



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



Anahi de Paula Melo

**Propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de cimentos
biocerâmicos associados ao Thyme Essencial Oil**

Araraquara

2022



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



Anahi de Paula Melo

**Propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de cimentos
biocerâmicos associados ao Thyme Essencial Oil**

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

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

Araraquara

2022

D278p	De, Anahi Propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de cimentos biocerâmicos associados ao Thyme Essencial Oil / Anahi De. -- Araraquara, 2022 61 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru 1. Materiais Restauradores do Canal Radicular. 2. Microtomografia por Raio-X. 3. Calcarea Silicata. 4. Óleos Voláteis. 5. Anti-infecciosos. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Anahi de Paula Melo

**Propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de cimentos
biocerâmicos associados ao Thyme Essencial Oil**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru

2º Examinadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Bosso Martelo

3º Examinador: Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Araraquara, 28 de março de 2022.

//DADOS CURRICULARES

Anahi de Paula Melo

NASCIMENTO	16/06/1993 – Uberlândia – Minas Gerais
FILIAÇÃO	Helton de Paula Melo Liliane Conceição de Melo
2015-2019	Graduação em Odontologia Universidade Federal de Uberlândia - UFU
2020-2022	Mestrado em Odontologia – Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2021-2023	Especialização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

A Deus,

Por minha vida, pela família, amigos e pessoas que colocou em meu caminho para me guiar e acompanhar. Por ter sempre me colocado nos lugares certos na hora certa, mostrando que seus planos são muito melhores do que eu poderia imaginar. Por me abençoar sempre, me dando forças para seguir e realizar minhas conquistas.

A minha mãe,

Por quem eu tenho profunda admiração. É para mim um exemplo de vida e de ser humano, que com todas as dificuldades que a vida lhe ofereceu fez o possível e o impossível para que eu estivesse aqui hoje. Eu não conheço palavras capazes de expressar a minha gratidão por tudo que fez e faz por mim, por sempre sonhar os meus sonhos comigo e fazer de tudo para que se tornem realidade. Este trabalho com toda certeza do mundo também é seu! Te amo sem medida.

Ao Alao,

Por estar sempre ao meu lado me incentivando e aplaudindo as minhas vitórias. Por me fazer sentir amada como filha e não medir esforços para me auxiliar em tudo que é preciso sempre. Só tenho a agradecer por ser muito mais que meu pai de coração.

Aos meu irmãos,

Por todo amor dedicado a mim. Por entenderem meus momentos de ausência e vibrarem junto comigo em todas as etapas vencidas da vida. Por deixarem os meus dias mais leves quando nos reunimos, sempre me dando apoio e forças para seguir em frente.

Ao Paulo,

Meu parceiro de todos os momentos. Pelo incentivo e apoio incondicional, por me acalmar nos momentos mais difíceis e me fazer acreditar que sou capaz. Por enfrentar junto comigo todo esse ciclo que se encerra. Por me ensinar todos os dias sobre o amor por cuidar do próximo. Eu amo você!

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu amigo Danilo, que me acompanha desde a graduação, com quem eu venho dividindo diversos momentos da minha vida a 7 anos. Só tenho a agradecer pela convivência harmoniosa durante a nossa estadia em Araraquara. Pelo suporte diário, que com certeza foi extremamante importante para que eu suportasse a distância de casa.

Aos amigos que o mestrado me deu, Larissa e Lucas, só tenho a agradecer por todos os momentos que vivemos juntos. Vocês deixaram meus dias mais leves e felizes durante a minha passagem por Araraquara. Com toda certeza vocês foram muito importantes para que eu conseguisse superar a saudade de casa. Eu levarei vocês para toda a minha vida.

Aos meus outros colegas de pós, só tenho a agradecer pela convivência e pela nossa união. Embora tenhamos passado por um momento atípico de pandemia pudemos nos aproximar e estávamos sempre nos auxiliamos no que podíamos.

Aos colegas do pós-doutorado e doutorado que estiveram me auxiliando durante todo o meu mestrado (Giselle, Fernanda, Jáder, Karina e Airton) só tenho agradecer por todo conhecimento compartilhado, todas as discussões sobre o trabalho e amparo durante todas as etapas.

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

Melo AP. Propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de cimentos biocerâmicos associados ao Thyme Essencial Oil [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Cimentos biocerâmicos reparadores e endodônticos com atividade antimicrobiana podem contribuir para o controle da infecção. O óleo essencial de tomilho, ou *Thyme Essential Oil* (TEO), é um extrato natural com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. **Objetivo:** Avaliar cimentos biocerâmicos reparadores e endodônticos associados ou não ao TEO. **Publicação 1:** Visa avaliar propriedades físico-químicas e antimicrobianas dos cimentos biocerâmicos reparadores pronto para uso Bio-C Repair (BCR, Angelus, Brasil) e pó/líquido NeoMTA 2 (NMTA2, Nusmile, EUA) e das suas associações ao TEO. **Publicação 2:** Visa avaliar propriedades físico-químicas e antimicrobianas dos cimentos endodônticos biocerâmicos pronto para uso Bio-C Sealer (BCS) e pó/líquido BioRoot RCS (BR) e das suas associações ao TEO. **Metodologia:** Tempo de presa foi avaliado de acordo com a ISO 6876:2012. O pH foi avaliado após imersão dos materiais em água destilada nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Alteração volumétrica foi avaliada utilizando microtomografia computadorizada (micro-CT). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (TCDM) sobre biofilmes de *E. faecalis* formados sobre discos de hidroxiapatita. Os resultados foram submetidos a testes de normalidade seguido de ANOVA e Tukey ($p < 0.05$). **Publicação 1 – Resultados:** TEO não interferiu no tempo de presa, pH e alteração volumétrica dos cimentos ($p > 0,05$). Todos os materiais mostraram capacidade de alcalinização em relação ao controle ($p < 0.05$). BCR/TEO e NMTA2/TEO apresentaram melhor atividade antimicrobiana que BCR e NMTA2 contra *E. faecalis* ($p < 0.05$). **Conclusão:** A adição de *Thyme Essential Oil* melhorou significativamente a atividade antimicrobiana dos cimentos potencializando a atividade antimicrobiana sem modificar propriedades físico-químicas. **Publicação 2 – Resultados:** TEO não alterou o tempo de presa dos cimentos ($p > 0,05$). Todos os materiais mostraram capacidade de alcalinização nos períodos avaliados em relação ao controle ($p < 0.05$). BR/TEO mostrou menor alteração volumétrica que BR ($p < 0.05$). BCS/TEO e BR/TEO foram mais efetivos que BCS e BR sobre biofilme de *E. faecalis*. **Conclusão:** A associação de *Thyme Essential Oil* aos materiais aumentou a efetividade dos materiais sobre biofilme de *E. faecalis*, representando uma alternativa para aumentar o potencial antimicrobiano.

Palavras chave: Materiais Restauradores do Canal Radicular. Microtomografia por Raio-X. Calcareia Silicata. Óleos Voláteis. Anti-infecciosos.

Melo AP. Physicochemical properties and antimicrobial activity of bioceramic cements associated with Thyme Essential Oil [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Restorative and endodontic bioceramic cements with antimicrobial activity can contribute to infection control. Thyme essential oil, or Thyme Essential Oil (TEO), is a natural extract with antimicrobial and anti-inflammatory properties. **Objective:** To evaluate repairing and endodontic bioceramic cements associated or not with TEO. **Publication 1:** Aims to evaluate physicochemical and antimicrobial properties of Bio-C Repair (BCR) and powder/liquid NeoMTA 2 (NMTA2) ready-to-use bioceramic repair cements and their associations with TEO. **Publication 2:** Aims to evaluate physicochemical and antimicrobial properties of Bio-C Sealer ready-to-use endodontic cements (BCS) and BioRoot RCS powder/liquid (BRT) and their associations with TEO. **Methodology:** Setting time was evaluated according to ISO 6876:2012. The pH was evaluated after immersion of the materials in distilled water in the periods of 1, 3, 7, 14 and 21 days. Volumetric change was assessed using micro-computed tomography (micro-CT). Antimicrobial activity was evaluated by the modified direct contact test (MDCT) on *E. faecalis* biofilms formed on hydroxyapatite discs. The results were submitted to normality tests followed by ANOVA and Tukey ($P < 0.05$). **Publication 1 – Results:** TEO did not affect the setting time, pH and volumetric change of the cements ($P > 0.05$). All materials showed alkalization capacity in relation to the control ($P < 0.05$). BCR/TEO and NMTA2/TEO showed better antimicrobial activity than BCR and NMTA2 against *E. faecalis* ($P < .05$). **Conclusion:** The addition of *Thyme Essential Oil* significantly improved the antimicrobial activity of cements, enhancing the antimicrobial activity without modifying physicochemical properties. **Publication 2 – Results:** of TEO did not change the setting time of the cements ($P > 0.05$). All materials showed alkalization capacity in the periods evaluated in relation to the control ($P < 0.05$). BR/TEO showed less volumetric change than BR ($P < 0.05$). BCS/TEO and BR/TEO were more effective than BCS and BR on *E. faecalis* biofilm. **Conclusion:** The association of *Thyme Essential Oil* to the materials increased the effectiveness of materials on *E. faecalis* biofilms, representing an alternative to increase the antimicrobial potential.

Keywords: Root Canal Filling Materials. X-Ray Microtomography. Calcareous Silicate. Oils, Volatile. Anti-Infective Agents.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3 PUBLICAÇÃO	12
3.1 Publicação 1	12
3.2 Publicação 2	27
4 DISCUSSAO	42
5 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A.....	52
ANEXO A	61

1 INTRODUÇÃO

Biomateriais de silicatos de cálcio apresentam potencial bioativo¹, promovendo reparação por tecido mineralizado após tratamento reparador ou tratamento endodôntico². O Agregado Trióxido Mineral (MTA) foi o primeiro cimento reparador com silicatos de cálcio demonstrando potencial bioativo³. É composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico entre outros óxidos minerais⁴. MTA demonstrou capacidade de estimular reparação do tecido pulpar e induzir a formação de dentina reparadora^{5,6}, além de apresentar alguma atividade antimicrobiana pela liberação de íons cálcio e hidroxila⁷. Porém, a capacidade de alcalinização é limitada após seu processo de hidratação quando ocorre diminuição de seu potencial antimicrobiano⁸. Além disso, apresenta desvantagens como elevado tempo de presa e potencial de descoloração dentária^{8,9}, levando ao desenvolvimento de novos materiais.

Os cimentos à base de silicatos de cálcio demonstram propriedades biológicas adequadas^{10,11}. São biocompatíveis, bioativos e não citotóxicos¹⁰, promovendo a formação de hidrato de silicato de cálcio e hidróxido de cálcio em contato com água¹², propiciando selamento em ambientes úmidos ou contaminado com sangue¹³. Selamento de perfurações radiculares, capeamento pulpar, pulpotomias, apexificação, apicigênese e obturação retrógrada são algumas de suas indicações clínicas¹⁴.

Bio-C Repair (Angelus, Paraná, Brasil) e NeoMTA 2 (Avalon Biomed, Houston, Estados Unidos) é um cimento biocerâmico reparador. É composto por silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio e óxido de zircônio. Bio-C Repair apresenta bioatividade e potencial de mineralização¹⁵, além da capacidade de liberar íons hidroxila e cálcio¹⁶. Entretanto, ainda não há estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana deste material. NeoMTA2 é um cimento à base de silicatos de cálcio, e um gel à base de água. Segundo o fabricante o NeoMTA2 apresenta partículas menores e maior radiopacidade. Este material é o sucessor do NeoMTA Plus, que apresenta formulação similar. NeoMTA Plus apresenta propriedades físico-químicas e biológicas adequadas^{17,18}. Entretanto, não demonstra ação antimicrobiana efetiva contra biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans*¹⁸.

NMTA2 demonstra ser citocompatível, bioativo e apresenta potencial de mineralização¹⁹. Ainda não existem estudos que avaliem as propriedades físico-químicas e antimicrobianas do NeoMTA 2.

Além de propriedades físico-químicas adequadas, os cimentos obturadores de canal radicular devem apresentar atividade antimicrobiana²⁰. BioRoot RCS (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França) e Bio-C Sealer (Angelus, Paraná, Brasil) são cimentos obturadores à base de silicato tricálcico. BioRoot RCS é um cimento endodôntico pó-líquido composto por silicato tricálcico e óxido de zircônio. BioRoot RCS apresenta pH, tempo de presa, solubilidade e porosidade adequados, é capaz de promover a alcalinização do meio²¹. Também demonstra propriedades antimicrobianas^{22,23} e não induz citocinas pró-inflamatórias, além de apresentar citocompatibilidade²⁴. Bio-C Sealer é um cimento pronto para uso a base de silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio e óxido de zircônio, além do agente dispersante. Bio-C Sealer apresenta adequados valores de pH, tempo de presa, escoamento, radiopacidade e alteração volumétrica²⁵. É um material biocompatível, apresenta potencial bioativo e favorece o reparo²⁶. Além disso, apresenta atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* devido ao seu potencial de alcalinização²⁶.

Cimentos à base de silicatos de cálcio apresentam propriedades antimicrobianas com efeito limitado, e menor ação sobre infecções persistentes²⁰. A presença de microrganismos isolados ou em biofilme é a principal causa do insucesso do tratamento endodôntico^{27,28}. *Enterococcus faecalis* é o microrganismo prevalente em infecções persistentes de canais radiculares tratados endodônticamente^{29,30}. Mesmo diante da disponibilidade limitada de nutrientes, algumas bactérias podem permanecer no canal radicular após o preparo biomecânico^{31,32}. Desta forma, a atividade antimicrobiana de materiais reparadores e cimentos endodônticos pode contribuir no controle destes microrganismos residuais^{33,34}.

A associação de agentes antimicrobianos aos materiais endodônticos pode melhorar seu efeito contra os microrganismos remanescentes. Algumas estratégias são utilizadas para melhorar a atividade antimicrobiana dos cimentos³⁵⁻³⁷. Dentre elas, a adição de clorexidina demonstrou melhora na atividade antimicrobiana, em contrapartida, prejudicou a presa dos cimentos e aumentou citotoxicidade³⁸⁻⁴⁰.

Óleos essenciais (OEs) extraídos de plantas são estudados como agentes antimicrobianos, demonstrando efeito antimicrobiano, além de propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias e antibacterianas⁴¹⁻⁴⁴. O TEO é composto principalmente por Timol e Carvacrol. Apresenta controle efetivo em biofilme polimicrobiano composto por *C. albicans* com *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Streptococcus mutans* ou *Pseudomonas aeruginosa*⁴².

A associação com substâncias pode alterar propriedades físico-químicas de materiais, o que torna necessário avaliar suas propriedades. A microtomografia computadorizada (micro-CT) é utilizada como ferramenta reprodutível e não destrutiva, fornecendo dados precisos para avaliação qualitativa e quantitativa. O micro-CT pode avaliar a alteração volumétrica de cimentos antes e após a imersão em fluido em diferentes intervalos de tempo^{45,46}, proporcionando entendimento do comportamento tridimensional dos materiais em diferentes períodos de tempo^{47,48}.

Além da avaliação das propriedades físico-químicas, testes antimicrobianos são necessários para avaliar a atividade antimicrobiana dos cimentos. O teste de Contato Direto Modificado (TCDM) com biofilme apresenta grande relevância na avaliação desta propriedade⁴⁹. É um método quantitativo e reprodutível que simula o contato direto dos microrganismos na forma de biofilme com cimentos endodônticos^{50,51}. Os cimentos biocerâmicos TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland), Sealer Plus BC (MK Life, Porto Alegre, RS, Brasil) Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França) e MTA Fillapex (Angelus, Paraná, Brasil) foram previamente avaliados pelo TCDM demonstrando boa atividade antimicrobiana⁵¹⁻⁵³.

A Endodontia busca maior potencial antimicrobiano dos cimentos reparadores e endodônticos. Há poucos relatos do uso de óleos essenciais associados aos cimentos endodônticos. Dessa forma, a associação do TEO a estes materiais pode ser uma alternativa, uma vez que já demonstrou atividade antimicrobiana contra microrganismos comumente encontrados nas infecções endodônticas. Também é necessária a avaliação das propriedades físico-químicas desta associação para possibilitar sua aplicação clínica adequada.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana dos cimentos biocerâmicos reparadores e endodônticos e suas associações ao *Thyme Essencial Oil* (TEO) por meio de metodologias convencionais, microtomografia computadorizada (micro-CT) e teste de contato direto modificado (TCDM).

2.2 Objetivos Específicos

Publicação 1 - Avaliar o efeito da adição do TEO aos cimentos reparadores Bio-C Repair e NeoMTA 2, no tempo de presa, pH, alteração volumétrica e atividade antimicrobiana.

Publicação 2 - Avaliar o efeito da adição do TEO aos cimentos endodônticos Bio-C Sealer e BioRoot RCS, no tempo de presa, pH, alteração volumétrica e atividade antimicrobiana.

3 PUBLICAÇÃO

As publicações descritas a seguir foram resultados da pesquisa realizada neste trabalho de dissertação.

3.1 Publicação1 *

Propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana dos cimentos reparadores Bio-C Repair e NeoMTA2 e das suas associações com *Thyme Essential Oil*

Objetivo: Avaliação de propriedades físico-químicas e antimicrobiana dos cimentos biocerâmicos reparadores pronto para uso Bio-C Repair (BCR, Angelus, Brasil)) e pó/líquido NeoMTA2 (NMTA2, Nusmile, EUA), e das suas associações com *Thyme Essential Oil* (TEO): BCR, BCR/TEO, NMTA2, NMTA2/TEO.

Metodologia: Tempo de presa foi avaliado de acordo com a ISO 6876:2012. pH foi avaliado após imersão dos materiais em água destilada por 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Alteração volumétrica foi avaliada utilizando microtomografia computadorizada (micro-CT). Teste de contato direto modificado (TCDM) sobre biofilmes de *E. faecalis* foi usado para avaliar capacidade antimicrobiana. Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA/Tukey ($\alpha = 0.05$).

Resultados: A associação ao TEO não interferiu no tempo de presa, pH e estabilidade volumétrica dos cimentos ($P > 0.05$). Todos os materiais mostraram capacidade de alcalinização em relação ao controle ($P < 0.05$). BCR/TEO e NMTA2/TEO foram mais efetivos contra biofilme de *E. faecalis* ($P > 0.05$).

Conclusão: A adição do *Thyme Essential Oil* promoveu maior atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, sendo uma alternativa para a melhoria desta propriedade nesses materiais.

Palavras chaves: atividade antimicrobiana, biofilme, endodontia, *Enterococcus faecalis*, silicatos de cálcio

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

INTRODUÇÃO

Cimentos biocerâmicos reparadores visam promover selamento e induzir reparo (Benetti *et al.*, 2019; Janini *et al.*, 2021). São indicados no tratamento de perfurações, apicificações, capeamento pulpar e obturações retrógradas. Bio-C Repair (BCR. Angelus, Paraná, Brasil) é um cimento reparador pronto para uso à base de silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio e óxido de zircônio. BCR apresenta bioatividade, citocompatibilidade e potencial de mineralização semelhante ao MTA (Benetti *et al.*, 2019; Ghilotti *et al.*, 2020; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021), além da capacidade de liberar íons cálcio (Benetti *et al.*, 2019). A solubilidade e radiopacidade estão de acordo com as normas ISO (Oliveira *et al.*, 2021), além de demonstrar capacidade de preenchimento (Torres *et al.*, 2020a). Porém, ainda não existem estudos que avaliem seu pH, alteração volumétrica e ação antimicrobiana.

NeoMTA 2 (NMTA2. Avalon Biomed, Houston, Estados Unidos) é um novo cimento reparador, sucessor do NeoMTA Plus. Ambos são materiais à base de silicatos de cálcio com óxido de tântalo como radiopacificador. Segundo o fabricante, o NMTA2 apresenta partículas menores, melhor manipulação e é mais radiopaco. NeoMTA Plus demonstrou propriedades físico-químicas e biológicas adequadas (Quintana *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2020a; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021; Birant *et al.*, 2021). Entretanto, não demonstra ação antimicrobiana efetiva contra biofilme de *E. faecales* e *C. albicans* (Jacob *et al.*, 2020). NMTA2 demonstra ser citocompatível, bioativo e apresenta potencial de mineralização (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2021).

A permanência de microrganismos isolados ou em biofilme é a maior causa de falhas do tratamento endodôntico (Tabassum *et al.*, 2016), sendo *Enterococcus faecalis* prevalente em infecções persistentes (Prada *et al.*, 2019; Zargar *et al.*, 2019). Portanto, é desejável que os materiais endodônticos sejam capazes de controlar o desenvolvimento de microrganismos residuais (Swimberghe *et al.*, 2019). Embora os cimentos à base de silicatos de cálcio apresentem capacidade de alcalinização do meio, sua atividade antimicrobiana é limitada (Janini *et al.*, 2021).

Óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antiinflamatórias (Kowalczyk *et al.*, 2020). Os óleos essenciais podem reduzir

significativamente o desenvolvimento de resistência dos microrganismos (Perez *et al.*, 2019). O óleo essencial de Tomilho (*Thyme Essential Oil*, TEO), é composto por 37-55% de timol e 0,5-5% de carvacrol (Kowalczyk *et al.*, 2020). TEO demonstra controle efetivo de biofilme polimicrobiano de microrganismos comumente encontrados na cavidade oral (Aires *et al.*, 2020; Kowalczyk *et al.*, 2020). TEO já foi avaliado como solução irrigadora (Marinković *et al.*, 2020) e em associação com pastas dentais (Carvalho *et al.*, 2020).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação do TEO aos cimentos reparadores BCR e NMTA 2 quanto às suas propriedades físico-químicas e ação antimicrobiana. A hipótese nula foi que a adição do TEO não altera as propriedades dos materiais avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais avaliados com seus respectivos fabricantes, composição e proporção estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Materiais avaliados com seus respectivos fabricantes, composições e proporções

Materiais	Fabricante	Composição	Proporções	Antimicrobiano
BCR	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão	Pronto para uso	-
BCR/TEO	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão	Pronto para uso	Thyme oil 1%
NMTA2	Avalon Biomed, Houston, Estados Unidos	Pó: silicato tri/dicálcico, óxido de tântalo Gel: base aquosa	1 g pó: 0,33mL líquido	-
NMTA2/TEO	Avalon Biomed, Houston, Estados Unidos	Pó: silicato tri/dicálcico, óxido de tântalo Gel: base aquosa	1 g pó: 0,33mL líquido	Thyme oil 1%

BCR – BioC Repair; NMTA2 – NeoMTA 2; TEO – Thyme Essential Oil (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.SP)

CÁLCULO AMOSTRAL

O tamanho da amostra para a investigação físico-química e antimicrobiana deste estudo foi realizado com base em estudos anteriores com metodologia semelhante (Torres *et al.*, 2017; Ochoa-Rodríguez *et al.*, 2019; Zordan-Bronzel *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2020b). O programa G*Power 3.1.7 para Windows (Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Dusseldorf, Alemanha) foi utilizado para o cálculo

amostral. O teste ANOVA foi utilizado com um erro do tipo Alpha de 0.05 e poder Beta de 0.95. O tamanho do efeito específico para cada variável foi calculado: 2.38 para tempo de presa, 0.96 para pH e 0.98 para alteração volumétrica.

CÁLCULO PARA CONCENTRAÇÃO DE 1% DO *THYME ESSENTIAL OIL* (TEO)

A concentração de 1% do TEO (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.SP) foi obtida com base na densidade deste óleo, que é de 0.917 g/mL a 25 °C. Desta forma, para cada 1 grama de cimento foi adicionado 11 µl de TEO.

Tempo de presa

Moldes de gesso tipo IV (Durone IV Salmon; Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) com cavidades de 10 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade foram confeccionados e imersos em água destilada por 24 h em estufa a 37 °C, conforme a ISO 6876:2012. Após esse período, os moldes foram preenchidos com os cimentos (n = 6) e mantidos em estufa a 37 °C e umidade de 95%. O tempo de presa foi avaliado com base na norma ISO 6876: 2012, utilizando uma agulha Gilmore de 100 g com ponta ativa de 2 mm colocada verticalmente sobre a superfície do material. O tempo de presa foi determinado considerando o intervalo entre a manipulação dos cimentos até quando a agulha não promovesse marcação na superfície do material.

pH

Para o teste de pH, tubos de polietileno (Embramed, São Paulo, SP, Brasil) com 10 mm de comprimento e 1.5 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n = 10). Em seguida, cada tubo foi imerso em 10 mL de água destilada e deionizada e armazenado em estufa a 37° C. O pH foi avaliado após 1,3, 7, 14 e 21 dias por meio de pHmetro digital previamente calibrado (Digimed, São Paulo, Brasil) a temperatura de 25° C. Foi realizada a troca do líquido de imersão a cada período experimental, sendo o grupo controle a água destilada e deionizada.

Alteração volumétrica em micro-CT

Tubos de dentina bovina (n=5) com 4 mm de comprimento, diâmetro interno 1,5 mm e espessura das paredes de aproximadamente 1 mm foram confeccionados utilizando brocas Gates-Glidden número 5. Após o preparo, os espécimes foram imersos em água destilada e armazenados em estufa a 37 °C por 24 h. Decorridas as 24 h, as cavidades foram preenchidas com os cimentos utilizando um kit de condensadores (Ref.: 324501, nºs 2, 3 e 4; Golgran; São Caetano do Sul, SP, Brasil) e mantidas em estufa a 37 °C e umidade de 95% por três vezes o tempo de presa dos materiais. Em seguida, foram submetidas ao escaneamento inicial em micro-CT (Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: resolução de 9 µm, frame 4, filtro de cobre e alumínio, rotação 180°, 80 kV e 300 uA. Na sequência, as amostras foram imersas em PBS e armazenadas em estufa a 37 °C por 7 dias. Decorrido esse período, foi realizado um novo escaneamento, utilizando os mesmos parâmetros descritos previamente. As imagens obtidas foram reconstruídas com o auxílio do programa NRecon (V1.6.4,7; SkyScan, Bélgica) e os parâmetros de correções de artefatos foram definidos individualmente para cada material. As imagens reconstruídas em 3D foram sobrepostas e registradas nos diferentes períodos utilizando o programa Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica). Posteriormente, as imagens sobrepostas foram analisadas quantitativamente no programa CTAn (V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica). Cada espécime foi dividido em duas partes no software CTAn, sendo utilizados os 2 mm superiores e os 2 mm inferiores de cada amostra para análise da alteração volumétrica dos materiais. Também foi realizada uma análise adicional dos 2 mm do centro da amostra. Os valores de alteração volumétrica (%) foram determinados comparando os valores de volume total de preenchimento das cavidades antes e após a imersão.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Cepas de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram cultivadas em Tryptic Soy Broth – (TSb), semeadas em placas contendo Tryptic Soy Ágar e incubada a 37°C por 24 h. Foram preparadas suspensões microbianas e ajustadas a uma densidade óptica em

espectrofotômetro em OD₆₀₀ equivalente a 1×10^8 UFC mL⁻¹ para formação dos biofilmes.

Teste de contato direto modificado (TCMD)

Discos de hidroxiapatita (IF-USP- São Carlos) com 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram esterilizados. Utilizando placas de 24 poços esterilizadas, os substratos foram contaminados com 200µL da suspensão de *E.faecalis* a 1×10^8 UFC mL⁻¹ e ao final foi adicionado 1,8mL de TSb. Foram realizadas trocas do meio de cultura total a cada 24 h. Os biofilmes foram incubados em estufa agitadora a 37°C com 80rpm (Modelo 0816M28, Quimis aparelhos científicos LTDA, Diadema, SP, Brasil) durante 7 dias.

Os eluídos dos materiais foram preparados na concentração de 50mg/mL, sendo manipulados e inseridos em tubos falcon com 10 mL de água destilada esterilizada e imediatamente misturados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) e mantidos em estufa a 37°C durante 48 h. No dia do experimento os discos de hidroxiapatita com biofilme foram lavados em PBS e colocados individualmente em um eppendorf de 0,5mL com 300µL de eluído dos materiais filtrado (filtro 0,22µm) permanecendo em contato por 15h. Após este período, cada disco de hidroxiapatita foi colocado em um microtubo contendo 1 mL de solução salina esterilizada e pérolas de vidro e em seguida agitados em vórtex (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), por 1 min. Posteriormente, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento de três alíquotas de 20µL de cada uma das suspensões, em placas de Petri contendo meio de cultura de Tryptic Soy ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. A contagem de UFC/mL foi realizada e os dados foram submetidos à transformação logarítmica ($\log_{10}$).

Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, e apresentaram distribuição normal. Os testes ANOVA e Tukey foram usados para comparações entre os grupos e teste t não pareado foi usado para comparações entre a extremidade e a parte interna da amostra na análise de alteração volumétrica. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Tempo de presa e pH

A associação do TEO aos cimentos reparadores BCR e NMTA2 não alterou o tempo de presa ($P>0.05$). NMTA2 e NMTA2/TEO apresentaram maior TP que BCR e BCR/TEO ($P<0.05$).

Todos os materiais mostraram capacidade de alcalinização nos períodos avaliados (1, 3, 7, 14 e 21 dias) em relação ao grupo controle ($P<0.05$). A adição do TEO não alterou pH dos materiais ($P>0.05$). A maior capacidade de alcalinização foi demonstrada por NMTA2 e NMTA2/TEO no período de 1 dia. Não houve diferença estatística entre os materiais nos períodos de 3 e 7 dias ($P>0.05$). No período de 14 dias NMTA2 apresentou menor potencial de alcalinização quando comparado a NMTA2/TEO, BCR e BCR/TEO ($P<0.05$). No período de 21 dias NMTA2 e NMTA2/TEO apresentaram maior potencial de alcalinização que BCR e BCR/TEO ($P>0.05$).

Tabela 2 – Valores de tempo de presa e pH (media e desvio padrão) observados para os materiais

TESTE	BCR	BCR/TEO	NMTA2	NMTA2/TEO	CONTROLE
Tempo de presa	102.4 ± 4.89 ^a	113.0 ± 2.64 ^a	283.7 ± 25.84 ^b	292.2 ± 21.27 ^b	-
1 dia	10.56 ± 0.149 ^a	10.56 ± 0.119 ^a	11.01 ± 0.161 ^b	11.16 ± 0.157 ^b	7.14 ± 0.065 ^c
3 dias	10,33 ± 0,174 ^a	10,35 ± 0,124 ^a	10,24 ± 0,137 ^a	10,36 ± 0,162 ^a	7,09 ± 0,061 ^b
pH					
7 dias	10,18 ± 0,122 ^a	10,13 ± 0,101 ^a	10,18 ± 0,132 ^a	10,13 ± 0,091 ^a	6,50 ± 0,150 ^b
14 dias	10,49 ± 0,163 ^a	10,41 ± 0,242 ^a	10,13 ± 0,184 ^b	10,27 ± 0,172 ^a	6,53 ± 0,193 ^c
21 dias	9,79 ± 0,144 ^a	9,72 ± 0,198 ^a	10,04 ± 0,133 ^b	10,08 ± 0,146 ^b	6,29 ± 0,118 ^c

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P<0.05$)

Alteração volumétrica em microCT

A adição de TEO aos materiais não modificou volume dos materiais ($P>0.05$). BCR e BCR/TEO tiveram aumento de volume enquanto NMTA2 e NMTA2/TEO tiveram perda de volume. Não houve diferença significativa entre a extremidade e parte interna de BCR e BCR/TEO ($P>0.05$). Entretanto, houve diferença significativa entre a extremidade e parte interna para NMTA2 e NMTA2/TEO (Figura1) (Tabela 2).

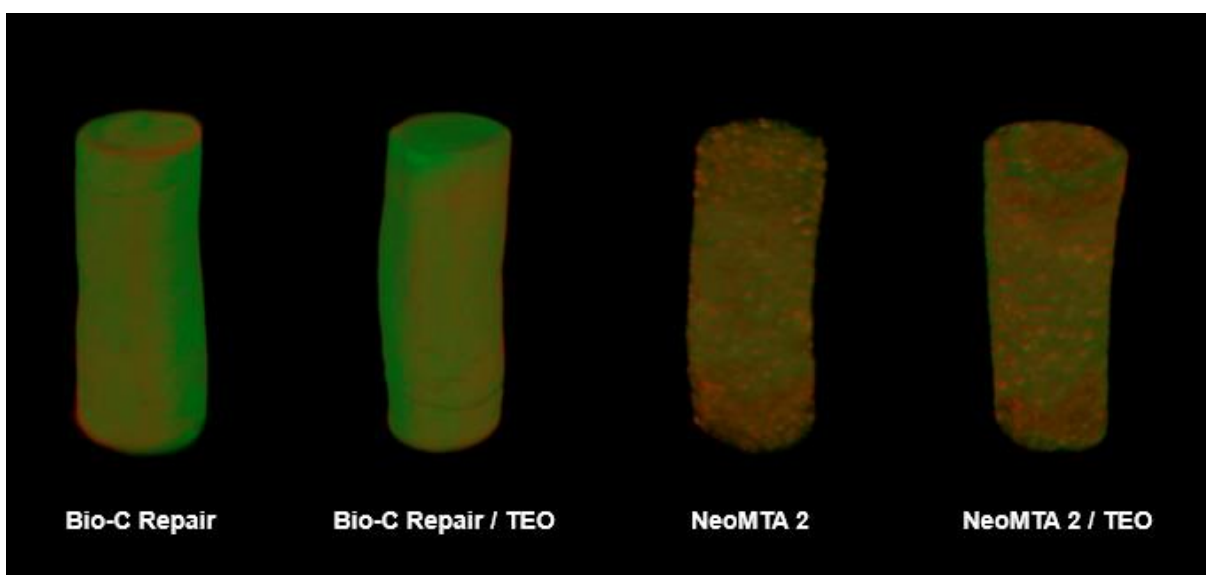


Figura 1 - Reconstruções tridimensionais de micro-CT mostrando sobreposição do volume dos materiais antes (vermelho) e após (verde) imersão em PBS por 7 dias. Áreas densas em verde indicam ganho de volume, enquanto áreas em vermelho indicam perda de volume.

Tabela 3 - Média e desvio padrão do percentual de alteração volumétrica dos materiais reparadores após o período de sete dias de imersão em PBS.

	BCR	BCR/TEO	NMTA2	NMTA2/TEO
Extremidade	$0,198 \pm 0,164^{aA}$	$0,380 \pm 0,161^{aA}$	$-0,787 \pm 0,143^{bA}$	$-0,724 \pm 0,179^{bA}$
Parte interna	$0,211 \pm 0,097^{aA}$	$0,237 \pm 0,143^{aA}$	$-0,546 \pm 0,146^{bB}$	$-0,364 \pm 0,099^{bB}$

*Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos ($P<0.05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística ($P<0.05$).

Atividade antimicrobiana

Todos os materiais apresentam atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* quando comparados com o controle ($P<0.05$). Houve diferença significativa entre os materiais associados e não associados ao TEO ($P<0.05$). BCR/TEO e NMTA2/TEO promoveram maior redução de UFC mL⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 4 – Média e desvio padrão da atividade antimicrobiana dos materiais avaliados, expressos em UFC mL⁻¹ para TCDM em biofilme de *E. faecalis*, após 15 h de contato

	BCR	BCR/TEO	NMTA2	NMTA2/TEO	CONTROLE
UFC mL ⁻¹	3,44± 0,61 ^a	0 ± 0 ^b	3,18 ± 0,36 ^a	0 ± 0 ^b	7,96 ± 0,19 ^c

*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P<0.05$). Os resultados foram expressos em log₁₀.

DISCUSSÃO

Os cimentos reparadores apresentaram maior atividade antimicrobiana quando associados a 1% de *Thyme Essential Oil* (TEO). Entretanto, TEO não interferiu no tempo de presa, pH e alteração volumétrica dos materiais. Sendo assim, a hipótese nula deste estudo foi parcialmente aceita.

Cimentos à base de silicatos de cálcio requerem água para o processo de hidratação (Gandolfi *et al.*, 2015). Assim, moldes de gesso foram confeccionados e hidratados previamente a inserção dos materiais para o teste, com base no preconizado pelas normas ISO 6876/2012 para materiais que necessitam de umidade para a presa (International Organization for Standardization Dentistry, 2012). NMTA2 tem formulação pó-gel com início da hidratação durante a manipulação, o que não ocorre com BCR que é pronto para uso e requer umidade dos tecidos

adjacentes ou dos discos de gesso confeccionados e hidratados para o teste (Silva Almeida et al., 2017; Zordan-Bronzel et al., 2019).

NMTA2 e NMTA2/TEO apresentam maior tempo de presa que BCR e BCR/TEO. NMTA2 apresentou no presente estudo tempo de presa mais longo que o relatado para NeoMTA Plus (Quintana et al., 2019; Jiménez-Sánchez et al., 2019). Segundo o fabricante, NMTA2 apresenta partículas finas, o que pode explicar o maior tempo de presa, uma vez que menores partículas tendem a aumentar o processo de endurecimento (Aberg et al., 2013). A incorporação de extratos vegetais ao MTA aumentou significativamente o tempo de presa do cimento (Cavenago et al., 2017). Os resultados do presente estudo sugerem que a adição de TEO não interfere na hidratação dos cimentos reparadores.

A capacidade de alcalinização dos materiais biocerâmicos favorece o reparo por tecido mineralizado (Ghilotti et al., 2020; Rodríguez-Lozano et al., 2021), além de auxiliar na atividade antimicrobiana (Janini et al., 2021). A hidratação dos cimentos hidráulicos promove formação de hidróxido de cálcio, que ao se dissociar libera íons hidroxila (Camilleri et al., 2013). A alcalinização do meio é diretamente relacionada à atuação sobre a membrana celular microbiana (Samanta et al., 2017). No presente estudo BCR e NMTA 2 apresentaram altos valores de pH, corroborando com resultados de pH apresentados previamente por NeoMTA Plus e outros cimentos reparadores (Quintana et al., 2019; Birant et al., 2021). Além disso, a incorporação de 1% de TEO aos cimentos reparadores BCR e NMTA2 não interferiu na capacidade de alcalinização com altos valores de pH, mesmo após 21 dias.

Micro-CT é utilizado para avaliar a alteração volumétrica de cimentos antes e após a imersão em fluido por diferentes intervalos de tempo (Torres et al., 2020b). NMTA2 e NMTA2/TEO apresentaram maior alteração volumétrica que BCR puro e associado ao TEO, o que pode estar relacionada à solubilidade. Não existem relatos na literatura para a solubilidade de BCR e NMTA2. Entretanto, maior solubilidade foi observada para NeoMTA Plus (Quintana et al., 2019; Jimenez-Sánchez et al., 2019), o que poderia justificar a perda volumétrica para o material. Porém, nossos resultados mostraram que todos os materiais apresentaram alteração de volume menor que 1% após a imersão em PBS por 7 dias, o que sugere estabilidade volumétrica, corroborando com estudo anterior onde extratos vegetais foram

adicionados ao MTA sem modificar a alteração volumétrica do material (Cavenago *et al.*, 2017)

O armazenamento de espécimes em PBS reduz a solubilidade e alteração volumétrica de cimentos à base de silicatos de cálcio (Torres *et al.*, 2020c), corroborando com o aumento volumétrico observado para BCR em nosso estudo. Menor alteração volumétrica da parte interna em comparação à extremidade foi observado para NMTA2 podendo ser relacionado com a solubilidade após contato com a solução, o que não ocorre na parte interior da amostra.

A atividade antimicrobiana de um biomaterial reparador é desejável uma vez que não é possível controlar microrganismos presentes nas infecções endodônticas persistentes (Bedran *et al.*, 2020; Gabrielli *et al.*, 2021). Dessa forma, é relevante avaliar a ação antimicrobiana de cimentos reparadores contra biofilmes de microrganismos resistentes como a *E. faecalis* (Jacob *et al.*, 2020; Janini *et al.*, 2021). Os microrganismos organizados em biofilmes são mais resistentes (Swimbherge *et al.*, 2019). O teste de contato direto modificado (TCDM) foi realizado após a formação de biofilme sobre discos de hidroxiapatita. NeoMTA Plus foi avaliado por esta metodologia, entretanto, não foi efetivo sobre biofilme mono e dual espécie de *E. faecalis* e *C. albicans* (Jacob *et al.*, 2020). Não existem relatos na literatura sobre atividade antimicrobiana de BCR e NMTA2. Nossos resultados mostraram que todos os materiais apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* quando comparados ao grupo controle.

O aumento da resistência bacteriana tem conduzido ao uso de substâncias naturais com atividade antimicrobiana (Salehi *et al.*, 2018). TEO apresentou controle efetivo em biofilmes polimicrobianos compostos por *C. albicans* com *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* ou *P. aeruginosa* (Semeniuc *et al.*, 2017). O presente estudo demonstra maior redução de UFC do biofilme para Bio-C Repair e NeoMTA2 associados ao TEO. Dessa maneira, *Thyme Essential Oil* representa uma alternativa para novas formulações de cimentos reparadores de silicatos de cálcio com maior potencial antimicrobiano.

CONCLUSÃO

A adição do *Thyme Essential Oil* não interfere no tempo de presa, pH e alteração volumétrica dos cimentos Bio-C Repair e NeoMTA2. Ainda, a associação ao *Thyme Essential Oil* promoveu maior atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

- Aberg J, Engstrand J, Engqvist H (2013) Influence of particle size on hardening and handling of a premixed calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **24**, 829-835.
- Aires A, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T (2020) Antimicrobial Effects of Essential Oils on Oral Microbiota Biofilms: The Toothbrush In Vitro Model. *Antibiotics (Basel)* **29**, 10-21
- Bedran NR, Nadelman P, Magno MB *et al.* (2020) Does Calcium Hydroxide Reduce Endotoxins in Infected Root Canals? Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Endodontics* **11**, 1545-1558
- Benetti F, Queiroz ÍOA, Cosme-Silva L, Conti LC, Oliveira SHP, Cintra LTA (2019) Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. *Brazilian Dental Journal*. **22**, 325-332.
- Birant S, Gokalp M, Duran Y, Koruyucu M, Akkoc T, Seymen F (2021) Cytotoxicity of NeoMTA Plus, ProRoot MTA and Biodentine on human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Sciences* **16**, 971-979.
- Camilleri J, Sorrentino F and Damidot D (2013) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials* **29**:580-93.
- Carvalho IO, Purgato GA, Píccolo MS *et al.* (2020) In vitro anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. *Archives of Oral Biology*. **117**, 104834.
- Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA *et al.* (2014) Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. **47**, 120-126.
- Cavenago BC, Del Carpio-Perochena AE, Ordinola-Zapata R, *et al.* (2017) Effect of Using Different Vehicles on the Physicochemical, Antimicrobial, and Biological Properties of White Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. **43**(5), 779-786.
- Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *International Endodontic Journal*. **46**, 755-762.
- Gabrielli, ES, Lima AR, Francisco PA *et al.* (2021) Comparative analysis of bacterial content, levels of lipopolysaccharides and lipoteichoic acid in symptomatic and asymptomatic endodontic infections at different stages of endodontic treatment. *Clinical Oral Investigations*. doi:10.1007/s00784-021-03998-2.

Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossu M, Riccitiello F, Prati C (2015) Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* **13**, 43– 60.

Ghilotti J, Sanz JL, López-García S *et al.* (2020) Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. *Materials (Basel)* **13**, 2189.

International Organization for Standardization Dentistry. Root canal sealing materials. British Standards Institution ISO 6876. London, UK. 2012.

Jacob VP, Paião LI, da Silva ACG *et al.* (2020) Antimicrobial action of NeoMTA Plus on mono- and dual-species biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An in vitro study. *Archives of Oral Biology* **120**, 104925.

Janini ACP, Bombarda GF, Pelepenko LE, Marciano MA (2021) Antimicrobial Activity of Calcium Silicate-Based Dental Materials: A Literature Review. *Antibiotics (Basel)*. **10**, 865.

Jiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A (2019) Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *Journal of Biomedical Materials Research* **107**, 2109-2120.

Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I (2020) Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules* **25**, 4125.

Marinković J, Čulafić DM, Nikolić B *et al.* Antimicrobial potential of irrigants based on essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Thymus zygis* towards in vitro multispecies biofilm cultured in ex vivo root canals. *Archives of Oral Biology*. **117**, 104842.

Ochoa-Rodríguez VM, Tanomaru-Filho M, Rodriguews EM, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Faria, G (2019) Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. *Journal of Applied Oral Science* **27**, e20180429.

Ørstavik D (2005) Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics* **12**, 25–38.

Perez AP, Perez N, Lozano CMS *et al.* (2019) The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicle. *Phytomedicine* **57**, 339–351.

Prada I, Mico-Munoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A (2019) Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal* **24**, e364–e372.

Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR *et al.* (2019) Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clinical Oral Investigations* **23**, 1359-1366.

Reiznaukt CM, Ribeiro JS, Kreps E, *et al.* (2021) Development and properties of endodontic resin sealers with natural oils. *J Dent*. **104**, 103538.

Rodríguez-Lozano FJ, Lozano A, López-García S *et al.* (2021) Biomineralization potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)-containing calcium silicate cement. *Clinical Oral Investigations* <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04117-x>

Salehi B, Mishra AP, Shukla I, et al. (2018) Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother Res* **32**(9):1688-1706.

Samanta A, Podder S, Ghosh CK, et al. (2017) ROS mediated high anti-bacterial efficacy of strain tolerant layered phase pure nano-calcium hydroxide. *J Mech Behav Biomed Mater*. **72**:110-128.

Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM (2017). Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Food Drug Anal* **25**(2):403-408.

Silva Almeida LH, Moraes RR, Morgental RD, et al. (2017) Are Premixed Calcium Silicate-based Endodontic Sealers Comparable to Conventional Materials? A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod* **43**,527-35.

Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA (2019) Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *International Endodontic Journal* **52**, 604-628.

Tabassum S, Khan FR (2016) Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *European Journal of Dentistry* **10**, 144–147.

Torres FFE, Perinoto P, Bosso-Martelo R, Chávez-Andrade GM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. (2020). Influence of Powder-to-Gel Ratio on Physicochemical Properties of a Calcium Silicate Sealer. *Odovtos International Journal of Dental Sciences* **22**, 154-162.a

Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru J.M, Tanomaru-Filho M. (2017) Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *Journal Applied Oral Science* **25**, 374-380.b

Torres FFE, Pinto JC, Figueira GO, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2020) A micro-computed tomographic study using a novel test model to assess the filling ability and volumetric changes of bioceramic root repair materials. *Restorative Dentistry & Endodontics*. **46**, e2.c

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

Zargar N, Marashi MA, Ashraf H, Hakopian R, Beigi (2019) Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection. *Iranian Journal of Microbiology* **11**, 120–128.

Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM (2019) Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *International Endodontic Journal* **52**, 979-986.

Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, et al. (2019) Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. *J Endod* **45**, 1248-52.

3.2 Publicação 2 *

Efeito da adição de *Thyme Essential Oil* nas propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de cimentos obturadores biocerâmicos

RESUMO

Objetivo: Avaliar propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana dos cimentos biocerâmicos Bio-C Sealer (BCS, Angelus, Paraná, Brasil) e BioRoot RCS (BR, Septodont, Saint-Maur-des Fosses, França) associados ou não a 1% de *Thyme Essential Oil* (TEO). **Material e métodos:** Tempo de presa foi avaliado de acordo com a ISO 6876:2012. pH foi avaliado após imersão dos materiais em água deionizada nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Alteração volumétrica foi avaliada utilizando microtomografia computadorizada (micro-CT). A capacidade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (TCDM) sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis* formados sobre discos de hidroxiapatita. Os resultados foram submetidos a testes de normalidade seguido de ANOVA e Tukey ($P < 0.05$). **Resultado:** TEO não alterou o tempo de presa dos cimentos ($P > 0.05$). Todos os materiais mostraram capacidade de alcalinização nos períodos avaliados, em relação ao controle ($P < 0.05$), apresentando diferença significativa apenas para BR no período de 14 dias ($P < 0.05$). BR/TEO demonstrou menor alteração volumétrica que BR ($P > 0.05$). BCS/TEO e BR/TEO apresentaram maior atividade antimicrobiana de *E. faecalis* ($P < 0.05$). **Conclusão:** A adição de *Thyme Essential Oil* aos cimentos Bio-C Sealer e BioRoot RCS aumentou a atividade antimicrobiana de *E. faecalis*, podendo ser uma alternativa para melhorar a atividade desses materiais.

Palavras chaves: Ação antimicrobiana, Endodontia, Propriedades físicas e químicas, Silicatos de cálcio, Óleo essencial, *Thyme Oil*

* Redigido de acordo com as normas do *Journal of Endodontics*, periódico para o qual será submetido.

INTRODUÇÃO

Cimentos obturadores biocerâmicos são desenvolvidos por apresentarem biocompatibilidade e potencial bioativo favorecendo o processo de reparo (1,2,3). Bio-C Sealer (Angelus, Paraná, Brasil) é um cimento endodôntico pronto para uso à base de silicatos de cálcio, óxidos de cálcio e óxido de zircônio. Bio-C Sealer é biocompatível e apresenta potencial bioativo (4), além de pH, tempo de presa, escoamento, radiopacidade, e alteração volumétrica adequados. Entretanto, demonstrou alta solubilidade (5). O material demonstra capacidade de alcalinização, o que pode favorecer sua atividade antimicrobiana (5).

BioRoot RCS (Septodont, Saint-Maur-des Fosses, França) é um cimento pó-líquido à base de silicato tricálcico (6). O pó contém silicato tricálcico, povidona e óxido de zircônio e o líquido solução aquosa de cloreto de cálcio e policarboxilato. BioRoot RCS apresenta pH, tempo de presa e porosidade adequados, entretanto, apresenta solubilidade acima do recomendado pela norma ISO (7). BioRoot RCS promove alcalinização, apresenta propriedades antimicrobianas (8) e citocompatibilidade (9).

A obturação dos canais radiculares visa o selamento do sistema de canais radiculares controlando microrganismos residuais (10). *Enterococcus faecalis* é o microrganismo mais encontrado em infecções persistentes (11), sendo desejável que os materiais endodônticos sejam capazes de controlar microrganismos resistentes (12). Óleos essenciais são utilizados devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (13), e também por não permitirem que os microrganismos desenvolvam resistência (14). O *Thyme Essential Oil* (TEO) é um óleo essencial, composto principalmente por timol e carvacrol (13) que demonstra atividade antimicrobiana contra biofilmes de microrganismos frequentemente encontrados em infecções endodônticas (13,15,16). Dentifrício dental associado ao TEO, demonstrou atividade antimicrobiana contra microrganismos comumente encontrados na cavidade oral, como a *E. faecalis*, *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. salivarius* (17). Cimento experimental contendo óleo de copaíba demonstrou propriedades físico-químicas satisfatórias, capacidade de inibir biofilme e citocompatibilidade (18). Entretanto, ainda não há relatos na literatura da associação de TEO a cimentos obturadores biocerâmicos com o propósito de melhorar a propriedade antimicrobiana.

O objetivo deste estudo foi avaliar tempo de presa, pH, alteração volumétrica e atividade antimicrobiana dos cimentos obturadores Bio-C Sealer e BioRoot RCS puros e associados ao TEO. A hipótese nula foi que a adição do TEO não altera as propriedades dos materiais avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais avaliados com seus respectivos fabricantes, composição e proporção estão descritos na Tabela 1

Tabela 1 – Materiais, composições e proporções

Materiais	Fabricante	Composição	Proporções	Antimicrobiano
BCS	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	Silicatos de cálcio, Aluminato de cálcio, Óxido de cálcio, Óxido de zircônio, Óxido de ferro, Dióxido de silício e Agente de dispersão.	Pronto para uso	-
BCS/ TEO	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	Silicatos de cálcio, Aluminato de cálcio, Óxido de cálcio, Óxido de zircônio, Óxido de ferro, Dióxido de silício e Agente de dispersão.	Pronto para uso	Thyme oil 1%
BRT	Septodont, Saint-Maur- des-Fossés, França	Pó: Silicato tricálcico, óxido de zircônio, povidona Líquido: cloreto de cálcio dihidratado, areo e polímero hidrossolúvel	1g pó: 6 gotas líquido	-
BRT/TEO	Septodont, Saint-Maur- des-Fossés, França	Pó: Silicato tricálcico, óxido de zircônio, povidona Líquido: cloreto de cálcio dihidratado, areo e polímero hidrossolúvel	1g pó: 6 gotas líquido	Thyme oil 1%

BCS – BioC Sealer; BRT – BioRoot RCS; TEO – Thyme Essential Oil (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

CÁLCULO AMOSTRAL

O tamanho da amostra para a investigação físico-química e antimicrobiana deste estudo foi realizado com base em investigações anteriores com metodologia semelhante (19,20,21,22). O programa G*Power 3.1.7 para Windows (Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Dusseldorf, Alemanha) foi utilizado para o cálculo amostral. O teste ANOVA foi utilizado com um erro do tipo Alpha de 0,05 e poder Beta de 0,95. O tamanho do efeito específico para cada variável foi calculado: 2,38 para tempo de presa, 0,96 para pH, 0,98 para alteração volumétrica.

CÁLCULO PARA CONCENTRAÇÃO DE 1% DO *THYME ESSENTIAL OIL* (TEO)

A concentração de 1% do TEO (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.SP) foi realizado com base na densidade deste óleo, que é de 0.917 g/mL a 25 °C. Desta forma, para cada 1 grama de cimento foi adicionado aproximadamente 11 µl de TEO.

Tempo de presa

Moldes de gesso tipo IV (Durone IV Salmon; Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) com cavidades de 10 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade foram confeccionados e armazenados em água destilada por 24 h em estufa a 37 °C, conforme a ISO 6876:2012. Após esse período, os moldes foram preenchidos com os cimentos (n = 6) e mantidos em estufa a 37 °C e umidade de 95% durante todo o experimento, sendo retirados apenas para as análises. O tempo de presa foi avaliado utilizando uma agulha Gilmore de 100 g com ponta ativa de 2 mm colocada verticalmente sobre a superfície do material. O tempo de presa foi determinado considerando o intervalo entre a manipulação dos cimentos até quando as marcas da agulha não pudessem mais ser observadas na superfície do material.

pH

Para o teste de pH, tubos de polietileno (Embramed, São Paulo, SP, Brasil) com 10 mm de comprimento e 1.5 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n = 10). Em seguida, cada tubo foi imerso em 10 mL de água destilada e deionizada e armazenado em estufa a 37° C. O pH foi avaliado em períodos experimentais diferentes (1, 3, 7, 14 e 21 dias) com pHmetro digital previamente calibrado (Digimed, São Paulo, Brasil) a temperatura de 25° C. O líquido de imersão foi trocado a cada período experimental, sendo o grupo controle a água destilada e deionizada.

Alteração volumétrica em micro-CT

Tubos de dentina bovina (n=5) medindo 4 mm de comprimento, diâmetro interno 1,5 mm e espessura das paredes de aproximadamente 1,0 mm foram confeccionados. Posteriormente, os espécimes foram imersos em água destilada e armazenados em estufa a 37 °C por 24 h. Decorridas as 24 h, as cavidades foram preenchidas com os cimentos utilizando um kit de condensadores (Ref.: 324501, nºs 2, 3 e 4; Golgran; São Caetano do Sul, SP, Brasil) e mantidas em estufa a 37 °C e umidade de 95% por três vezes o tempo de presa dos materiais. Em seguida, foram submetidas ao escaneamento inicial em micro-CT (Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: resolução de 9 µm, frame 4, filtro de cobre e alumínio, rotação 180°, 80 kV e 300 uA. Na sequência, as amostras foram imersas em PBS e armazenadas em estufa a 37 °C por 7 dias. Decorrido esse período, foi realizado um novo escaneamento, utilizando os mesmos parâmetros descritos previamente. As imagens obtidas foram reconstruídas com o auxílio do programa NRecon (V1.6.4,7; SkyScan, Bélgica) e os parâmetros de correções de artefatos foram definidos individualmente para cada material. As imagens reconstruídas em 3D foram sobrepostas e registradas nos diferentes períodos utilizando o programa Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica). Posteriormente, as imagens sobrepostas foram analisadas quantitativamente no programa CTAn (V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica). Cada espécime foi dividido em duas partes, sendo utilizado os 2mm superiores e 2 mm inferiores de cada amostra para análise da alteração volumétrica dos materiais. Também foi realizada uma análise adicional dos 2 mm do centro da amostra. Os valores de alteração volumétrica (%) foram

determinados comparando os valores de volume total de preenchimento das cavidades antes e após a imersão.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Cepas de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram cultivadas em Tryptic Soy Broth – (TSb), semeadas em placas contendo Tryptic Soy Ágar e incubada a 37°C por 24 h. Foram preparadas suspensões microbianas e ajustadas a uma densidade óptica em espectrofotômetro em OD₆₀₀ equivalente a 1×10^8 UFC mL⁻¹ para formação dos biofilmes.

Teste de contato direto modificado (TCMD)

Discos de hidroxiapatita (IF-USP- São Carlos) com 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram esterilizados. Utilizando placas de 24 poços esterilizadas, os substratos foram contaminados com 200µL da suspensão de *E. faecalis* a 1×10^8 UFC mL⁻¹ e ao final foi adicionado 1,8mL de TSb. Foram realizadas trocas do meio de cultura total a cada 24 h. Os biofilmes foram incubados em estufa agitadora a 37°C com 80rpm (Modelo 0816M28, Quimis aparelhos científicos LTDA, Diadema, SP, Brasil) durante 7 dias.

Os eluídos dos materiais foram preparados na concentração de 50mg/mL, sendo manipulados e inseridos em tubos falcon com 10 mL de água destilada esterilizada e imediatamente misturados em vórtex por 1 min (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) e mantidos em estufa a 37°C durante 48 h. No dia do experimento os discos de hidroxiapatita com biofilme foram lavados em PBS e colocados individualmente em um eppendorf de 0,5mL com 300µL de eluído dos materiais filtrado (filtro 0,22µm) permanecendo em contato por 15h. Após este período, cada disco de hidroxiapatita foi colocado em um microtubo contendo 1 mL de solução salina esterilizada e pérolas de vidro e, em seguida, agitados em vórtex (Modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 min. Posteriormente, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento de três alíquotas de 20µL de cada uma das suspensões, em placas de Petri contendo meio de cultura de Tryptic Soy ágar. As placas foram incubadas a

37°C por 48 h. A contagem de UFC/mL foi realizada e os dados foram submetidos à transformação logarítmica ($\log_{10}$).

Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, e apresentaram distribuição normal. Os testes ANOVA e Tukey foram usados para comparações entre os grupos e teste t não pareado foi usado para comparações entre a extremidade e a parte interna da amostra na análise de alteração volumétrica. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Tempo de presa

Os materiais avaliados puros e associados ao TEO não demonstraram diferença estatística significativa para o tempo de presa, com exceção de BCS quando comparado ao BR/TEO ($P<0.5$) (Tabela 1).

pH

Os materiais mostraram capacidade de alcalinização nos períodos avaliados em relação ao controle ($P<0.05$). A adição do TEO mostrou diferença significativa apenas para BR no período de 14 dias ($P<0.05$). Nos períodos de 7 e 21 dias BCS e BCS/TEO mostraram menor pH que BR e BR/TEO (Tabela 1).

Tabela 2 – Valores de tempo de presa (min) e pH (média e desvio padrão) observados para os materiais nos diferentes períodos

TESTE	BCS	BCS/TEO	BR	BR/TEO	CONTROLE
Tempo de presa	201.4 ± 14.9 ^a	194 ± 17.24 ^{a,b}	181 ± 11.54 ^{a,b}	176 ± 11.74 ^b	-
1 dia	11,04 ± 0,112 ^a	10,98 ± 0,269 ^a	10,84 ± 0,053 ^{a,b}	10,80 ± 0,079 ^{a,b}	6,98 ± 0,170 ^c
3 dias	10,69 ± 0,064 ^a	10,55 ± 0,130 ^a	10,55 ± 0,140 ^a	10,45 ± 0,173 ^{a,b}	6,73 ± 0,111 ^c
pH 7 dias	10,73 ± 0,104 ^a	10,72 ± 0,117 ^a	10,20 ± 0,257 ^b	10,44 ± 0,346 ^b	6,66 ± 0,042 ^c
14 dias	10,17 ± 0,320 ^a	10,37 ± 0,326 ^a	9,60 ± 0,343 ^b	10,05 ± 0,503 ^a	6,32 ± 0,078 ^c
21 dias	9,99 ± 0,214 ^a	10,27 ± 0,210 ^a	10,16 ± 0,201 ^b	10,15 ± 0,338 ^b	6,28 ± 0,135 ^c

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0.05$)

Alteração volumétrica

BR e BR/TEO mostraram aumento de volume enquanto BCS e BCS/TEO tiveram perda de volume. Não houve diferença significativa entre BCS e BCS/TEO ($P > 0.05$). Houve diferença significativa entre BR e BR/TEO ($P < 0.05$), pois a adição do óleo diminuiu a alteração volumétrica. Também foi possível observar diferença significativa ao comparar as extremidades com a parte interna das amostras para todos os materiais associados ou não ao TEO ($P < 0.05$). A parte interna das amostras apresentou menor alteração volumétrica.

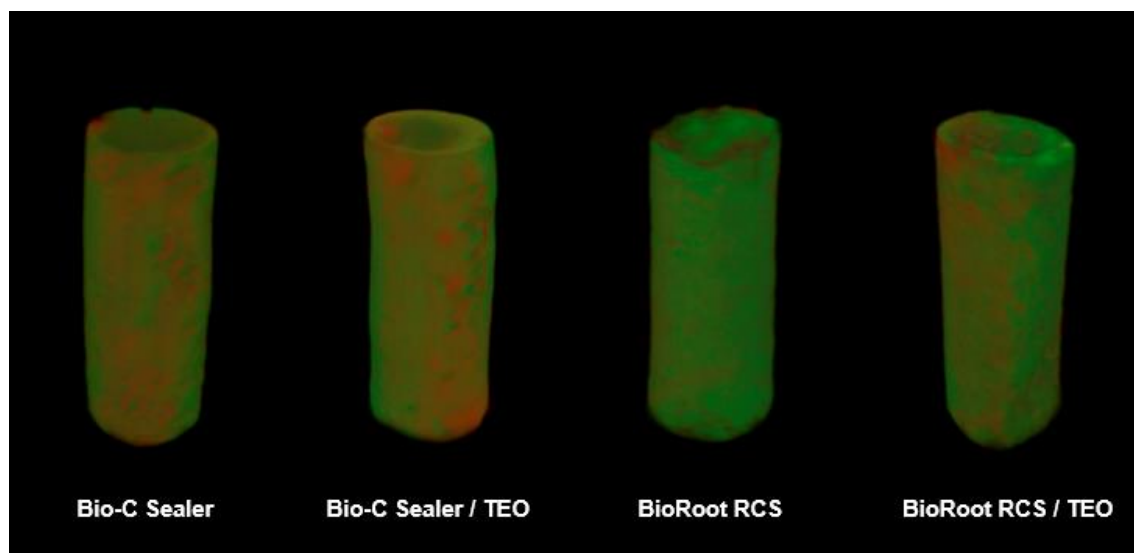


Figura 1 - Reconstruções tridimensionais de micro-CT mostrando sobreposição do volume dos materiais antes (vermelho) e após (verde) imersão em PBS por 7 dias. Áreas densas em verde indicam ganho de volume, enquanto áreas em vermelho indicam perda de volume.

Tabela 3 - Média e desvio padrão do percentual de alteração volumétrica dos materiais reparadores após o período de sete dias de imersão em PBS.

	BCS	BCS/TEO	BR	BR/TEO
Extremidade	-0,334 ± 0,061 ^{cA}	-0,424 ± 0,097 ^{cA}	0,609 ± 0,192 ^{aA}	0,288 ± 0,102 ^{bA}
Parte interna	-0,240 ± 0,009 ^{cB}	-0,267 ± 0,073 ^{cB}	0,381 ± 0,180 ^{aB}	0,143 ± 0,080 ^{bB}

*Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0.05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística na mesma coluna ($P < 0.05$).

Atividade antimicrobiana

Todos os materiais demonstraram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* quando comparados com o controle ($P < 0.05$). Houve diferença significativa entre os materiais associados e não associados ao TEO ($P < 0.05$). BCS/TEO e BR/TEO mostraram maior redução de UFC mL⁻¹.

Tabela 4 – Média e desvio padrão da atividade antimicrobiana dos materiais avaliados, expressos em UFC mL⁻¹ para TCDM em biofilme de *E. faecalis*, após 15 h de contato

	BCS	BCS/TEO	BR	BR/TEO	CONTROLE
UFC mL ⁻¹	3,44 ± 0,61 ^a	0 ± 0 ^b	3,18 ± 0,36 ^a	0 ± 0 ^b	7,96 ± 0,19 ^c

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0.05$). Os resultados foram expressos em log₁₀.

DISCUSSÃO

A adição de *Thyme Essential Oil* (TEO) não alterou tempo de presa e pH dos cimentos biocerâmicos Bio-C Sealer (BCS) e BioRoot RCS (BR). Entretanto, reduziu a alteração volumétrica de BR e aumentou a atividade antimicrobiana dos biomateriais contra *E. faecalis*. Sendo assim, a hipótese nula deste estudo foi parcialmente aceita.

BCS apresentou maior tempo de presa que BR, enquanto BR/TEO demonstrou os menores valores. Resultados de tempo de presa do presente estudo para BCS concordam com estudo de Zordan-Bronzel et al. (5). Entretanto, nossos resultados para BR mostram maiores valores para tempo de presa que outros estudos que empregaram discos metálicos para o teste (23,24). A hidratação do BR tem início na manipulação com a incorporação do líquido ao pó, enquanto o BCS necessita da umidade contida nos túbulos dentinários ou no modelo de teste *in vitro* (25). Embora apresentem diferentes mecanismos de hidratação, BCS e BR sem adição de TEO demonstraram tempos de presa semelhantes.

A estabilidade volumétrica dos cimentos endodônticos contribui para a manutenção do selamento diminuindo o insucesso do tratamento (26,27). A adição de TEO não interferiu na alteração volumétrica de BCS, que demonstrou perda de volume menor que 1% após imersão em PBS por 7 dias, conforme já relatado (28). BR apresenta capacidade de absorver água (7), o que pode ser relacionado ao aumento volumétrico observado. Entretanto, BR/TEO obteve um ganho de volume significativamente menor que BR, sugerindo que o TEO reduziu a capacidade de absorção de água pelo material. Além disso, houve diferença significativa ao comparar os resultados obtidos para as extremidades e o centro da amostra de todos os materiais, o que pode ser relacionado ao contato direto com o PBS nas extremidades resultando em solubilização ou captação de fluídos, o que não ocorre no material contido no centro do tubo.

A atividade antimicrobiana dos cimentos biocerâmicos pode ser relacionada à sua capacidade de liberação de íons hidroxila durante o processo de hidratação (2,3). Os resultados do presente estudo demonstraram que todos os materiais, associados ou não ao TEO, apresentam capacidade de alcalinização do meio, o que corrobora com outros estudos (5,7,8). O pH acima de 9 inativa enzimas da membrana celular das bactérias (2).

O teste de contato direto modificado (TCDM) permite a avaliação do efeito antimicrobiano de materiais endodônticos sobre microrganismos organizados em biofilme (12). O presente estudo avaliou os materiais em contato direto com o biofilme produzido sobre discos de hidroxiapatita. A avaliação de MTA Fillapex (Angelus, Paraná, Brasil) e TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) empregando metodologia similar demonstrou atividade antimicrobiana (22,29).

Todos os materiais avaliados neste estudo demonstraram atividade antimicrobiana quando comparados ao controle. BCS e BR apresentam alguma atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* (30,31). Entretanto, há uma constante busca por substâncias que melhorem a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos (32) que inclui substâncias naturais com propriedades antimicrobianas (33) que não promovem aumento da resistência antimicrobiana. TEO apresenta controle efetivo em biofilmes polimicrobianos com microrganismos comumente encontrados na microbiota oral (34). TEO misturado ao óxido de zinco no preparo da pasta para obturação de dentes decíduos demonstrou melhor ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* quando comparado ao óxido de zinco misturado ao eugenol (35). BCS/TEO e BR/TEO apresentaram maior atividade antimicrobiana de *E. faecalis*. Estes resultados sugerem um efeito adicional do TEO à ação antimicrobiana dos cimentos de silicatos de cálcio. O efeito adicional proporcionado pelo TEO pode ser justificado pela capacidade de romper a membrana lipídica levando a morte da bactéria (14).

No presente estudo os cimentos associados ao TEO promoveram uma maior redução de UFC⁻¹ de *E. faecalis*. Este resultado pode representar uma alternativa para novas formulações visando aumentar a atividade antimicrobiana de cimentos obturadores de silicatos de cálcio.

CONCLUSÃO

Considerando a metodologia utilizada, a adição de *Thyme Essential Oil* aos cimentos Bio-C Sealer e BioRoot RCS não interferiu no tempo de presa e pH, e reduziu a alteração volumétrica do BioRoot. A adição de *Thyme Essential Oil* aos cimentos aumentou a atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

1. Donnermeyer D, Bürklein S, Dammaschke T, Schäfer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology*. 2019 Oct;107(4):421-436.
2. Barbosa VM, Pitondo-Silva A, Oliveira-Silva M *et al*. Antibacterial Activity of a New Ready-To-Use Calcium Silicate-Based Sealer. *Braz Dent J*. 2020 Nov-Dec;31(6):611-616.
3. Benetti F, Gomes-Filho JE, de Azevedo-Queiroz IO *et al*. Biological assessment of a new ready-to-use hydraulic sealer. *Restor Dent Endod*. 2021 Mar 24;46(2):e21.
4. Gaudin A, Tolar M, Peters OA. Cytokine Production and Cytotoxicity of Calcium Silicate-based Sealers in 2- and 3-dimensional Cell Culture Models. *J Endod*. 2020 Jun;46(6):818-826.
5. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, *et al*. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. *J Endod* 2019;45:1248-52.
6. Gilles R, Oliver M (2012) Dental material. Patent No. US 0270184 A1.
7. Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J*. 2017 Dec;50 Suppl 2:e120-e136.
8. Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P, Camilleri J. Influence of environment on testing of hydraulic sealers. *Sci Rep*. 2017;7(1):17927.
9. Long L, Kreft JU, Camilleri J. Antimicrobial and ultrastructural properties of root canal filling materials exposed to bacterial challenge. *J Dent*. 2020 Feb;93:103283.
10. Schilder, H. Filling root canals in three dimensions. *J. Endod*. 2006, 32, 281–290.
11. Zargar N, Marashi MA, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection. *Iran J Microbiol*. 2019 Apr; 11(2): 120–128.
12. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG and Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J*. 2019 May;52(5):604-628.
13. Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*. 2020 Sep 9;25(18):4125.

14. Perez AP, Perez N, Lozano CMS *et al.* The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicle. *Phytomedicine* 2019, 57, 339–351.
15. Alves M, Goncalves MJ, Zuzarte M *et al.* Unveiling the Antifungal Potential of Two Iberian Thyme Essential Oils: Effect on *C. albicans* Germ Tube and Preformed Biofilms. *Front Pharmacol.* 2019 May 2;10:446.
16. Aires A, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. Antimicrobial Effects of Essential Oils on Oral Microbiota Biofilms: The Toothbrush In Vitro Model. *Antibiotics (Basel).* 2020 Dec 29;10(1):21.
17. Marinković J, Čulafić DM, Nikolić B, Đukanović S, Marković T, Tasić G, Ćirić A, Marković D. Antimicrobial potential of irrigants based on essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Thymus zygis* towards in vitro multispecies biofilm cultured in ex vivo root canals. *Arch Oral Biol.* 2020 Sep;117:104842.
18. Reiznautt CM, Ribeiro JS, Kreps E *et al.* Development and properties of endodontic resin sealers with natural oils. *J Dent.* 2021 Jan;104:103538.
19. Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru J.M, Tanomaru-Filho M. Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *J Appl Oral Sci.* 2017, 25(4), 374-380.
20. Ochoa-Rodríguez VM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Faria G. Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180429.
21. Torres FFE, Jacobs R, EzEldeen M, Guerreiro-Tanomaru JM., Dos Santos BC, Lucas-Oliveira É, Tanomaru-Filho, M. Micro-computed tomography high resolution evaluation of dimensional and morphological changes of 3 root-end filling materials in simulated physiological conditions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2020, 31(2), 14.
22. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J.* 2019 Jul;52(7):979-986.
23. Baghdadi I, AbuTarboush B, Zaazou A, et al. Effect of sintering temperature on the physiochemical properties, microstructure, and compressive strength of a bioceramic root canal sealer reinforced with multi-walled carbon nanotubes and titanium carbide. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021;119:104524.
24. Kapralos V, Rukke HV, Ørstavik D, Koutroulis A, Camilleri J, Sunde PT. Antimicrobial and physicochemical characterization of endodontic sealers after exposure to chlorhexidine digluconate. *Dent Mater.* 2021;37(2):249-263.

25. 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 Jan;41(1):111-24.
26. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, Belladonna FG, De-Deus GA, Lima IC, et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J* 2017;50:407-414.
27. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, Espir CG, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Solubility, Porosity, Dimensional and Volumetric Change of Endodontic Sealers. *Braz Dent J* 2019;30:368-373.
28. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2020;53(3):385-391.
29. Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46:755-762.
30. Alsubait S, Albader S, Alajlan N, Alkhunaini N, Niazy A, Almahdy A. Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate- and epoxy resin-based endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. *Odontology.* 2019;107(4):513-520.
31. Barbosa VM, Pitondo-Silva A, Oliveira-Silva M, et al. Antibacterial Activity of a New Ready-To-Use Calcium Silicate-Based Sealer. *Braz Dent J.* 2020;31(6):611-616.
32. 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):1353-1358.
33. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother Res.* 2018;32(9):1688-1706.
34. Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Food Drug Anal.* 2017 Apr;25(2):403-408.
35. Thosar NR, Chandak M, Bhat M, Basak S. Evaluation of Antimicrobial Activity of Two Endodontic Sealers: Zinc Oxide with Thyme Oil and Zinc Oxide Eugenol against Root Canal Microorganisms- An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2018;11(2):79-82.

4 DISCUSSÃO

Há uma busca constante por substâncias que sejam capazes de melhorar a ação antimicrobiana de materiais endodônticos⁵⁴. Os óleos essenciais possuem mecanismos que não permitem o desenvolvimento de resistência bacteriana⁵⁵. O *Thyme Essential Oil* (TEO) é uma substância natural que apresenta ação antimicrobiana contra microrganismos endodônticos presentes em infecções persistentes⁵⁶⁻⁵⁸. Sendo assim, foi realizado a incorporação de 1% de TEO aos cimentos BioC Repair (BCR), NeoMTA 2 (NMTA2), BioC Sealer (BCS) e BioRoot RCS (BR) com o objetivo de verificar a ação antimicrobiana dessa associação.

Com base nos resultados do presente estudo, a incorporação de TEO não alterou o tempo de presa e pH dos cimentos à base de silicatos de cálcio reparadores e obturadores. É importante avaliar as propriedades físicas dos materiais uma vez que alterações na sua composição podem modificar suas propriedades e, conseqüentemente, alterar seu comportamento e sua resposta bioativa¹⁷. Em relação a alteração volumétrica não houve interferência para os cimentos reparadores, no entanto, apresentou diferença significativa entre BR e BRT/TEO.

NMTA2 puro e associado apresentaram maior tempo de presa que BCR puro e associado ao TEO. Em relação aos materiais obturadores, BCS apresentou tempo de presa mais longo que BRT/TEO. NMTA2 e BRT são materiais apresentados na forma pó-líquido. É importante levar em consideração que as proporções utilizadas na manipulação desses cimentos podem alterar suas propriedades físico-químicas⁵⁹, diferente de BCR e BCS que são materiais prontos para uso. Cimentos à base de silicatos de cálcio requerem água para o processo de hidratação⁶⁰. Diante disso, moldes de gesso foram confeccionados e hidratados previamente a inserção dos materiais para o teste, com base no preconizado pelas normas ISO 6876/2012 para materiais que necessitam de umidade para a presa.

Os cimentos obturadores devem preencher ramificações, irregularidades e espaços entre os cones de guta percha e a dentina⁵³, promovendo selamento do sistema de canais radiculares. A estabilidade volumétrica é de extrema importância para o tratamento endodôntico, uma vez que a alteração da mesma pode propiciar uma reinfecção levando a falhas do tratamento^{47,61}. A adição de TEO não interferiu

na alteração volumétrica de BCR, NMTA2 e BCS, entretanto, reduziu significativamente o ganho de volume para BR/TEO. Para todos os grupos a alteração volumétrica foi menor que 1%. Além disso, houve diferença significativa ao comparar os resultados da análise das extremidades e do centro da amostra, o que pode ser explicado devido ao fato de o centro não estar em contato direto com o meio de imersão. Dessa forma, o centro não sofre solubilização ou não possui a mesma capacidade de absorver fluídos como o material presente nas extremidades.

Ainda que os cimentos à base de silicatos de cálcio apresentem potencial de alcalinização do meio, esta propriedade por si só não é capaz de eliminar completamente microrganismos residuais que podem levar a uma reinfecção^{20,62}. Neste estudo todos os materiais, sejam eles obturadores ou reparadores, apresentaram potencial de alcalinização do meio, corroborando com estudos prévios^{16,21,25}.

O TCDM pode ser utilizado para a avaliação da atividade antimicrobiana de cimentos obturadores e reparadores. Neste estudo o biofilme foi induzido sobre discos de hidroxiapatita e posteriormente colocado em contato com suspensões dos materiais. Estudos prévios mostraram que NeoMTA Plus não foi efetivo contra biofilmes mono e dual espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*¹⁸. Não existem estudos na literatura que avaliaram a atividade antimicrobiana de NMTA2 e BCR, contudo, no presente estudo demonstraram apresentar propriedade antimicrobiana. BCS e BR também demonstraram atividade antimicrobiana corroborando com resultados já relatados na literatura^{22,23,26}.

O aumento da resistência bacteriana tem conduzido o uso de substâncias naturais com propriedades antimicrobianas⁶³. TEO apresenta controle efetivo contra biofilmes polimicrobianos compostos por *C. albicans* com *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* ou *P. aeruginosa*⁴². Em estudo prévio, TEO foi usado como substituto do eugenol na manipulação de pasta endodôntica para obturação de dentes decíduos e demonstrou boa ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*⁶⁴. Nossos resultados mostraram que a adição de TEO representou um efeito adicional na redução de UFC⁻¹ de *E. faecalis* para os cimentos reparadores e obturadores.

Diante da impossibilidade de eliminar completamente os microrganismos contidos nos canais radiculares⁵⁴, é desejável que os cimentos apresentem atividade

antimicrobiana³⁴. Neste sentido, a incorporação de TEO resultou em melhor atividade antimicrobiana destes biomateriais, sendo uma alternativa promissora para novas formulações.

5 CONCLUSÃO

Publicação 1 – A adição do *Thyme Essential Oil* não interfere no tempo de presa, pH e alteração volumétrica dos cimentos Bio-C Repair e NeoMTA2. Ainda, a associação ao *Thyme Essential Oil* promoveu maior atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*.

Publicação 2 – Considerando a metodologia utilizada, a adição de *Thyme Essential Oil* aos cimentos Bio-C Sealer e BioRoot RCS não interferiu no tempo de presa e pH, e reduziu a alteração volumétrica do BioRoot. A adição de *Thyme Essential Oil* aos cimentos aumentou a atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS*

1. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J*. 2018; 51(3): 284-317.
2. 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.
3. Camilleri J, Ford TP. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006; 39(10): 747–54.
4. Saghir MA, Orangi J, Asatourian A, Gutmann JL, Garcia-Godoy F, Lotfi M et al. Calcium silicate-based cements and functional impacts of various constituents. *Dent Mater J*. 2017; 36(1): 8-18.
5. Cintra LT, Benetti F, Queiroz IOA, Lopes JMA, Oliveira SHP, Araújo GS et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod*. 2017; 43(5): 774-8.
6. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2017; 51(3): 177–205.
7. 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.
8. Ha WN, Nicholson TM, Kahler B, Walsh LJ. Mineral trioxide aggregate: a review of properties and testing methodologies. *Materials*. 2017; 10(11): 1261.
9. Žižka R, Šedý J, Gregor L, Voborná I. Discoloration after regenerative endodontic procedures: a critical review. *Iran Endod J*. 2018; 13(3): 278–84.
10. Donnermeyer D, Bürklein S, Dammaschke T, Schäfer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology*. 2019; 107(4): 421-36.
11. Okamura T, Chen L, Tsumano N, Ikeda C, Komasa S, Tominaga K et al. Biocompatibility of a high-plasticity, calcium silicate-based, ready-to-use material. *Materials (Basel)*. 2020; 13(21): 4770.
12. Koutroulis A, Kuehne SA, Cooper PR, Camilleri J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 19019.

* 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>.

13. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015; 31(4): 351-70.
14. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010; 36(3): 400-13.
15. Lopez-Garcia S, Lozano A, Garcia-Bernal D, Forner L, Llena C, Guerrero-Girones J et al. Biological effects of new hydraulic materials on human periodontal ligament stem cells. *J Clin Med.* 2019; 8(8): 1216.
16. Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR, Grazziotin-Soares R, Ardenghi DM, Scarpato RK et al. Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(3): 1359-66.
17. Jimenez-Sanchez MDC, Segura-Egea JJ, Diaz-Cuenca A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019; 107(6): 2109-20.
18. Jacob VP, Paião LI, da Silva ACG, Magario MKW, Kaneko TY, Martins CM et al. Antimicrobial action of NeoMTA Plus on mono- and dual-species biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: an in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2020; 120: 104925.
19. Rodríguez-Lozano FJ, Lozano A, López-García S, García-Bernal D, Sanz JL, Guerrero-Gironés J et al. Biomineralization potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)-containing calcium silicate cement. *Clin Oral Investig.* 2021; 26(2): 1427-41.
20. Janini ACP, Bombarda GF, Pelepenko LE, Marciano MA. Antimicrobial activity of calcium silicate-based dental materials: a literature review. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10(7): 865.
21. Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J.* 2017; 50 (2): 120-36.
22. Zancan RF, Di Maio A, Tomson PL, Duarte MAH, Camilleri J. The presence of smear layer affects the antimicrobial action of root canal sealers. *Int Endod J.* 2021; 54(8): 1369-82.
23. Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P, Camilleri J. Influence of environment on testing of hydraulic sealers. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 17927.
24. Long L, Kreft JU, Camilleri J. Antimicrobial and ultrastructural properties of root canal filling materials exposed to bacterial challenge. *J Dent.* 2020; 93: 103283.
25. Kharouf N, Arntz Y, Eid A, Zghal J, Sauro S, Haikel Y et al. Physicochemical and antibacterial properties of novel, premixed calcium silicate-based sealer compared to powder-liquid bioceramic sealer. *J Clin Med.* 2020; 9(10): 3096.

26. Gaudin A, Tolar M, Peters OA. Cytokine production and cytotoxicity of calcium silicate-based sealers in 2- and 3-dimensional cell culture models. *J Endod.* 2020; 46(6): 818-26.
27. Siqueira JF Jr, Antunes HS, Pérez AR, Alves FRF, Mdala I, Silva EJNL et al. The apical root canal system of teeth with posttreatment apical periodontitis: correlating microbiologic, tomographic, and histopathologic findings. *J Endod.* 2020; 46(9): 1195-1203.
28. Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: the usual suspects. *Eur J Dent.* 2016; 10(1): 144–7.
29. Prada I, Mico-Munoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019; 24(3): 364–72.
30. Zargar N, Marashi MA, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection. *Iran J Microbiol.* 2019; 11(2): 120–28.
31. Persoon IF, Crielaard W, Ozok AR. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. *Int. Endod. J.* 2017; 50(11): 1055–66.
32. Siqueira Jr JF. Etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34(1): 1-10.
33. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J.* 2019; 52(5): 604-28.
34. Grossman L. Antimicrobial effect of root canal cements. *J Endod.* 1980; 6(6): 594–7.
35. Argueta-Figueroa L, Delgado-García JJ, García-Contreras R, Martínez-Alvarez O, Santos-Cruz J, Oliva-Martínez C et al. Mineral trioxide aggregate enriched with iron disulfide nanostructures: an evaluation of their physical and biological properties. *Eur J Oral Sci.* 2018; 126(3): 234-43.
36. Nikhil V, Madan M, Agarwal C, Suri N. Effect of addition of 2% chlorhexidine or 10% doxycycline on antimicrobial activity of biodentine. *J Conser Dent.* 2014; 17(3): 271-5.
37. Paunovska ML, Coleman NJ, Stevanovic MM, Dimkov AG, Gabric D, Gjorgievska ES. Effects of addition of quaternary ammonium antimicrobial compounds into root canal sealers. *Eur J Dent.* 2019;13(2): 243-7.
38. Jacinto RC, Linhares-Farina G, Sposito Oda S, Zanchi CH, Cenci MS. Influence of 2% chlorhexidine on pH, calcium release and setting time of a resinous MTA-based root-end filling material. *Braz Oral Res.* 2015; 29(1806): 83242015000100237.

39. Yavari HR, Shahi S, Rahimi S, Shakouie S, Roshangar L, Mesgari Abassi M et al. Connective tissue reaction to white and gray MTA Mixed with distilled water or chlorhexidine in rats. *Iran Endod J.* 2009; 4(1): 25-30.
40. Manochehrifar H, Parirokh M, Kakooei S, Oloomi MM, Asgary S, Eghbal MJ et al. The effect of Mineral Trioxide Aggregate mixed with chlorhexidine as direct pulp capping agent in dogs teeth: a histologic study. *Iran Endod J.* 2016; 11(4): 320-4.
41. Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *J Microbiol Biotechnol.* 2017; 27(3): 429-38.
42. Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against gram-positive and gram-negative bacteria. *J Food Drug Anal.* 2017; 25(2): 403-8.
43. Oliveira JR, Viegas DJ, Martins APR, Carvalho CAT, Soares CP, Camargo SEA et al. *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Arch Oral Biol.* 2017; 82: 271–9.
44. Zuzarte M, Alves-Silva JM, Alves M, Cavaleiro C, Salgueiro L, Cruz MT. New insights on the anti-inflammatory potential and safety profile of *Thymus carnosus* and *Thymus camphoratus* essential oils and their main compounds. *J. Ethnopharmacol.* 2018; 225:10–7.
45. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, 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.
46. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate-based sealer, Bio-C Sealer. *J Endod* 2019; 45(10): 1248-52.
47. 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.
48. Torres FFE, Jacobs R, EzEldeen M, Guerreiro-Tanomaru JM., Dos Santos BC, Lucas-Oliveira É et al. Micro-computed tomography high resolution evaluation of dimensional and morphological changes of 3 root-end filling materials in simulated physiological conditions. *J Mater Sci Mater Med.* 2020; 31(2): 14.
49. 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.
50. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 755-62.

51. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J*. 2019; 52(7): 979-86.
52. Farrugia C, Lung CYK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The relationship of surface characteristics and antimicrobial performance of pulp capping materials. *J Endod*. 2018; 44(7): 1115-20.
53. Somma F, Cretella G, Carotenuto M, Pecci R, Bedini R, De Biasi M et al. Quality of thermoplasticized and single point root fillings assessed by micro-computed tomography. *Int Endod J*. 2011; 44(4): 362-9.
54. 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.
55. Perez AP, Perez N, Lozano CMS *et al*. The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicle. *Phytomedicine* 2019; 57: 339–51.
56. Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and thyme essential oil-new insights into selected Therapeutic Applications. *Molecules*. 2020; 25(18): 4125.
57. Alves M, Goncalves MJ, Zuzarte M, Alves-Silva JM, Cavaleiro C, Cruz MT et al. Unveiling the antifungal potential of two iberian thyme essential oils: effect on *C. albicans* germ tube and preformed biofilms. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 446.
58. Aires A, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. Antimicrobial effects of essential oils on oral microbiota biofilms: the toothbrush in vitro model. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 10(1): 21.
59. Bedran NR, Nadelman P, Magno MB, de Almeida Neves A, Ferreira DM, Braga Pintor AV et al. Does calcium hydroxide reduce endotoxins in infected root canals? systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2020; 46(11): 1545-58.
60. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2015; 13(1): 43-60.
61. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, Espir CG, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Solubility, porosity, dimensional and volumetric Change of Endodontic Sealers. *Braz Dent J*. 2019; 30(4): 368-73.
62. Shen YF, Huang TH, Ng HY, Fang HY, Hsu TT. Mineral trioxide aggregate mixed with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic antimicrobial strategy in hard tissue regeneration. *Materials (Basel)*. 2018; 11(9): 1734.

63. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MDM, Segura-Carretero A et al. Thymol, thyme, and other plant sources: health and potential uses. *Phytother Res*. 2018; 32(9): 1688-1706.
64. Thosar NR, Chandak M, Bhat M, Basak S. Evaluation of antimicrobial activity of two endodontic sealers: zinc oxide with thyme oil and zinc oxide eugenol against root canal microorganisms- an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018; 11(2): 79-82.

APÊNDICE A - METODOLOGIA EXPANDIDA

Cálculo para concentração de 1% do Thyme Essential Oil (TEO)

O cálculo para chegar a concentração de 1% do TEO foi realizado com base na densidade deste óleo, que é de 0.917 g/mL a 25 °C. Inicialmente foi calculado a quantidade de óleo necessária para atingir o teor de 1% em 1 g de material. Para isto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ g} & \text{-----} & 100\% \\ x \text{ g} & \text{-----} & 1\% \end{array}$$

$$x = 10 \text{ mg}$$

Em seguida, foi realizado o cálculo para checar a quantidade de óleo equivalente a 10 mg utilizando a seguinte equação:

$$\begin{array}{rcl} 0.917 \text{ g} & \text{-----} & 1\text{mL} \\ 917 \text{ mg} & \text{-----} & 1000 \mu\text{l} \\ 10 \text{ mg} & \text{-----} & y \end{array}$$

$$y = 10,9 \mu\text{l}$$

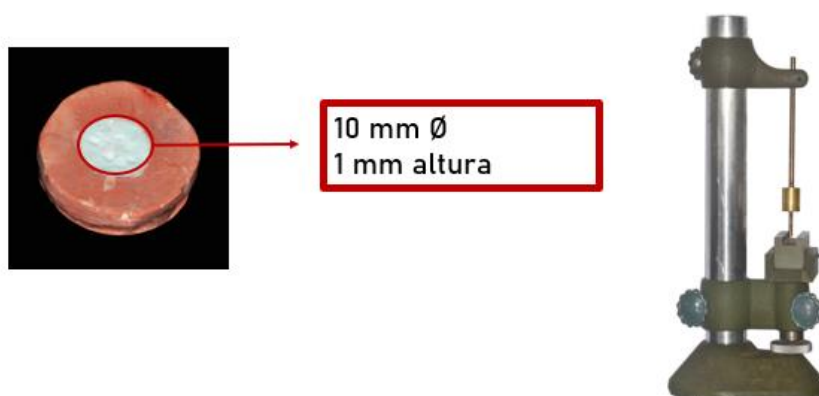
Desta forma, com base nos cálculos realizados acima, para cada 1 grama de cimento foi adicionado aproximadamente 11 µl de TEO.

Tempo de presa

Este teste foi realizado com base na ISO 6876:2012. Moldes de gesso tipo IV (Durone IV Salmon; Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil), com uma cavidade de 10 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade foram confeccionados. Em seguida, estes moldes foram imersos em água destilada e armazenados em estufa a 37 °C por um

período de 24 h para sua hidratação. Decorridas as 24 h os moldes foram preenchidos deixando a superfície a mais lisa possível para facilitar a visualização da marca da agulha durante o teste. As amostras foram mantidas em estufa a 37° C com umidade relativa de 95% durante todo o período do experimento, sendo retirados apenas para as análises. Para o tempo de presa inicial uma agulha Gilmore de 100 g com ponta ativa de 2 mm foi colocada verticalmente sobre a superfície do material. A aferição foi realizada até que não houvesse marcação na superfície do cimento, sendo determinado o tempo de presa da manipulação até este momento.

Figura 1 – Molde de gesso e aparato de Gilmore



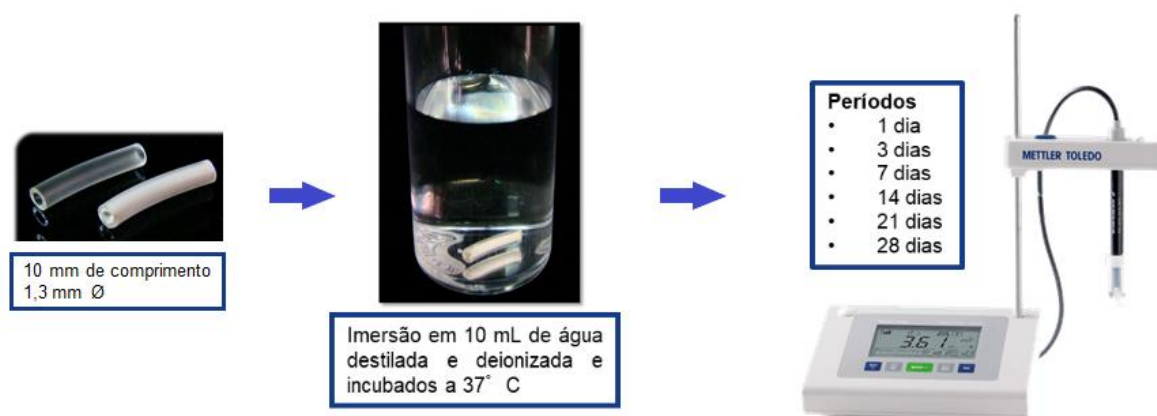
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

pH

Para a avaliação da capacidade de alcalinização do meio, tubos de polietileno (Embramed, São Paulo, SP, Brasil) com 10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro ($n = 10$) foram confeccionados e preenchidos com os cimentos. Após o preenchimento cada tubo foi imerso em 10 mL de água destilada e deionizada e armazenado em estufa a 37 °C. O pH foi avaliado nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Em cada período avaliado, previamente a mensuração do pH, os tubos foram transferidos para novos frascos contendo 10 mL de água destilada e deionizada e armazenados novamente em estufa a 37°C. A solução resultante de cada um dos frascos nos seus respectivos períodos foi utilizada para a aferição do

pH, realizada com pHmetro digital calibrado (Digimed, São Paulo, Brasil). O meio de imersão foi trocado a cada período experimental, sendo o pH da água deionizada em recipientes sem a imersão de amostras foi utilizado como controle. O pH médio de cada grupo em cada período experimental foi calculado após as medições.

Figura 2 – Tubos de polietileno preenchidos e imersos; pHmetro digital



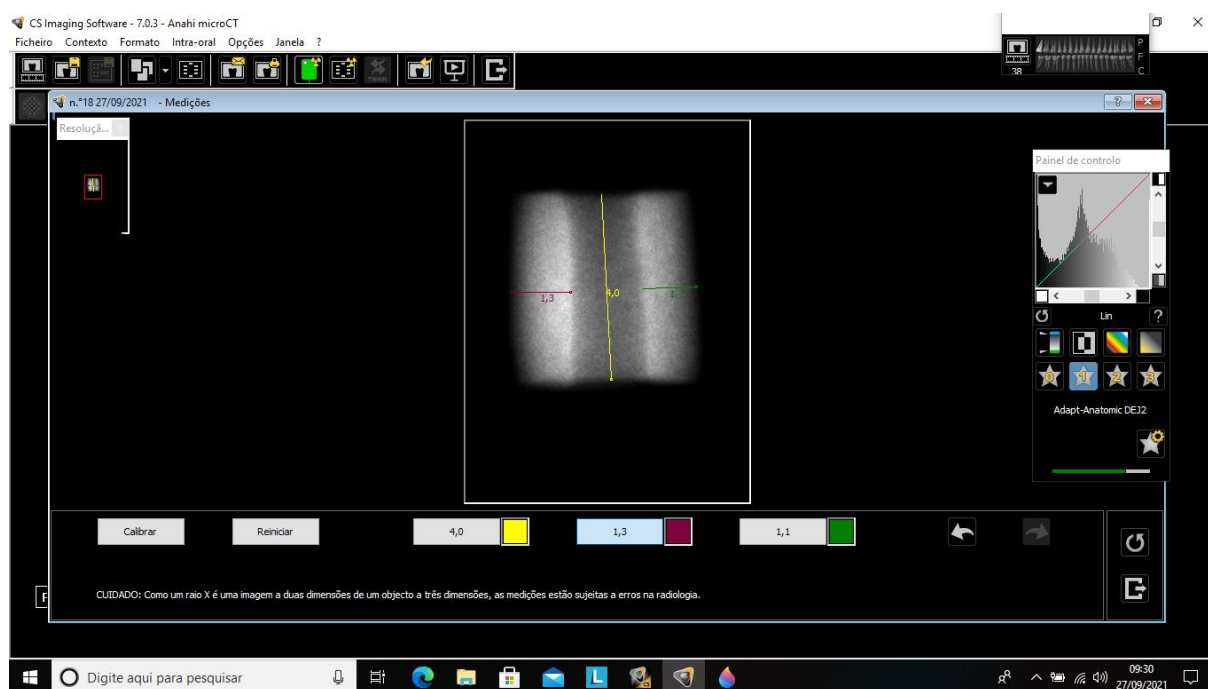
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Alteração volumétrica em microCT

Após a aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), dentes bovinos extraídos (n=5) foram selecionados e radiografias digitais (Kodak RVG 6100 Atlanta, GA, USA) foram realizadas para confirmar ausência de anomalias. As raízes foram seccionadas transversalmente em máquina de precisão de corte Isomet 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), obtendo espécimes com 4 mm. Posteriormente, um único operador previamente calibrado realizou o preparo dos canais radiculares utilizando brocas Gates-Glidden número 5 para confecção de tubos cilíndricos com diâmetro interno 1,5 mm e espessura das paredes de aproximadamente 1,0 mm. Durante todo o preparo, os canais foram inundados com solução de NaOCl a 1%. A irrigação final foi realizada com 5 mL de NaOCl 2,5% e 5 mL de EDTA 17%, por 3 min, seguido de água destilada. Após a confecção foram

realizadas radiografias digitais (Kodak RVG 6100 Atlanta, GA, USA) para confirmar as dimensões dos tubos preparados. (Figura 3)

Figura 3 – Radiografia digital e mensuração das medidas do tubo de dentina

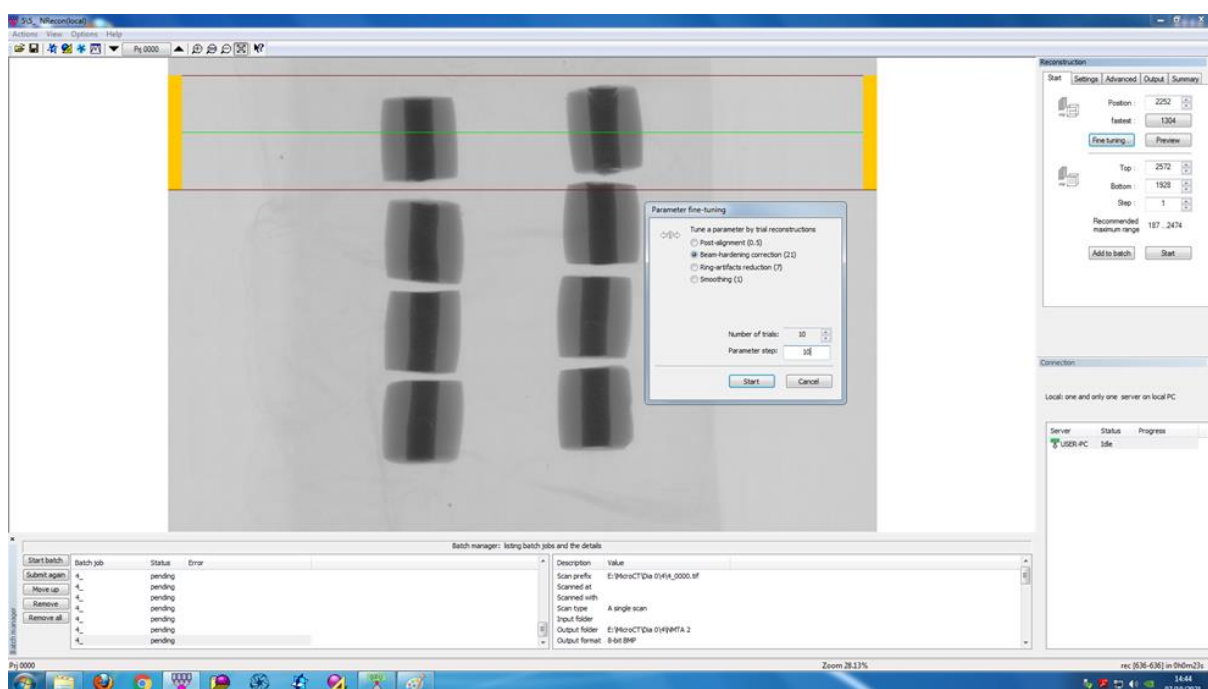


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após o preparo, os espécimes foram imersos em água destilada e armazenados em estufa a 37°C por 24 h. Decorridas as 24 h, as cavidades foram preenchidas com os cimentos utilizando um kit de condensadores (Ref.: 324501, nºs 2, 3 e 4; Golgran; São Caetano do Sul, SP, Brasil). Após o preenchimento as amostras foram mantidas em estufa a 37°C e umidade relativa por 24 h. Na sequência, os espécimes foram submetidos ao escaneamento em microtomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: resolução de 9 µm, frame 4, filtro de cobre e alumínio, rotação 180°, 80 kV e 300 uA. Após o escaneamento das cavidades preenchidas pelos materiais, os espécimes foram imersos em PBS (pH 10.4) por 7 dias e mantidos em estufa a 37 °C. Novos escaneamentos foram realizados após este período.

A avaliação da alteração volumétrica dos materiais foi realizada pela análise quantitativa das amostras, permitindo o cálculo da diferença no volume total dos materiais, em mm³, antes e após a imersão. As imagens obtidas foram reconstruídas com o auxílio do programa NRecon (V1.6.4,7; SkyScan, Bélgica) e os parâmetros foram definidos individualmente para cada material como descrito na tabela 1 (Figura 4).

Figura 4 – Definição dos parâmetros para reconstrução das imagens



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

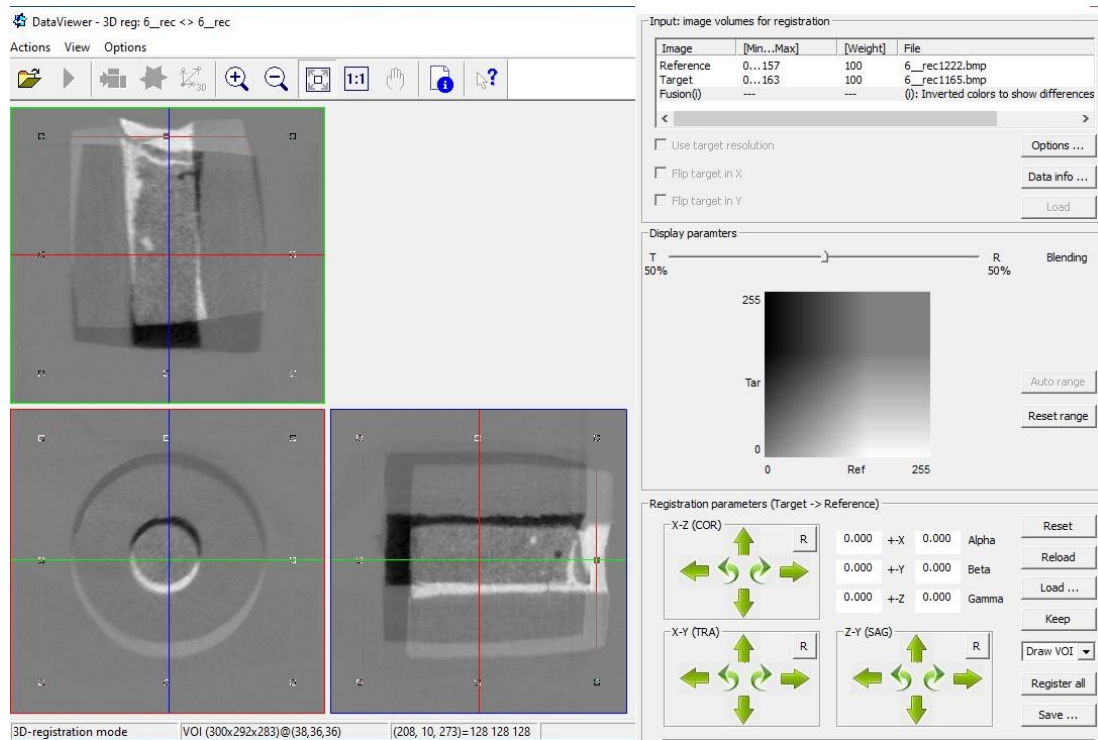
Tabela 1- Parâmetros para reconstrução das imagens no software Nrecon

Material	Beam-hardening	Ring	Smoothing
BCR	11	3	1
BCR/TEO	11	3	1
NMTA2	21	7	1
NMTA2/TEO	21	7	1
BCS	11	3	1
BCS/TEO	11	3	1
BRT	21	5	2
BRT/TEO	21	5	2

Fonte: Elaboração própria.

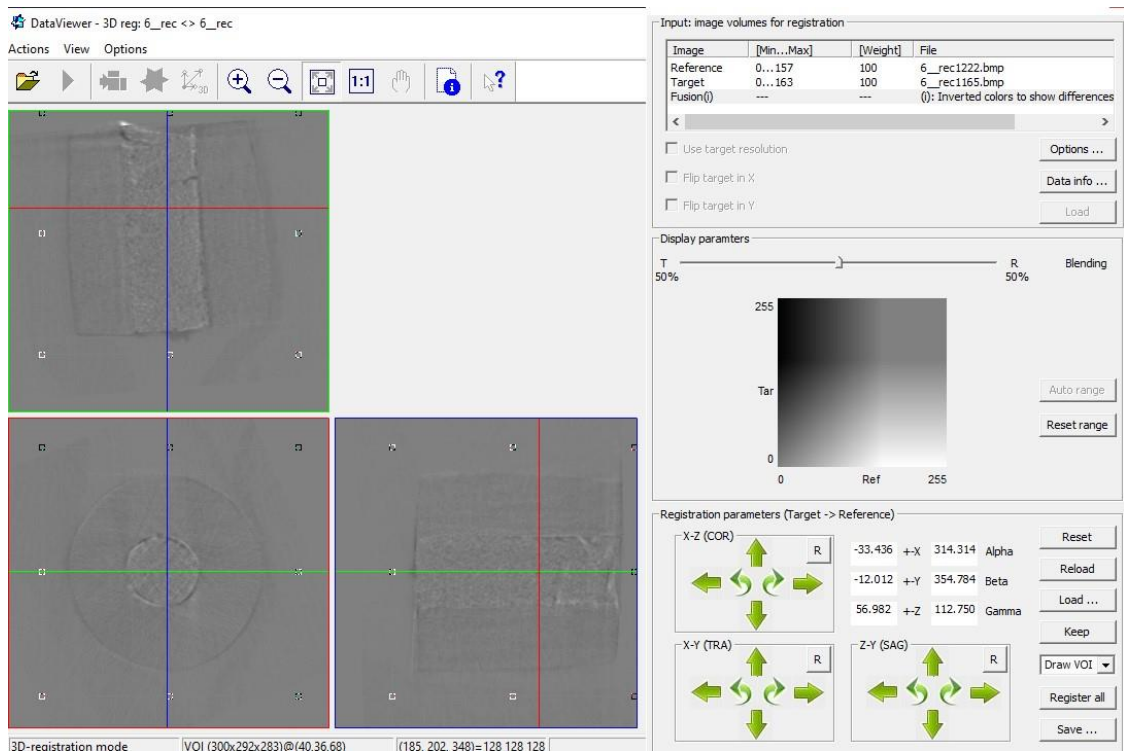
As imagens reconstruídas em 3D foram registradas nos diferentes períodos utilizando o programa Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica) para realizar as sobreposições (Figura 5 e 6) e analisadas quantitativamente no programa CTAn (V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica) (Figura 7). Cada espécime foi dividido em duas partes de 2 mm cada para análise da alteração volumétrica. Também foi realizada uma análise adicional dos 2 mm do centro da amostra (Figura 8). Para a análise foram considerados os valores obtidos após a presa. As imagens foram analisadas quantitativamente no CTAn (V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica).

Figura 5 – Sobreposição das imagens nos diferentes períodos



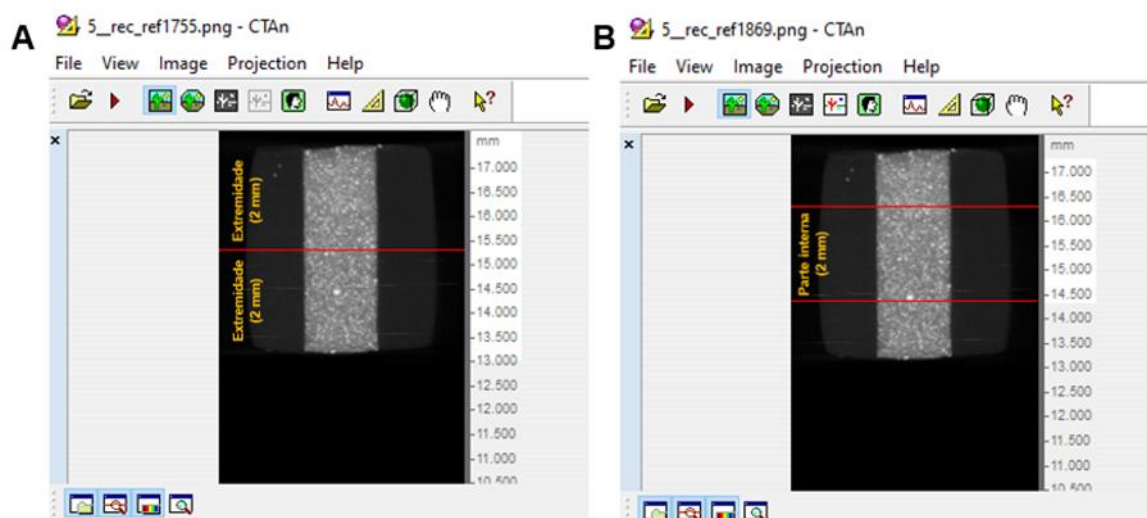
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 6 – Imagens sobrepostas nos diferentes períodos



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 8 - Imagem representativa da divisão da amostra no software CTAn para análise da alteração volumétrica: A, Extremidade e B, Parte interna



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Análise da atividade antimicrobiana

Teste de contato direto modificado (TCDM)

Foram utilizados como substrato para a formação do biofilme discos de hidroxiapatita (Instituto de Física- USP- São Carlos). Previamente ao experimento, os discos foram inseridos em tubo de ensaio contendo água destilada, e autoclavados a 120°C por 20 minutos. Para a indução do biofilme, os discos foram submersos em TSb (2 mL) contendo 1% do inóculo (1×10^8 UFC mL⁻¹) de *E. faecalis*. O biofilme foi desenvolvido em placa de cultura de 24 poços, em incubadora de bancada com agitação orbital (Modelo 0816M28, Quimis aparelhos científicos LTDA, Diadema, SP, Brasil) a 37°C com 80rpm, o biofilme permaneceu em ambiente de micro-aerófilia por 7 dias, com troca do meio de cultura total a cada 24 horas,

O teste de contato direto foi realizado com eluído do cimento fresco (50mg/mL). O número de amostras foi de 6 para cada eluído. Os eluídos foram preparados na concentração de 50mg/mL em água destilada esterilizada, agitados e mantidos em repouso em tubos falcon de 15mL, em estufa a 37°C por 48 horas. Os discos de hidroxiapatita foram imersos em tubos tipo eppendorf (500 µL), contendo 300µL de cada eluído. O grupo controle foi solução salina. Os discos permaneceram em contato por 15 horas, em estufa a 37°C.

Decorrido o tempo de contato, os discos de hidroxiapatita que estavam em contato com o eluído foram removidos e individualmente inseridos em tubos de polietileno tipo eppendorf contendo 1mL de solução salina estéril e pérolas de vidro, que foram agitados em vórtex por 1 minuto, com o propósito de permitir a suspensão dos microrganismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e três alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições, foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura Tryptic Soy agar (TSa). As placas permaneceram incubadas por 48 horas a 37°C, e após este período foi realizada a contagem de UFC/mL e os dados submetidos à transformação logarítmica (log10).

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística para determinar a normalidade da distribuição amostral e em seguida aos testes estatísticos complementares com nível de significância de 5%.

ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Propriedades físico-químicas, atividade antimicrobiana, citotoxicidade e potencial bioativo de cimentos biocerâmicos e de associações a antimicrobianos*" registrada com o nº 34/2020, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Juliane Maria Guerreiro Tanomaru** – que envolve a utilização de dentes/ossos bovinos 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 24/02/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Maio/2022
Espécie/linhagem/raça	Dentes bovinos
Nº de animais	140
Peso/Idade	-
Sexo	-
Origem	Zanchetta Indústria de Alimentos Ltda


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

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 – Centro – CEP 14801-903 – Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar – Fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua.four@unesp.br - home page: <http://www.four.unesp.br>

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da
defesa (28 de março de 2024**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2022

Anahi de Paula Melo