1547-9.

- Hungaro-Duarte MA, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC (2003) pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **95**, 345-7.
- 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.
- Húngaro-Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT et al. (2012) Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of White Portland cement and White Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics* **38**, 394-97.
- International Organization for Standardization Dentistry (ISO). ISO 6879. *Root Canal Sealing Materials*. London, UK: British Standards Institution ISO; 2012.
- Lim ES, Park YB, Kwon YS et al (2015) Physical properties and biocompatibility of an injectable calcium-silicate-based root canal sealer: in vitro and in vivo study. *BMC Oral Health* **15**, 129. doi: 10.1186/s12903-015-0112-9.
- Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, et al. (2011) Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *Journal of Endodontics* **37**, 673-77.
- Marciano MA, Guimaraes BM, Amoroso-Silva P, Camilleri J, Húngaro-Duarte MA (2016) Physical and Chemical Properties and Subcutaneous Implantation of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Propylene Glycol. *Journal of Endodontics* **42**, 474-9.
- Panahi F, Rabiee SM, Shidpour R (2017) Synergic effect of chitosan and dicalcium phosphate on tricalcium silicate-based nanocomposite for root-end dental application. *Materials Science and Engineering C* **80**, 631-41.
- Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH (2018) Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *International Endodontic Journal* **51**, 177-205.
- Prati C, Gandolfi MG (2015) Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. *Dental Materials* **31**, 351-70.
- Resende LM, Rached-Junior FJA, Versiani MA et al. (2009) A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *International Endodontic Journal* **42**, 785–793.
- Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM (2017) Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *International Endodontic Journal* **50**, 67-76.

- Silva EJ, Perez R, Valentim RM *et al.* (2017) Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *International Endodontic Journal* **50**, 407-14.
- Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM *et al.* (2017 a) Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *International Endodontic Journal* **50** Suppl 2: e31-e39.
- Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Tanomaru JM, *et al.* (2007) Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Australian Endodontic Journal* **33**, 23–6.
- Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chaves-Andrade GM *et al.* (2017 b) Physicochemical properties and volumetric change of silicone/ bioactive glass and calcium silicate-based endodontic sealers. *Journal of Endodontics* **43**, 2097-2101.
- 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.
- Xuereb M, Vella P, Damidot D *et al.* (2015) In situ assessment of the setting of tricalcium silicate-based sealers using a dentin pressure model. *Journal of Endodontics* **41**, 114-24.
- Wang Z, Shen Y, Haapasalo, M (2014) Dentin Extends the Antibacterial Effect of Endodontic Sealers against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Journal of Endodontics* **40**, 505-8.
- Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M (2009) Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **35**, 1051-5.
- Zhou H, Du T, Shen Y, Wang Z, Zeng Y, Haapasalo M (2015) In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *Journal of Endodontics* **41**, 56-61.
- Zhou H, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng Y, Haapasalo M (2013) Physical properties of 5 root canal sealers. *Journal of Endodontics* **39**, 1281-6.
- Zhou Y, Hou D, Jiang J, She W, Yu J (2017) Reactive molecular simulation on the calcium silicate hydrates/polyethylene glycol composites. *Chemical Physics Letter* **687**, 184-187.

3.2 Publicação 2*

Avaliação da citocompatibilidade, potencial bioativo e atividade antimicrobiana de cimento experimental à base de silicato de cálcio

RESUMO

Este estudo avaliou citocompatibilidade, potencial bioativo e atividades antimicrobiana e antibiofilme de um cimento experimental (EXP) composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio, tungstato de cálcio e polietilenoglicol, em comparação aos cimentos TotalFill BC Sealer (TF) e AH Plus (AHP). Citocompatibilidade foi avaliada pelos ensaios vermelho neutro (NR) e metiltetrazólio (MTT), após exposição das células Saos-2 aos extratos dos cimentos por 24 h. Bioatividade celular foi avaliada pela atividade de fosfatase alcalina (ALP) e coloração vermelho de alizarina (ARS). Atividades antimicrobiana e antibiofilme foram avaliadas pelos testes de contato direto sobre células planctônicas (TCDCP) e contato direto modificado sobre biofilme (TCDM). Dados de MTT, NR e ALP foram analisados pelos testes Two Way ANOVA e Bonferroni, os de ARS pelos testes ANOVA e Tukey, e os microbiológicos pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$). EXP, TF e AHP não apresentaram citotoxicidade para Saos-2, em todas as diluições, nos ensaios MTT e NR, em relação ao controle negativo ($P > .05$). Maior ALP foi observada após sete dias de exposição das células Saos-2 ao extrato de AHP e EXP ($P > .05$). Observou-se maior produção de nódulos mineralizados para TF e EXP ($P < .05$). No TCDCP, EXP e TF promoveram maior redução de *Enterococcus faecalis* em comparação ao AHP e ao controle ($P < .05$), e eliminaram *Candida albicans*. No TCDM, EXP e TF promoveram maior redução de UFC de *E. faecalis* em comparação ao AHP e ao controle ($P < .05$). Conclui-se que EXP apresenta biocompatibilidade, potencial bioativo, atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans*, e ação antibiofilme sobre *E. faecalis*, com potencial para utilização no tratamento endodôntico.

Palavras-chave: biocompatibilidade, *Candida albicans*, endodontia, *Enterococcus faecalis*, silicato tricálcico.

* Artigo nas normas do periódico *Journal of Endodontics*, ao qual será submetido.

INTRODUÇÃO

O material obturador ideal deve apresentar, dentre outras propriedades, biocompatibilidade (1), atividade antimicrobiana (1), e capacidade de induzir formação de tecido mineralizado (2). Desta forma, novos cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio são propostos (3). Dentre eles, o Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc.) é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, sulfato de cálcio, sílica e óxido de tântalo, apresentando biocompatibilidade e bioatividade celular (4). Os cimentos Endosequence BC Sealer (Brasseler USA, Savannah, GA) e TotalFill BC Sealer (FKG, La Chaux-de-Fonds, Switzerland; Brasseler, Savannah, Georgia, USA) são semelhantes e, de acordo com os fabricantes, compostos por silicatos de cálcio, fosfato de cálcio, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio e agentes espessantes. O BC Sealer apresenta propriedades satisfatórias, como citocompatibilidade (1) e bioatividade, induzindo a proliferação e adesão celular (5). A partir da composição destes cimentos comerciais, novos materiais obturadores com silicatos de cálcio, radiopacificadores e veículos podem ser desenvolvidos.

Silicato tricálcico é usado para formulação de novos cimentos endodônticos em função de seu potencial bioativo (6) e indução da formação de hidroxiapatita (7). O silicato dicálcico demonstra biocompatibilidade e bioatividade (8). O fosfato de cálcio monobásico, adicionado ao cimento endodôntico, pode colaborar na reação com o hidróxido de cálcio e posterior produção de hidroxiapatita (9).

Os radiopacificadores representam parte importante da composição dos cimentos endodônticos. O BC Sealer, com óxido de zircônio em sua composição como agente radiopacificador, apresenta adequadas propriedades biológicas (3). O AH Plus apresenta os radiopacificadores óxido de zircônio e tungstato de cálcio (9), apresentando radiopacidade bastante satisfatória (10).

Diferentes aditivos e veículos são propostos à fim de melhorar a consistência e a manipulação de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio (11). O polietilenoglicol é o veículo de pastas de hidróxido de cálcio utilizadas como medicação intracanal (12). Quando associado ao silicato de cálcio, possibilita a melhora de suas propriedades físico-químicas (13). Até o momento, não há relatos na literatura de sua utilização como veículo de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio.

O insucesso do tratamento endodôntico está associado à persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares (14). Grande parte dos casos de insucesso do tratamento endodôntico é associado à presença de *Enterococcus faecalis* (15). *Candida albicans* é uma espécie de fungo associada aos insucessos da terapia endodôntica (16). Assim, a utilização de material obturador que apresente atividade antibacteriana pode favorecer o controle da infecção residual (17). O BC Sealer apresenta ação antibacteriana sobre *E. faecalis*, devido ao seu potencial de alcalinização induzido por silicatos e fosfato de cálcio (17).

Deste modo, este estudo tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade, o potencial de induzir mineralização e atividades antimicrobiana e antibiofilme de um cimento experimental composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio, tungstato de cálcio e polietilenoglicol, comparando com os cimentos Totalfill BC Sealer e AH Plus.

Materiais e Métodos

Foram avaliadas as propriedades biológicas e antimicrobianas (APÊNDICE B) de um cimento experimental (EXP) à base de silicatos de cálcio, comparando aos cimentos TotalFill BC Sealer (TF) e AH Plus (AHP). Os materiais avaliados neste estudo, assim como suas proporções e fabricantes estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Materiais e proporções utilizadas

Materiais	Fabricante/composição	Proporção pó-líquido
EXP ¹	Pó: silicato tricálcico ² , silicato dicálcico ² , fosfato de cálcio monobásico ³ , hidróxido de cálcio ⁴ , óxido de zircônio ⁵ e tungstato de cálcio ⁵ . Líquido: polietilenoglicol ⁵ .	1 g/400 µL
TF	TotalFill BC Sealer (Brasseler, Savannah, GA, USA. Lote: 15002SP. Val. 06.2017). Pré-manipulado e pronto para uso, em seringa, contendo óxido de zircônio, silicatos de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, agentes espessantes.	---
AHP	AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany. Lote: 199415I. Val: 02.2018). 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

EXP, Cimento Experimental; TF, TotalFill BC Sealer; AHP, AH Plus.

¹ FOAr-Unesp, Araraquara, SP, Brasil. ² Mineral Research Processing, Meyzieu, France. ³ Synth, Diadema, SP, Brasil. ⁴ Merck, Darmstadt, Germany. ⁵ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Avaliação de citotoxicidade e bioatividade

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

Preparo dos extratos

AH Plus (Dentsply) foi utilizado como material de referência (ISO 10993-5 2005) (18). Colocou-se 0,5 g de cada cimento em poços vazios de placas de cultura de 12 poços (314.0 mm² área e 3.0 mm altura) (Jet Biofil), que permaneceram em estufa a 37 °C, 95% de umidade, 5% CO₂, por 24 h, até a completa presa dos materiais. Após este período, as placas foram expostas a luz ultravioleta (UV) para prevenir contaminação (19). Em seguida, 5 mL de meio de cultura DMEM (meio Dulbecco modificado; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sem soro foi colocado 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, para obtenção do extrato de cada material (ISO 10993-5 2005) (18). Como controle negativo foi utilizado meio DMEM sem soro e como controle positivo foi utilizado DMSO 20 %.

Cultura celular

Células semelhantes a osteoblastos humanos, 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), mantidos à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, até a confluência.

Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelos testes 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5- brometo de difenil-tetrazólio (MTT) e vermelho neutro (NR). Para realizar estes ensaios, 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 h à 37 °C, 95% de umidade e 5% CO₂ para obter células aderentes antes da exposição aos materiais. As células foram expostas aos extratos dos cimentos nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, assim como ao controle negativo (meio DMEM sem soro) e ao controle positivo (DMSO 20 %) por 24 horas.

O ensaio MTT foi realizado em dois momentos distintos, simultaneamente ao ensaio NR após exposição das células Saos-2 aos extratos dos cimentos nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, e simultaneamente ao ensaio ALP após exposição de Saos-2 aos extratos dos cimentos na diluição 1:8 pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. Após cada período experimental, o meio foi substituído por 100 µL de solução 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, foi realizada lavagem com tampão fosfato (PBS 1X) e adicionou-se 100 µL de isopropanol acidificado 0,04 N (Sigma-Aldrich), para solubilizar o formazan. A densidade óptica (OD) de 570 nm foi mensurada em um espectrofotômetro (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3).

Para o ensaio NR, as células permaneceram em contato com os extratos dos cimentos nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 por 24 horas. Após este período, os mesmos foram substituídos por 0.1 mL de meio DMEM contendo 50 µg NR / mL (Sigma-Aldrich), e incubados por 3 horas, à 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Em seguida, o corante foi removido e o produto colorimétrico foi solubilizado em

100 μ L de uma solução de etanol (etanol a 50% e solução de ácido acético a 1%) (Sigma-Aldrich). A mensuração da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3).

Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi determinada utilizando o kit comercial Labtest (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). Após 24 horas do plaqueamento (1×10^5 células/mL em placas de 96 poços), células Saos-2 foram expostas aos extratos dos materiais (na diluição 1:8) pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. A cada dois dias os extratos dos cimentos foram renovados, durante os períodos experimentais. Após cada período experimental, os extratos foram removidos e as células lavadas com 200 μ L de PBS 1X, em seguida 200 μ L de uma solução de lauril sulfato de sódio (1% em água destilada, Sigma-Aldrich) foi adicionada em cada poço. As amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Cada uma das amostras foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburg, Germany) contendo o substrato e o tampão. Em seguida as amostras foram incubadas com 500 μ L de reagente de cor. A densidade ótica foi avaliada em espectrofotômetro a 590 nm. Sextuplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3). Os dados foram expressos como a atividade de ALP normalizada pelo número de células viáveis detectadas no ensaio de MTT no respectivo período de cultura.

Coloração Vermelho de Alizarina

Com o objetivo de avaliar a quantidade de cálcio depositado pelos diferentes cimentos avaliados, realizou-se o ensaio de coloração com vermelho de alizarina (Sigma – Aldrich). Deste modo, células osteoblásticas Saos-2 foram contadas e plaqueadas (1×10^4 células/mL) em placas de cultura de 24 poços com DMEM suplementado com ácido ascórbico 50 μ g/mL (Sigma-Aldrich) e 10 mM β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich). Pelo período de 21 dias, o meio de cultura DMEM osteogênico (DMEM 10% SFB; 100 IU/mL penicilina; 100 mg/mL estreptomicina; 0.023 g/mL β -glicerolfosfato; 0.055 mg/mL ácido ascórbico – Sigma Aldrich) foi renovado a cada 2 dias. Decorrido este período, foi realizada aspiração, lavagem dos poços com PBS, e em seguida as células foram fixadas com etanol 70% a 4 °C

por 1 hora. Na sequência foi realizada a lavagem com água destilada (duas vezes) e a adição de 0,3 mL 40 mM AlizarinRed S (2%- pH 4,1). Em seguida as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos, quando então realizamos a aspiração do corante e lavagem dos poços por 4 vezes com 1 mL de água destilada por poço. As placas foram mantidas anguladas durante 2 minutos, para facilitar a remoção do excesso de água. A mineralização foi quantificada através da dissolução dos nódulos com 500 µL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridínio (Sigma/Aldrich) por poço e, incubada por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Três alíquotas de 100 µL da ressuspensão de cada poço foram transferidas para uma placa de 96 poços para que fosse realizada a leitura em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda.

Avaliação das atividades antimicrobiana e antibiofilme

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Telstar Technologies, S.L.–BV 100, Terrassa, Espanha), sob condições assépticas, utilizando cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Teste de contato direto sobre células planctônicas

Microplacas de 96 poços (uma para cada cepa microbiana) foram utilizadas, nas quais os materiais experimentais foram inseridos de forma padronizada na parede lateral de cada poço (n=8). Após 24 h de presa em estufa a 37 °C e 30 minutos de exposição a Luz UV (ultravioleta) em fluxo laminar, 10 µL de cada inóculo foi colocado sobre cada um dos poços contendo os cimentos. Foi utilizada uma placa para cada cepa. No grupo controle positivo foi adicionado somente o inóculo. As placas permaneceram em estufa a 37 °C durante 1 h e 30 min. Em seguida, adicionou-se 250 µL de TSb em cada poço contaminado com *E. faecalis* e 250 µL de *Sabouraud Dextrose broth* (SDb) nos poços contaminados por *C. albicans*. Na sequência, foi realizada a diluição decimal seriada e o plaqueamento em placas de Petri contendo *Tryptic soy agar* (TSA) e *Sabouraud Dextrose agar* (SDa), respectivamente. Após a incubação das placas em estufa a 37 °C, realizou-se a contagem de UFC mL⁻¹ e transformação logarítmica (log₁₀). O experimento foi repetido duas vezes independentemente .

Atividade antibiofilme: teste de contato direto modificado (TCDM)

Foram confeccionados discos de cada um dos materiais, medindo 7 mm x 1 mm (diâmetro x espessura interna), e mantidos em estufa a 37°C e umidade controlada, durante 48 horas. Após aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia de Araraquara (03/2017), blocos de dentina bovina esterilizados e com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura) foram utilizados como substrato para formação do biofilme. Para isso foram utilizados incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas, e todos os cortes foram realizados em máquina de corte de precisão (Isomet 1000 – Buehler, Lake Bluff, IL, EUA).

Para a formação do biofilme *E. faecalis*, os microrganismos foram reativados em 4,0 mL de caldo *Tryptic soy broth* (TSb, Difco Detroit, MI, EUA) e mantidos em estufa a 37°C *overnight*. Os inóculos foram ajustados na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹.

Em placas de cultura celular de 24 poços os blocos de dentina foram submersos em meio TSb (2 mL) contendo 1% do inóculo. As placas foram mantidas em incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) em ambiente de microaerofilia a 37 °C por 14 dias. O meio de cultura TSb foi trocado a cada 48 horas, sem a adição de novos microrganismos.

Transcorrido o período pós-manipulação, cada um dos discos de cimento foi removido da matriz, os mesmos foram esterilizados em luz ultravioleta, e colocados sobre cada um dos blocos de dentina contendo o biofilme formado, lavados previamente em solução salina para remoção de bactérias planctônicas e meio de cultura residual. Os conjuntos formados pelos blocos de dentina e os discos de cimentos (n=6) foram colocados em Placas de Petri, e foi gotejado 20 µL de solução salina estéril sobre cada conjunto para evitar ressecamento. O tempo de contato foi de 15 h, e as placas foram incubadas em estufa a 37°C. Um grupo controle foi incluído, onde os biofilmes entraram em contato com disco de teflon, servindo de comparação para os resultados.

Após o período de contato, os discos de cimentos e de teflon foram removidos, e os blocos de dentina com o biofilme remanescente e o grupo controle foram individualmente colocados em microtubos contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro, e depois foram agitados em vortéx por 1 minuto (modelo

Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) para suspensão dos microrganismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e plaqueamento de três alíquotas de 20 µL de cada uma das suspensões em placas de Petri contendo meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSa). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. A leitura de cada placa de cultura resultou da média do número de UFC mL⁻¹ das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição onde apresentou em cada área um número de colônias entre 5 e 50. Os dados foram então submetidos à transformação logarítmica (log₁₀) e o resultado de cada grupo foi calculado a partir da média dos seus espécimes.

Avaliação estatística

A viabilidade celular e a atividade de ALP foram analisados pelos testes estatísticos de Two Way ANOVA e Bonferroni. Os dados do ensaio ARS foram submetidos aos testes One Way ANOVA e Tukey. Os dados obtidos nos testes microbiológicos foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Viabilidade celular

Os ensaios MTT e NR (Fig. 1 A) revelaram que os grupos AHP, EXP e TF, não apresentaram citotoxicidade para Saos-2, visto que não apresentaram diferença estatística em relação ao controle negativo ($P > .05$).

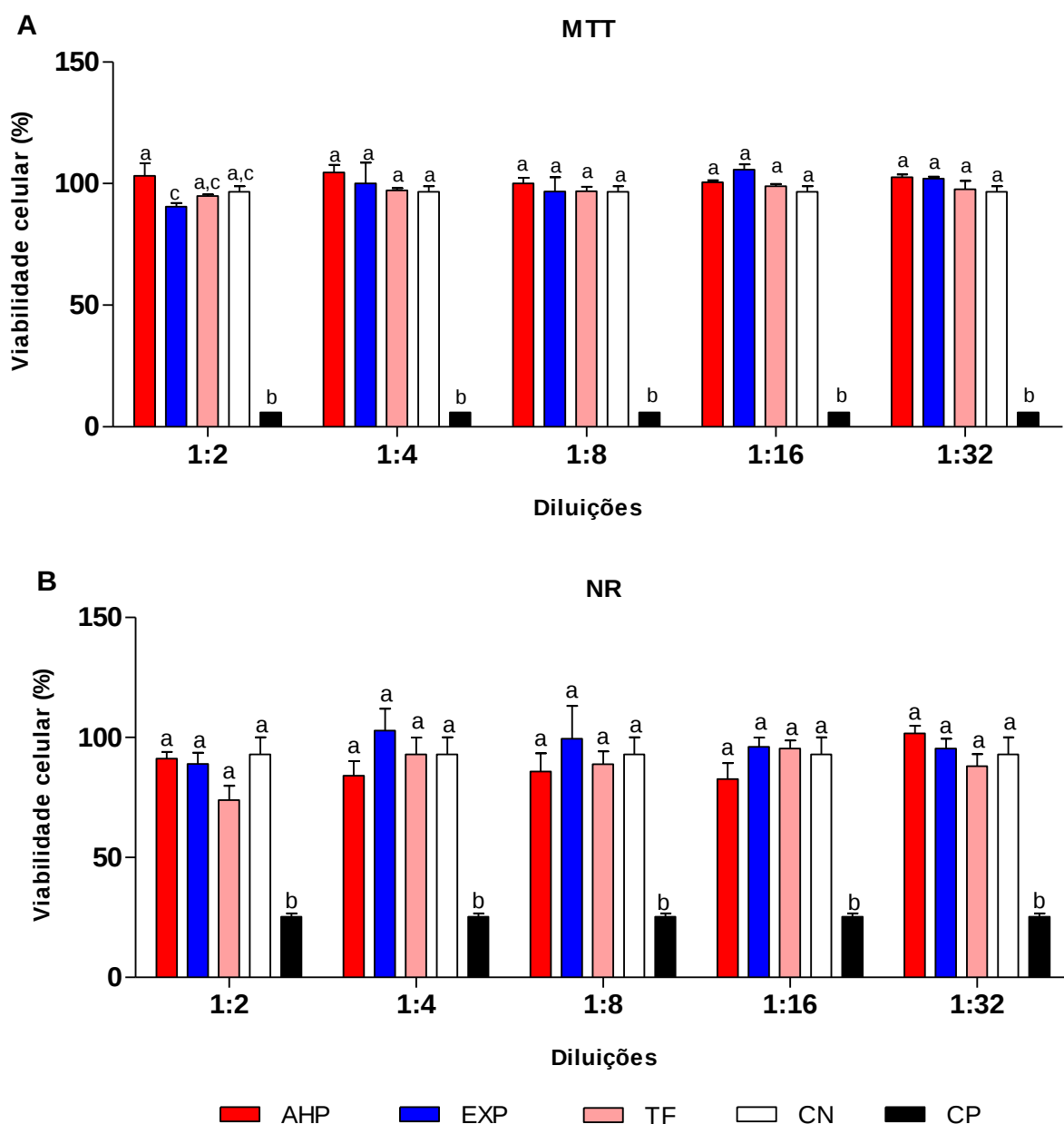


Figura 1: Viabilidade celular de Saos-2 avaliadas pelos ensaios MTT (A) e NR (B), após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos AHP, EXP, TF nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, meio de cultura sem soro (controle negativo), e DMSO 20% (controle positivo). Barras com letras diferentes representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos (em cada diluição), controle negativo, e controle positivo.

AHP, AH Plus; EXP, cimento experimental à base de silicato de cálcio (composição descrita na Tabela 1); TF, TotalFill BC Sealer; CN, controle negativo; CP, controle positivo.

Atividade de fosfatase alcalina

A menor viabilidade celular foi observada no primeiro dia de exposição aos extratos dos cimentos, não havendo diferença estatística entre os grupos dos materiais avaliados e o grupo controle negativo ($P > .05$). Nos demais períodos a viabilidade celular foi maior, sendo que no período de três dias todos os grupos apresentaram viabilidade similar ao controle negativo ($P > .05$). No período de sete dias foi observada maior viabilidade celular para o grupo EXP (Fig. 2 A). Todos os grupos apresentaram atividade de fosfatase alcalina semelhante ao controle negativo ($P > .05$) no período de três dias. A maior atividade de fosfatase alcalina foi observada após sete dias de exposição das células Saos-2 ao extrato de AHP em relação ao controle ($P < .05$). O grupo EXP também apresentou maior atividade de ALP no período de 7 dias, não apresentando diferença estatística quando comparado ao AHP ($P > .05$) (Fig.2 B).

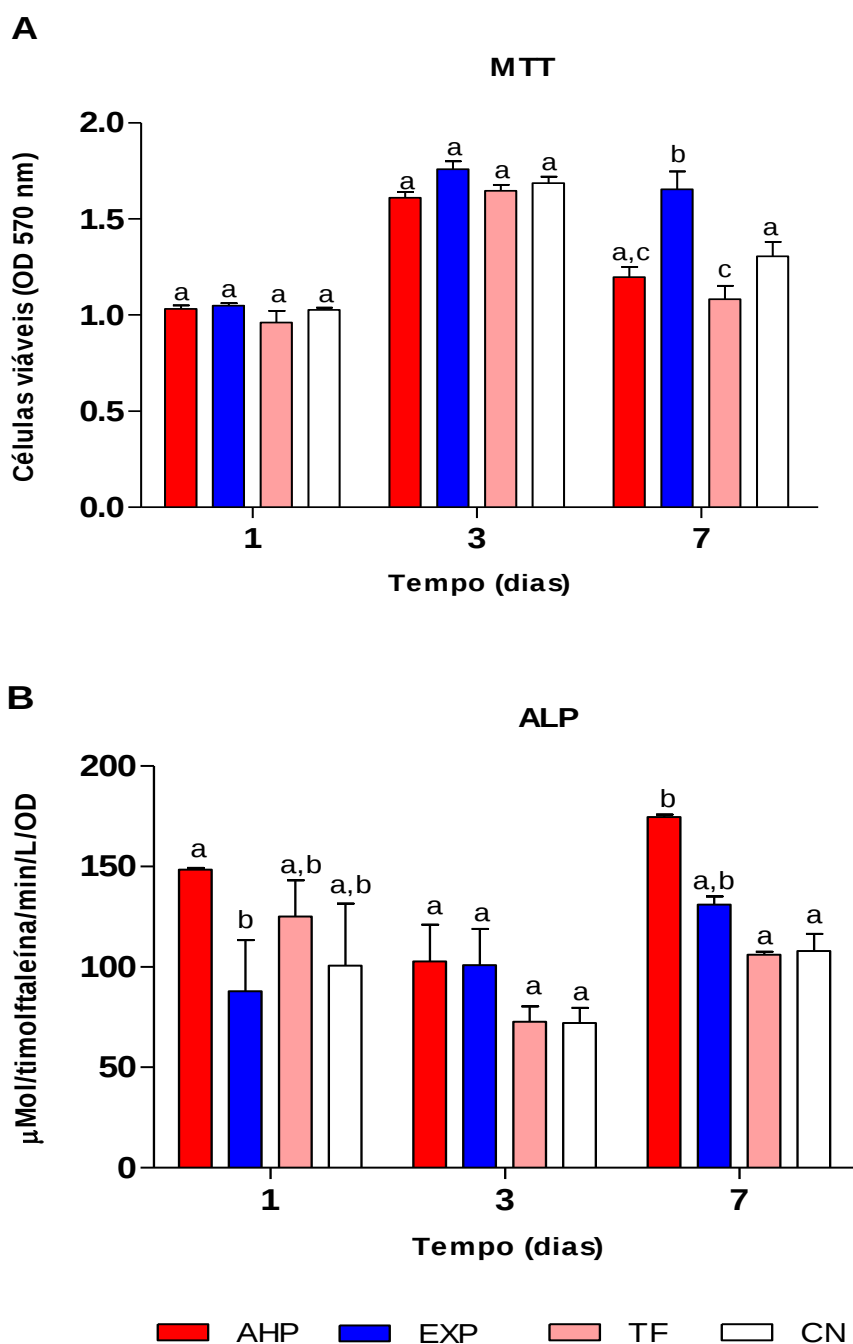


Figura 2: (A) Viabilidade celular de Saos-2 avaliada pelo ensaio MTT e (B) atividade ALP após exposição aos extratos de AHP, EXP, TF na diluição de 1:8, e meio de cultura sem soro (controle negativo), pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. Barras com letras diferentes representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e o controle negativo em cada período. AHP, AH Plus; EXP, cimento experimental à base de silicato de cálcio (composição descrita na Tabela 1); TF, TotalFill BC Sealer; CN, controle negativo.

Coloração Vermelho de Alizarina (ARS)

AHP, EXP e TF apresentaram deposição de nódulos de mineralização. AHP apresentou resultados semelhantes ao controle e EXP ($P > .05$). EXP e TF apresentaram maior deposição de nódulos mineralizados quando comparados ao controle ($P < .05$).

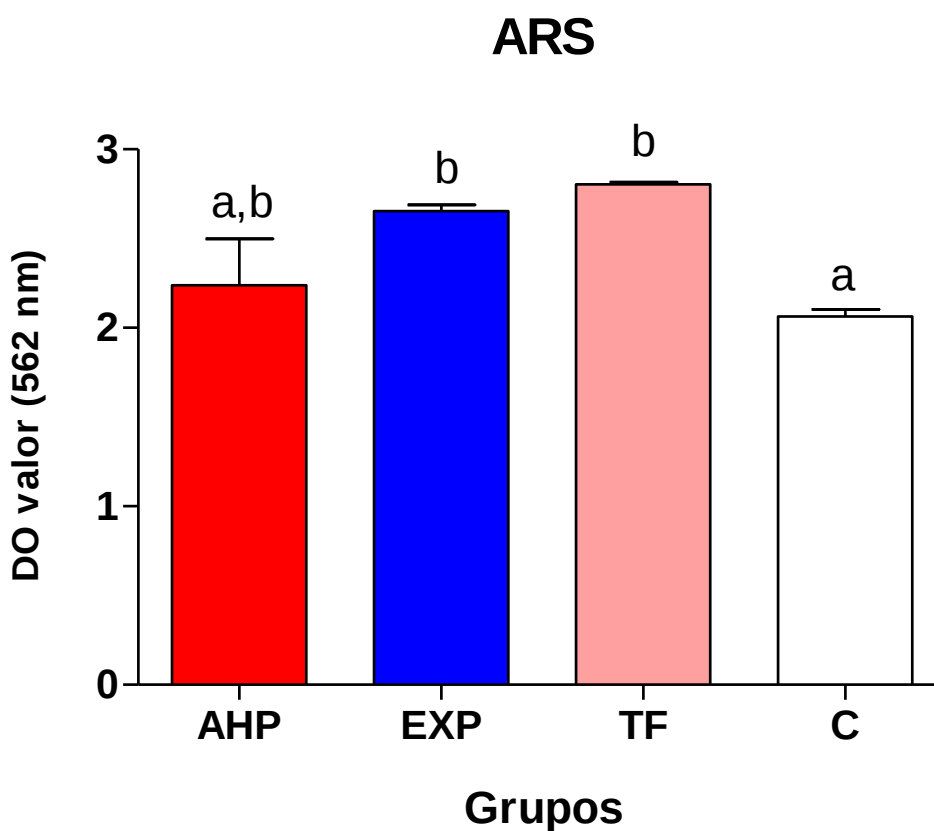


Figura 3: Coloração vermelho de Alizarina (ARS), análise estatística realizada após 21 dias de exposição dos materiais ao meio de cultura osteogênico. Todos os materiais induziram a produção de nódulos mineralizados. Barras com letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e o controle negativo. AHP, AH Plus; EXP, cimento experimental à base de silicato de cálcio (composição descrita na Tabela 1); TF, TotalFill BC Sealer; C, controle negativo.

Atividade antimicrobiana sobre células planctônicas

No ensaio contato direto sobre células planctônicas, EXP e TF promoveram maior redução de *E. faecalis* em comparação ao controle ($P < .05$), e eliminaram *C. albicans* (Tabela 3).

Tabela 2: Média e desvio padrão da atividade antimicrobiana dos materiais avaliados, expresso em UFCmL⁻¹ para o TCD sobre células planctônicas, após 1,5 h de contato.

Cimentos	AHP	TF	EXP	Controle
<i>E. faecalis</i>	7,283 (±0,229) ^a	4,226 (±0,808) ^b	4,881 (±0,668) ^b	7,668 (±0,262) ^a
<i>C. albicans</i>	2,784 (±0,443) ^b	0,0 (0,0) ^c	0,0 (0,0) ^c	5,360 (±0,443) ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos de cimentos e o controle.

Atividade antibiofilme

No ensaio contato direto modificado (TCDM) sobre biofilme de *E. faecalis*, EXP e TF apresentaram-se significativamente mais efetivos na redução de UFC quando comparados ao AHP, e ao controle ($P < .05$) (Tabela 2).

Tabela 3: Média e desvio padrão da atividade antibiofilme dos materiais avaliados, expresso em UFC mL⁻¹ para o TCDM sobre biofilme de *E. faecalis*, após 15 h de contato.

Cimentos	AHP	TF	EXP	Controle
UFC/mL	7,426(±0,100) ^a	4,966(±0,530) ^b	4,914(±0,583) ^b	7,473(±0,268) ^a

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos de cimentos e o controle.

Discussão

O cimento experimental avaliado no presente estudo (EXP) é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, além dos agentes radiopacificadores óxido de zircônio e tungstato de cálcio. O pó deste cimento foi manipulado com polietilenoglicol. Para o cimento experimental foram usados os agentes radiopacificadores óxido de zircônio (20, 21) e tungstato de cálcio (22), que proporcionam radiopacidade sem os efeitos negativos do óxido de bismuto, que inibe a proliferação celular (23). Os cimentos compostos por silicatos de cálcio como o TotalFill BC Sealer e o Endosequence BC Sealer apresentam óxido

de zircônio como agente radiopacificador. O BC Sealer apresenta propriedades físico-químicas favoráveis (24) e radiopacidade de acordo com ISO 6786/2001 (24).

Células Saos-2 são semelhantes aos osteoblastos humanos, e representam uma linhagem celular altamente diferenciada e capaz de induzir formação óssea, e por isso são amplamente utilizadas para avaliar a biocompatibilidade e o potencial de induzir mineralização de novos materiais odontológicos (4, 23).

O ensaio MTT é relacionado à atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, e o ensaio NR é baseado na absorção e acúmulo lisossômico do corante vital vermelho neutro em células com membrana intacta (25). De acordo com os resultados obtidos nos ensaios MTT e NR, em todas as diluições analisadas, os três materiais avaliados apresentaram viabilidade celular para Saos-2 semelhante ao controle negativo. BC Sealer apresenta viabilidade celular em ensaio MTT (5, 26). Cimentos à base de silicato de cálcio associados ao agente radiopacificador óxido de zircônio também demonstram biocompatibilidade (27, 28), assim como o Endosequence BC Sealer (1, 3). Os cimentos AH Plus e TotalFill BC Sealer não apresentam citotoxicidade para células do periodonto (5, 29).

A avaliação da atividade de fosfatase alcalina (ALP), que é uma enzima expressa durante o processo de maturação precoce dos osteoblastos, possibilita a determinação do potencial de indução de formação de tecido mineralizado (30). No período de três dias, todos os cimentos apresentaram atividade de fosfatase alcalina semelhante ao controle negativo. A maior atividade de fosfatase alcalina foi observada após sete dias de exposição das células Saos-2 ao extrato de AHP e EXP. A atividade de fosfatase alcalina nas células Saos-2 aumentou nos períodos de 3 e 7 dias de exposição aos extratos de cimentos de silicato de cálcio, conforme demonstrado em estudos utilizando células Saos-2 (4, 31).

O corante vermelho de alizarina identifica depósitos de cálcio em cultura celular (28). O processo de reparo está relacionado à adesão, migração e diferenciação celular e consequente formação de tecido mineralizado (4). Após 21 dias de cultura celular com os diferentes extratos de cimentos endodônticos em meio osteogênico, todos os materiais induziram deposição de cálcio. EXP e TF apresentaram resultados semelhantes entre si e maiores que o controle. Estudos anteriores constataram que cimentos à base de silicato de cálcio induzem a proliferação e

adesão celular (5), além de produção de mineralização (4, 28). O silicato tricálcico, principal componente de EXP, pode induzir a diferenciação e proliferação celular (32) justificando os resultados obtidos.

Enterococcus faecalis são bactérias Gram-positivas e anaeróbias facultativas, frequentemente associadas aos casos de lesões periapicais persistentes (15, 29). *Candida albicans*, são fungos encontrados em infecções endodônticas, e que apresentam a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários (33). Durante o tratamento endodôntico, microrganismos podem permanecer em áreas de difícil acesso, mesmo após limpeza mecânica, irrigação e uso de medicação intracanal. (17).

A atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos pode auxiliar na eliminação da infecção endodôntica residual. Os cimentos à base de silicatos de cálcio apresentam ação antimicrobiana favorecida pela sua ação alcalinizante. O elevado pH destes materiais pode ser explicado pela formação de hidróxido de cálcio e silicato de cálcio hidrogel (34). Essa contínua difusão de hidróxido de cálcio determina a manutenção do pH alcalino e atividade antibacteriana por longos períodos (17).

EXP e TF promoveram redução de UFC significativamente maior que AHP no teste de contato direto sobre biofilme de *E. faecalis*. Para o teste de contato direto sobre células planctônicas, EXP e TF não apenas promoveram maior redução de *E. faecalis* em comparação ao AHP e ao controle, como também eliminaram *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana do cimento Endosequence BC Sealer sobre biofilme de *E. faecalis* em túbulos dentinários foi demonstrada (17). O cimento iRoot, que apresenta composição semelhante ao BC Sealer e ao EXP, apresentou significativa atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans* em avaliação pelo teste de contato direto (35).

O cimento experimental à base de silicato de cálcio avaliado neste estudo, EXP, apresentou biocompatibilidade, induziu atividade de ALP em células Saos-2, induziu a formação de nódulos de mineralização por estas células, além de ter apresentado ação antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Estes resultados demonstram que o cimento EXP apresenta excelentes perspectivas para ser aplicado na clínica endodôntica na obturação do sistema de canais radiculares.

Referências

1. Willershausen I, Callaway A, Briseño B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med* 2011;7:15.
2. Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J Endod* 2015;41(9):1469-73.
3. Zhou HM, Du TF, Shen Y, Wang ZJ, Zheng YF, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod* 2015;41(1):56-61.
4. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J* 2017;50 Suppl 2: e31-e39.
5. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J* 2017;50(1):67-76.
6. Chen CC, Ho CC, David Chen CH, Ding SJ. Physicochemical properties of calcium silicate cements for endodontic treatment. *J Endod* 2009;35(9):1288-91.
7. Zhao W, Chang J, Zhai W. Self-setting properties and in vitro bioactivity of $\text{Ca}_3\text{SiO}_5/\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ composite cement. *J Biomed Mater Res A* 2008;85(2):336- 44.
8. 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.
9. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod* 2011;37(5):673-7.
10. 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: 2097-2101.

11. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Mestieri LB, Falcoski TeO, Soares CP, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of calcium silicate-based cements on an osteoblast lineage. *Braz Oral Res* 2016;30(1).
12. Athanassiadis B, Walsh LJ. Aspects of Solvent Chemistry for Calcium Hydroxide Medicaments. *Materials (Basel)* 2017;10(10).
13. Zhou Y, Hou DS, Jiang JY, She W, Yu J. Reactive molecular simulation on the calcium silicate hydrates/polyethylene glycol composites. *Chem Phys Lett* 2017;687:184-7.
14. 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.
15. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004;30(5):315-20.
16. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(1):85-94.
17. 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.
18. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, Switzerland; 2005.
19. 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.
20. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan 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.
21. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig* 2016;20(1):83-90.
22. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the

- physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012;38(3):394-7.
23. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2004;37(10):699-704.
 24. 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.
 25. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012;45(1):12-8.
 26. da Silva EJNL, Zaia AA, Peters OA. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clin Oral Investig* 2017;21(5):1531- 6.
 27. Slompo C, Peres-Buzalaf C, Gasque KC, Damante CA, Ordinola-Zapata R, Duarte MA, et al. Experimental Calcium Silicate-Based Cement with and without Zirconium Oxide Modulates Fibroblasts Viability. *Braz Dent J* 2015;26(6):587-91.
 28. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J* 2017;50(1):39-47.
 29. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent* 2017;9(4):e574-e8.
 30. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991;14(1):27-40.
 31. 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.
 32. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2011;37(9):1240-6.

33. Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84(1):68- 73.
34. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009;35(7):1051-5.
35. 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.

4 DISCUSSÃO

Para avaliação das características físico-químicas dos cimentos endodônticos à base de silicatos de cálcio, foram avaliados tempo de presa, escoamento, radiopacidade, pH e solubilidade. O cimento que apresentou melhores resultados nas avaliações de propriedades físico-químicas, ou seja, o cimento Experimental 1 (EXP1), foi submetido à avaliação de suas propriedades biológicas, biocompatibilidade e bioatividade, além das propriedades antimicrobianas. Na Publicação 2 (avaliação biológica e microbiológica), EXP1 passou a ser denominado EXP. Deste modo, a citocompatibilidade foi avaliada pelos ensaios vermelho neutro (NR) e metil tetrazólio (MTT), após exposição de Saos-2 aos extratos dos cimentos nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 por 24h. A bioatividade celular foi avaliada pela atividade de fosfatase alcalina (ALP), e o potencial de induzir mineralização foi avaliado pelo ensaio coloração vermelho de alizarina (ARS). As atividades antimicrobiana e antibiofilme dos materiais foram avaliadas pelos testes de contato direto sobre células planctônicas (TCDGP) e contato direto modificado (TCDM).

EXP2, EXP1 e TF apresentaram os maiores tempos de presa, respectivamente. O fato de EXP2 apresentar maior quantidade de líquido em sua composição, ou seja 400 µL de polietilenoglicol e 200 µL de hidrogel de quitosana, enquanto EXP1 apresenta 400 µL de polietilenoglicol, pode ter colaborado para que o mesmo apresentasse maior tempo de presa que EXP1. A presença de umidade durante o processo de hidratação do cimento de silicato de cálcio permite o início do ciclo de reação, produzindo silicato de cálcio hidrogel e hidróxido de cálcio⁴⁸. A presença de quitosana no EXP2 pode ter contribuído para maior tempo de presa, em relação ao EXP1, visto que a adição de quitosana 2% a um cimento à base de silicato de cálcio (pó composto por silicato de cálcio, fosfato dicálcico e óxido de bismuto), resultou em maior tempo de presa⁴⁹. Os resultados observados neste estudo são concordantes com estudos anteriores, que constataram um longo tempo de presa para o cimento BC sealer, mesmo em presença de umidade^{3, 41}.

Os valores de solubilidade apresentados pelos cimentos à base de silicatos de cálcio foram maiores que os apresentados por AHP. Maior percentual de perda de massa foi observado para EXP2, seguido por EXP1 e TF, respectivamente. A quantidade de veículo em EXP2 é maior que em EXP1, o que pode ter colaborado para uma maior solubilidade. Além disso, a presença da quitosana em EXP2 pode

justificar sua maior solubilidade, pois sua adição pode afetar as propriedades físicas e mecânicas do cimento⁴⁹. A solubilidade de EXP1 após 30 dias de imersão em água destilada foi menor que em 7 dias de imersão, e semelhante à de TF. Tais resultados sugerem que nesse período possa ter ocorrido estabilização e diminuição de perda de massa do material. Estudos anteriores constataram elevada solubilidade para cimentos à base de silicatos de cálcio^{32, 50, 51}. Cimentos à base de silicato de cálcio podem absorver água em excesso por serem materiais hidrofílicos, e por isso apresentar maior diferença de massa após evaporação da água³¹. Deste modo, a avaliação da alteração volumétrica, em micro-CT, pode complementar os resultados já obtidos³², visto que a absorção de fluidos pode promover estabilidade dimensional do material⁵².

Os cimentos endodônticos precisam apresentar escoamento suficiente para selar áreas de difícil acesso, como canais acessórios e áreas de ístimos², para proporcionar qualidade à obturação dos canais radiculares. Os valores de escoamento apresentados por EXP1 e EXP2 atendem as especificações da ISO 6876/2012⁵³. O cimento EXP1 apresentou valores de escoamento (mm e mm²) estatisticamente semelhantes aos apresentados por AHP, e maiores que os apresentados por EXP2. Esta propriedade pode ser melhor investigada por estudos adicionais, como avaliação de escoamento e capacidade de preenchimento por micro-CT, conforme proposto por Tanomaru-Filho et al.⁵⁴. A capacidade de escoamento e penetrabilidade nos túbulos dentinários são importantes propriedades dos materiais obturadores. Assim, a penetrabilidade do cimento obturador pode ser investigada a partir de avaliação em microscópios de fluorescência e confocal de varredura a laser.

A radiopacidade apresentada pelos cimentos experimentais está acima dos 3 mmAl, conforme recomendações da ISO 6876⁵³. EXP1 apresentou radiopacidade semelhante à apresentada por TF, e maior que EXP2. Estudos anteriores constataram que os agentes radiopacificadores óxido de zircônio^{55, 56} e tungstato de cálcio³¹ proporcionam radiopacidade satisfatória.

Há indícios de que o pH alcalino, assim como a liberação de íons cálcio, podem estar relacionados à bioatividade e a indução de mineralização^{57, 58}, além do mais, a alcalinização do meio, proporciona um ambiente desfavorável à sobrevivência e proliferação bacteriana⁵⁹. Os cimentos EXP1 e EXP2 promoveram pH alcalino em

todos os períodos experimentais. Estudo sobre a liberação de íons cálcio podem complementar os resultados obtidos com análise do pH dos materiais.

Os resultados obtidos nos ensaios MTT e NR apontam que os cimentos compostos por silicatos de cálcio, EXP e TF, apresentam citocompatibilidade para Saos-2. Estudos anteriores demonstraram que o BC Sealer apresentou biocompatibilidade com células L929⁶⁰, e células do periodonto^{11, 38, 40, 61}.

Com a realização do ensaio ALP observamos que a maior atividade de fosfatase alcalina ocorreu após sete dias de exposição das células Saos-2 ao extrato de AHP, assim como ao extrato de EXP. Nos períodos de 3 e 7 dias de exposição ao extrato do cimento EXP houve aumento da atividade de fosfatase alcalina nas células Saos-2, assim como constatado em estudos anteriores em avaliação de cimentos à base de silicato de cálcio^{62, 63}. No ensaio ARS observou-se que EXP e TF induziram a formação de nódulos mineralizados, conforme estudos anteriores que obtiveram resultados semelhantes com cimentos à base de silicato de cálcio^{62, 64}. Estes resultados são concordantes com estudo anterior, no qual observou-se que o TotalFill BC Sealer demonstra potencial de induzir reparo, visto que estimula a proliferação e adesão celular³⁸. O estudo da bioatividade pode ser complementado por avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estudos in vivo poderão complementar os resultados obtidos em estudos in vitro, avaliando o comportamento biológico e potencial de formação de tecido mineralizado do material experimental.

EXP e TF promoveram redução de UFC significativamente maior que AHP, em avaliação pelo teste de contato direto sobre biofilme de *E. faecalis*. No ensaio contato direto sobre células planctônicas, EXP e TF foram responsáveis pela eliminação de *C. albicans*, e por maior redução de *E. faecalis* em comparação ao controle. Podemos afirmar que *E. faecalis* apresentaram maior resistência, assim como estudos anteriores¹⁹. Estudo anterior²⁶ constatou que o cimento BC sealer apresentou considerável ação antibacteriana sobre biofilme de *E. faecalis*. Em avaliação pelo teste de contato direto, o cimento iRoot, cuja composição é semelhante ao BC Sealer e ao EXP, apresentou significativa atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans*⁶⁵.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o cimento Experimental 1 apresentou características físico-químicas, biológicas e antimicrobianas satisfatórias. Estudos futuros poderão colaborar para melhor

compreensão de suas propriedades, assim como aperfeiçoamento das mesmas, contribuindo para sua indicação clínica no tratamento endodôntico.

5 CONCLUSÃO

Os cimentos EXP1 e EXP2 apresentam pH alcalino em todos os períodos experimentais, além de tempo de presa, radiopacidade e escoamento de acordo com a ISO 6876. No entanto, EXP1 apresentou melhores resultados quanto ao tempo de presa, radiopacidade, escoamento e solubilidade que EXP2, o que o confere maior potencial para aplicabilidade clínica.

O cimento EXP1 apresenta citocompatibilidade, bioatividade celular, potencial de induzir mineralização, além de atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans*.

Portanto, EXP1 apresenta propriedades físico-químicas, biológicas e atividades antimicrobiana e antibiofilme, proporcionando-lhe potencial para aplicabilidade clínica na obturação do sistema canais radiculares.

REFERÊNCIAS*

1. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018; 51(2): 177-205.
2. 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.
3. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod*. 2011; 37(5): 673-7.
4. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater*. 2011; 27(8): 836-44.
5. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent*. 2008; 11(4): 141-3.
6. 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.
7. Chen CC, Ho CC, David Chen CH, Ding SJ. Physicochemical properties of calcium silicate cements for endodontic treatment. *J Endod*. 2009; 35(9): 1288-91.
8. Wang X, Sun H, Chang J. Characterization of Ca₃SiO₅/CaCl₂ composite cement for dental application. *Dent Mater*. 2008; 24(1): 74-82.
9. Zhao W, Chang J, Zhai W. Self-setting properties and in vitro bioactivity of Ca₃SiO₅/CaSO₄.1/2H₂O composite cement. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 85(2): 336-44.
10. 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.
11. Zhou HM, Du TF, Shen Y, Wang ZJ, Zheng YF, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod*. 2015; 41(1): 56-61.
12. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater*. 2015; 31(4): 351-70.
13. Camões IC, Salles MR, Chevitarese O, Gomes LN. Diffusion of Ca(OH)₂ associated with different vehicles: chromatographic study (high-performance liquid chromatography). *J Endod*. 2004; 30(1): 30-4.

* 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. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005; 26(30): 5983-90.
15. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Shrestha A, Bramante CM. Antibacterial properties associated with chitosan nanoparticle treatment on root dentin and 2 types of endodontic sealers. *J Endod*. 2015; 41(8): 1353-8.
16. 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.
17. Poggio C, Trovati F, Ceci M, Colombo M, Pietrocola G. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. *J Clin Exp Dent*. 2017; 9(6): e743-e8.
18. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004; 30(5): 315-20.
19. Siqueira JF, Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod*. 2000; 26(5): 274-7.
20. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001; 34(5): 399-405.
21. 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.
22. AlShwaimi E, Bogari D, Ajaj R, Al-Shahrani S, Almas K, Majeed A. In Vitro Antimicrobial effectiveness of root canal sealers against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *J Endod*. 2016; 42(11): 1588-97.
23. Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997; 84(1): 68-73.
24. Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Chowdary CD. Presence of *Candida albicans* in root canals of teeth with apical periodontitis and evaluation of their possible role in failure of endodontic treatment. *J Int Oral Health*. 2015; 7(2): 42-5.
25. 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.
26. 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.
27. Camilleri J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod*. 2015; 41(7): 1139-45.

28. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2004; 37(10): 699-704.
29. Grazziotin-Soares R, Nekoofar MH, Davies TE, Bafail A, Alhaddar E, Hübler R, et al. Effect of bismuth oxide on white mineral trioxide aggregate: chemical characterization and physical properties. *Int Endod J*. 2014; 47(6): 520-33.
30. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod*. 2007; 33(3): 295-8.
31. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012; 38(3): 394-7.
32. 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.
33. 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.
34. Hegde V, Arora S. Sealing ability of three hydrophilic single-cone obturation systems: An in vitro glucose leakage study. *Contemp Clin Dent*. 2015;6 (Suppl 1):S86-9.
35. Topçuoğlu HS, Tuncay Ö, Karataş E, Arslan H, Yeter K. In vitro fracture resistance of roots obturated with epoxy resin-based, mineral trioxide aggregate-based, and bioceramic root canal sealers. *J Endod*. 2013; 39(12): 1630-3.
36. Hegde V, Arora S. Fracture resistance of roots obturated with novel hydrophilic obturation systems. *J Conserv Dent*. 2015; 18(3): 261-4.
37. Celikten B, Uzuntas CF, Gulsahi K. Resistance to fracture of dental roots obturated with different materials. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 591031.
38. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J*. 2017; 50(1): 67-76.
39. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod*. 2013; 39(10): 1281-6.
40. Willershausen I, Callaway A, Briseño B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med*. 2011; 7: 15.

41. 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(1): 111-24.
42. McMichen FR, Pearson G, Rahbaran S, Gulabivala K. A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. *Int Endod J.* 2003; 36(9): 629-35.
43. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Radiopacity of root filling materials using digital radiography. *Int Endod J.* 2007; 40(7): 514-20.
44. Katz A, Kaffe I, Littner M, Tagger M, Tamse A. Densitometric measurement of radiopacity of Gutta-percha cones and root dentin. *J Endod.* 1990; 16(5): 211-3.
45. Al-Awadhi S, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endod.* 2004; 30(7): 527-33.
46. Bratel J, Jontell M, Dahlgren U, Bergenholtz G. Effects of root canal sealers on immunocompetent cells in vitro and in vivo. *Int Endod J.* 1998; 31(3): 178-88.
47. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009; 35(7): 1051-5.
48. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007; 40(6): 462-70.
49. Panahi F, Rabiee SM, Shidpour R. Synergic effect of chitosan and dicalcium phosphate on tricalcium silicate-based nanocomposite for root-end dental application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 80: 631-41.
50. 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.
51. Gandolfi MG, Spagnuolo G, Siboni F, Procino A, Riveccio V, Pelliccioni GA, et al. Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(8): 2075-89.
52. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, Belladonna FG, De-Deus GA, Lima IC, et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J.* 2017; 50(4): 407-14.
53. International Organization for Standardization. ISO 6876: dentistry — root canal sealing materials. London:ISO; 2012.
54. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, Bonetti-Filho I, Guerreiro-Tanomaru JM. A Novel model for evaluating the flow of endodontic materials using micro-computed tomography. *J Endod.* 2017; 43(5): 796-800.

55. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan 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.
56. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(1): 83-90.
57. 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.
58. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J.* 2010; 43(10): 917-29.
59. 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.
60. Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 657-61.
61. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(4): e574-e8.
62. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J.* 2017; 50 Suppl 2: e31-e9.
63. 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.
64. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2017; 50(1): 39-47.
65. 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.
66. 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.
67. Marciano MA, Guimarães BM, Amoroso-Silva P, Camilleri J, Hungaro Duarte MA. Physical and chemical properties and subcutaneous implantation of mineral trioxide aggregate mixed with propylene glycol. *J Endod.* 2016; 42(3): 474-9.

68. 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.
69. 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.
70. International Organization for Standardization. ISO 10993-5 : biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva:ISO; 2005.
71. 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.
72. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1981; 27(3): 493-501.

APÊNDICE A – Metodologia detalhada correspondente à Publicação 1

A 1 Tempo de presa

O tempo de presa (Figura A 1) foi avaliado com base na norma ISO 6876⁵³. Para os cimentos à base de silicatos de cálcio (TotalFill BC Sealer, Experimental 1 e Experimental 2), que necessitam de umidade para tomar presa, foram confeccionados moldes de gesso especial tipo IV – micro-granulado (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura. Os moldes de gesso foram mantidos em água destilada por 24 horas antes do preparo dos corpos de prova dos materiais (n=6). Para o cimento à base de resina (AH Plus), que não depende de umidade para tomar presa, foram utilizados anéis metálicos com diâmetro interno de 10 mm e altura de 1 mm, para confecção dos corpos de prova (n=6). Logo após manipulação, os cimentos foram inseridos nos respectivos moldes, e mantidos em estufa à 37 °C e 95% de umidade, durante o período de avaliação. Foi utilizada agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm apoiada sobre a superfície de cada um dos cimentos. O tempo de presa foi determinado como o período, em minutos, entre a manipulação e o momento em que a agulha já não produzisse marcas sobre a superfície dos cimentos.

Figura A 1 – Representação do teste de avaliação do tempo de presa



Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 2 Radiopacidade

A radiopacidade dos cimentos (Figura A 2) foi avaliada com base na ISO 6876⁵³. Os materiais foram manipulados e inseridos em moldes de silicone com diâmetro interno de 10 mm e altura de 1 mm (n=5), e mantidos em estufa (37 °C,

95% de umidade) por 48 horas. Após a presa dos materiais, um disco de cada um deles e uma escala (milimetrada) de alumínio foram colocados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY). A tomada radiográfica foi realizada com o aparelho de raios - X Focus (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland), a 60 kV, 7 mA, 18 pulsos/s e 30 cm de distância focal. Os filmes foram processados, e após a secagem dos mesmos, as imagens foram digitalizadas e avaliadas por meio do programa Image J. Áreas de cada um dos degraus da escala milimetrada de Alumínio foram analisadas para determinação da radiopacidade dos cimentos equivalente em milímetros de alumínio. A conversão, dos valores obtidos, foi realizada por meio da equação de conversão abaixo, conforme descrito por Húngaro-Duarte et al.⁵⁵:

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

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 2 – Representação do teste de avaliação da radiopacidade dos cimentos endodônticos.



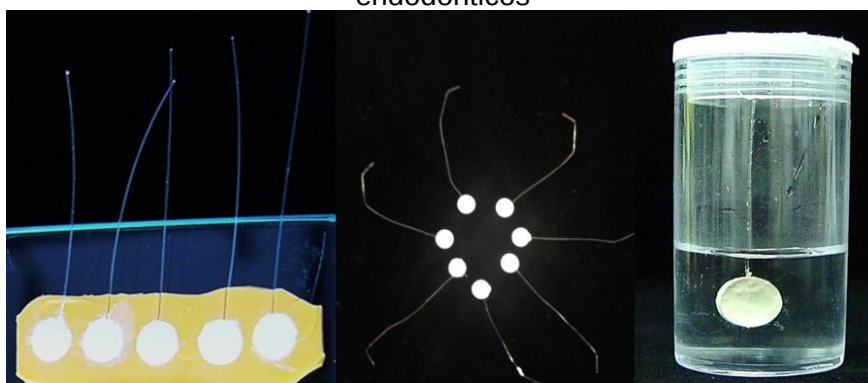
Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 3 Solubilidade

A solubilidade (Figura A 3) foi avaliada segundo Carvalho-Junior et al.⁶⁶. A partir de moldes de silicone, foram confeccionados corpos de prova com 7,75 mm de diâmetro interno e 1,5 mm de altura, de cada um dos materiais avaliados (n=5). Os

moldes de silicone foram acomodados sobre uma placa de vidro coberta por uma película de papel celofane. Um fio de nylon impermeável foi colocado no interior de cada um dos espécimes. Outra placa de vidro, também coberta com uma película de celofane, foi colocada sobre o molde e pressionada manualmente. TF, EXP1 e EXP2, que necessitam de umidade para presa, foram acomodadas gazes umedecidas (em água destilada) entre os moldes e as placas de vidro³². 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 do material. Após a presa dos materiais, os corpos de prova foram colocados em dessecador a vácuo até a estabilização da massa inicial, aproximadamente 7 dias. As mensurações das massas foram realizadas em balança de precisão (Analítica Adventurer, Modelo AR2140, Ohaus - Indústria de balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) a cada 24 horas. Após a estabilização da massa inicial, os espécimes foram suspensos, por meio da fixação dos fios de nylon, no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 7,5 ml de água destilada e deionizada. Os recipientes permaneceram em estufa a 37 °C pelos períodos experimentais de 7 e 30 dias. Decorridos os períodos experimentais, os corpos de prova foram removidos da água destilada, lavados, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até a estabilidade da massa final (aproximadamente 7 dias). As pesagens foram realizadas três vezes para cada espécime em balança de precisão, a cada 24 horas. A solubilidade (S) dos cimentos avaliados correspondeu à perda de massa de cada espécime [massa inicial (MI) menos massa final (MF)], expressa em porcentagem⁶⁷, que foi calculada através da seguinte fórmula: $S = (MI - MF) / MI \times 100$, conforme descrito por Lim et al.⁶⁸.

Figura A 3 – Representação do teste de avaliação da solubilidade dos cimentos endodônticos

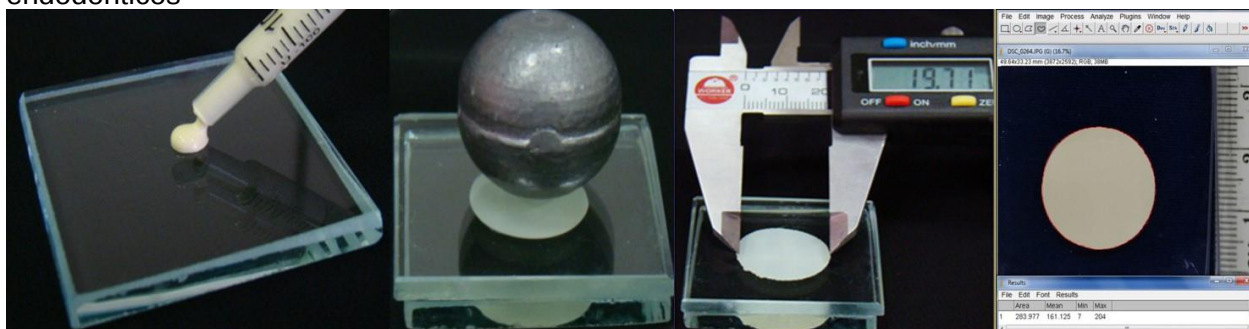


Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 4 Escoamento

O teste de escoamento (Figura A 4) foi realizado com base na norma ISO 6876⁴⁹. Após a manipulação dos materiais, com auxílio de uma seringa, 0,05 mL de cada um dos materiais foi colocado sobre uma placa de vidro (n=10). Na sequência, outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o cimento, e sobre esta placa 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. Na segunda, um método adicional foi usado no qual os corpos de prova foram fotografados, e as imagens obtidas foram digitalizadas para a mensuração da área de escoamento em mm² por meio do programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00, como descrito por Tanomaru-Filho et al.⁶⁹.

Figura A 4 - Representação do teste de avaliação do escoamento dos cimentos endodônticos



Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 5 pH

A análise de pH (Figura A 5) foi realizada utilizando tubos de polietileno, com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro, preenchidos com cada um dos materiais avaliados (n=10). Em seguida cada tubo foi inserido em um frasco contendo 10 ml de água destilada e deionizada, sendo que o conjunto frasco + tubo contendo cimento foi mantido em estufa durante os períodos experimentais. Os períodos experimentais foram de 3 e 12 horas, 1, 7, 14 e 21 dias. A cada período, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco com 10 ml de água destilada e deionizada. Como controle utilizou-se água destilada e

deionizada, que foi acondicionada em frascos pelos respectivos períodos experimentais ($n=10$). O pH das soluções foi medido imediatamente após o término de cada período experimental com um pHmetro Digimed (São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado, tendo sido realizadas três aferições para cada espécime.

Figura A 5 - Representação do teste de avaliação do pH dos cimentos endodônticos



Fonte: Arquivo pessoal do autor

APÊNDICE B – Metodologia detalhada correspondente à Publicação 2

B 1 Avaliação de citotoxicidade e bioatividade

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

B 1.1 *Preparo dos extratos*

Os cimentos experimentais foram manipulados em uma placa de vidro estéril. Na sequência, 0,5 g de cada um dos cimentos avaliados foi colocado no fundo de poços vazios de placas de cultura de 12 poços (314.0 mm² área e 3.0 mm altura) (Jet Biofil). As placas permaneceram em estufa a 37 °C, 95% de umidade, 5% CO₂, por 24 h, até a completa presa dos materiais. Após este período, as placas foram expostas a luz UV para prevenir contaminação⁶⁶. Em seguida, colocou-se 5 mL de meio de cultura de DMEM sem soro em cada um dos poços das placas em que os materiais foram acomodados e mantidos durante 24 h (37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂) para criar o extrato de cada um dos materiais avaliados (ISO 10993-5 2005)⁷⁰ (Figura B 1).

Figura B 1 - Preparo dos extratos dos materiais experimentais.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

B 1.2 *Cultura celular*

Células Saos-2 (ATCC HTB-85), que são células semelhantes a osteoblastos humanos, 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 lg/mL), e foram mantidos em 95% de umidade, 5% CO₂ e 37 °C até a confluência. As células aderentes em fase de crescimento logarítmico foram

detectadas pela mistura de tripsina/ácido etilenodiaminotetracético (0,25%) (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 3 minutos.

B 1.3 *Ensaio de viabilidade celular*

A viabilidade celular foi avaliada por meio dos testes 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-brometo de difenil-tetrazólio (MTT) e vermelho neutro (NR). Para a realização destes ensaios, 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 para obter células aderentes antes da exposição aos materiais. As células foram expostas aos extratos dos cimentos nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, assim como ao controle negativo, meio DMEM sem soro, e ao controle positivo, DMSO 20%⁷¹, por 24 horas.

O ensaio MTT baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-brometo de difenil-tetrazólio) de cor amarela, solúvel em água (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO), em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional ao número de células vivas. O ensaio MTT (Figura B 2) foi realizado em dois momentos distintos, simultaneamente ao ensaio NR após exposição das células Saos-2 aos extratos dos cimentos nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 por 24 horas, e simultaneamente ao ensaio ALP após exposição de Saos-2 aos extratos dos cimentos na diluição 1:8 pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. Após cada período experimental, o meio foi trocado por 100 µL 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, lavou-se cada um dos poços com PBS 1X (tampão fosfato) e adicionou-se 100 µL de isopropanol acidificado 0,04 N (Sigma-Aldrich) para solubilizar o formazan. A densidade óptica de (OD) 570 nm foi medida num espectrofotômetro (Elx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3).

Figura B 2 - Representação do Ensaio MTT

Frasco e pó do MTT (Sigma); Placa do ensaio MTT após leitura em espectrofotômetro.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Vermelho neutro (NR) é um corante vital que é incorporado por endocitose e se acumula nos lisossomos das células que possuem membrana intacta. Para o ensaio NR (Figura B 3), as células permaneceram em contato com os extratos dos cimentos nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 por 24 horas. Após este período, os mesmos foram substituídos por 0.1mL 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. O corante foi então removido e o produto colorimétrico foi solubilizado em 100 μL de etanol a 50% e solução de ácido acético a 1% (Sigma-Aldrich). A densidade ótica foi mensurada em espectrofotômetro a 570 nm (Elx800). Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3).

Figura B 3 - Representação do Ensaio NR

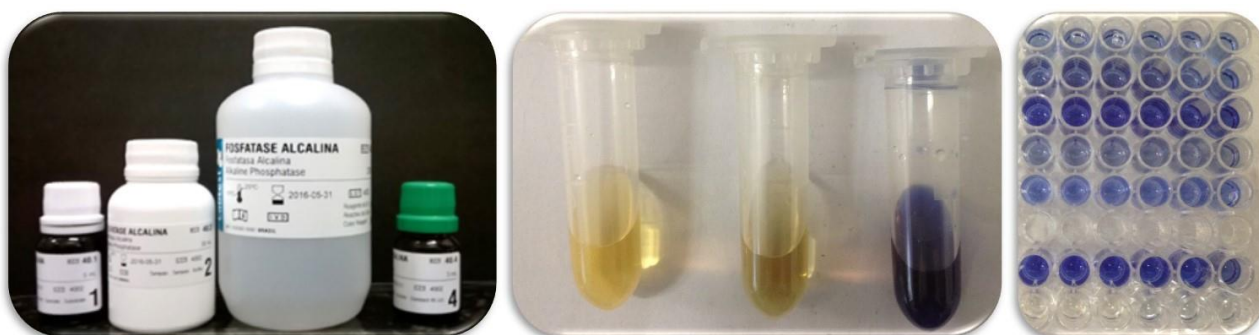
Frasco do pó de Neutral Red (Sigma-Aldrich); Placa do ensaio NR após leitura em espectrofotômetro.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

B 1.4 Atividade de fosfatase alcalina

O princípio deste método é a hidrólise do monofosfato de timolftaleína pela fosfatase alcalina produzida pelas células, que libera a cor azul da timolftaleína em meio alcalino. A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi determinada usando o kit comercial Labtest (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) (Figura B 4). Após 24 horas do plaqueamento (1×10^5 células/mL em placas de 96 poços), células Saos-2 foram expostas aos extratos dos materiais, na diluição 1:8, pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. Os extratos dos cimentos foram renovados a cada dois dias durante o período de exposição das amostras. Após cada período experimental, os extratos foram removidos e as células lavadas com 200 μ L de PBS 1X, em seguida 200 μ L de uma solução de lauril sulfato de sódio (1% em água destilada, Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada poço. As amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos. Cada uma das amostras foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburg, Germany) contendo o substrato e o tampão. Em seguida as amostras (100 μ L) foram incubadas com 500 μ L de reagente de cor. A densidade ótica foi avaliada em espectrofotômetro (ELx800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) a 590 nm. Sextuplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido três vezes independentemente (n=3). Os dados foram expressos como a atividade de ALP normalizada pelo número de células viáveis detectadas no ensaio de MTT no respectivo período de cultura⁷².

Figura B 4 – Representação do Ensaio ALP



Kit Labtest (Labtest); Microtubos contendo as amostras com Branco, Padrão e Reagente de cor; Placa ensaio ALP após leitura em espectrofotômetro.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

B 1.5 Coloração Vermelho de Alizarina

O vermelho de alizarina é um derivado de antraquinona, e pode ser usado para identificar o depósito de cálcio em cultura de células. Através de um processo de quelação, o cálcio forma um complexo de alizarina S vermelho. Com o objetivo de avaliar a quantidade de cálcio depositado pelos diferentes materiais, células osteoblásticas Saos-2 foram contadas e plaqueadas (1×10^4 células/mL) em placas de cultura de 24 poços em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Durante 21 dias o meio de cultura osteogênico DMEM (DMEM 10% SFB, 100 IU/mL penicillina, 100 mg/mL estreptomicina, 0.023 g/mL β -glycerolfosfatase, 0.055 mg/mL ácido ascórbico - Sigma Chemicals St Louis) com e sem os extratos dos cimentos foi renovado a cada 2 dias. Após este período, o meio foi então aspirado, e as placas lavadas com PBS e as células fixadas com etanol 70% a 4 °C por 1 hora. Na sequência foi realizada a lavagem com água destilada (duas vezes) e a adição de 0,3 mL 40 mM AlizarinRed S (2%- pH 4.1). Em seguida as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos, e realizada a aspiração do corante, e lavagem dos poços por 4 vezes com 1 mL de água destilada/poço. As placas permaneceram anguladas durante 2 minutos, para facilitar a remoção do excesso de água. A mineralização foi quantificada através da dissolução dos nódulos com 500 μ L da solução de 10% de cloreto de cetilpiridínio (Sigma/Aldrich) por poço e, incubada por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Três alíquotas de 100 μ L da ressuspensão de cada poço foram transferidas para uma placa de 96 poços, e realizada a leitura em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda.

B 2 Avaliação das propriedades antimicrobianas

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).

B 2.1 Teste de contato direto sobre células planctônicas

Após a manipulação, cada um dos materiais foi inserido de forma padronizada na parede lateral dos poços (n=8) de uma placa de cultura de 96 poços. Foi utilizada

uma placa para cada cepa microbiana (*E. faecalis* e *C. albicans*). Após 24 horas de presa em estufa a 37 °C, 10 µL de cada inóculo foi depositado sobre os cimentos. No grupo controle positivo foi adicionado somente o inóculo em cada um dos poços. As placas permaneceram em estufa a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. Na sequência, 250 µL de TSb (*Tryptic soy broth*) foram adicionados em cada um dos poços contaminados com *E. faecalis*, e 250 µL de SDb (*Sabouraud Dextrose broth*) nos poços contaminados por *C. albicans*. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e a semeadura (Figura B 6). Foram distribuídas três alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições em placas de Petri contendo TSa (*Tryptic soy agar*) e SDa (*Sabouraud Dextrose agar*), respectivamente. Após 48 horas de incubação das placas em estufa a 37 °C, foi realizada contagem de UFC mL⁻¹ e transformação logarítmica (log₁₀). O experimento foi repetido duas vezes independentemente.

Figura B 6 – Representação do Teste de contato direto sobre células planctônicas



Placa de cultura de 96 poços, contendo os materiais nas paredes laterais dos poços; Deposição de três alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições em placas de Petri, após diluição decimal seriada.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

B 2.2 Atividade antibiofilme: teste de contato direto modificado (TCDM)

Após aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia de Araraquara (03/2017), incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas foram usados para obtenção do substrato para a formação do biofilme. As raízes foram seccionadas em 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 máquina de corte de precisão (Isomet 1000 – Buehler,

Lake Bluff, IL, EUA). Os blocos foram colocados em tubo de ensaio contendo água destilada e esterilizados a 120 °C por 20 min.

Para a formação do biofilme de *E. faecalis*, os microrganismos foram reativados em 4,0 mL de meio TSb estéril (*Tryptic soy broth*, Difco Detroit, MI, EUA) e mantidos em estufa a 37 °C *overnight*. Os inóculos foram ajustados na concentração 1×10^8 UFC mL⁻¹, utilizando espectrofotômetro (600 Plus, Femto, SP).

Em placa de cultura celular de 24 poços foram dispensados 2,0 mL de meio TSb puro contendo 1% do inóculo, deixando os blocos de dentina totalmente submersos. As placas foram incubadas 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 TSb de cada espécime foi totalmente trocado a cada 48 horas, sem a adição de novos microrganismos.

Os materiais foram manipulados e inseridos em moldes de silicone medindo 7 mm de diâmetro x 1 mm de espessura interna, mantidos em estufa a 37 °C e umidade controlada, durante 48 horas.

Transcorrido o período pós-manipulação, os discos de cimento 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 (n=6) com os discos de cimentos foram colocados em Placas de Petri. Sobre cada conjunto foi gotejado 20 µL de solução salina estéril para evitar o ressecamento dos mesmos. O tempo de contato foi de 15 h, e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C. Um grupo controle foi incluído, no qual os biofilmes entraram em contato com um disco de teflon, servindo de comparação para os resultados (Figura B 5).

Decorrido o período de contato, os discos de cimentos e de teflon foram removidos e os blocos de dentina com 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, com a finalidade de permitir a suspensão dos microrganismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e plaqueamento. Três alíquotas de 20 µL de cada uma das

suspensões foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSa). As placas permaneceram 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 entre os discos de cimentos obturadores e o biofilme desenvolvido nos blocos de dentina. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica (log₁₀) e o resultado de cada grupo foi calculado a partir da média dos seus espécimes.

Figura B 5 – Representação do Teste de contato direto modificado



Placa de 24 poços contendo os blocos de dentina bovina e o inóculo; Placa de 24 poços contendo os blocos de dentina bovina, inóculo e meio de cultura TSb; Incubadora de bancada com agitação orbital.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Número de protocolo: 03/2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS À BASE DE SILICATOS DE CÁLCIO"***, registrada com o nº 03/2017, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Juliane Maria Guerreiro Tanomaru** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 27/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Maio/2018
Espécie/linhagem	Gado Nelore
Nº de animais	45 dentes
Peso/Idade	250 kg/ 5 anos
Sexo	-
Origem	Mondelli Indústria de Alimentos S/A.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
 Coordenadora da CEUA

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 23 de março de 2020.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de março de 2018.

Cristiane Lopes Zordan Bronzel