



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



Luciana Guilherme Navarro

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

Araraquara

2018



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



Luciana Guilherme Navarro

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

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

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

Araraquara

2018

Navarro, Luciana Guilherme

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

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

Luciana Guilherme Navarro

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

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de mestre em Odontologia

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

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

2º Examinador: Prof. Dr. Bruno Cavalini Cavenago

Araraquara, 15 de Março de 2018

DADOS CURRICULARES

Luciana Guilherme Navarro

NASCIMENTO: 24/02/1992 - Franca- SP

FILIAÇÃO: Edna Lúcia Guilherme Navarro

Eduardo Maura Navarro

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

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

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

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

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

Associação: SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À *CAPES* pela concessão da bolsa de estudo.

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: Dental cements. Endodontics. Root canal obturation.

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

1.1 Cimentos Obturadores à Base de Silicone e Guta-percha

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

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

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

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

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

1.2 Novos Cimentos Obturadores à Base de Silicato de Cálcio

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente estudo foi:

2.1 Proposição Geral

Avaliar algumas propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana de novos cimentos obturadores, comparados ao cimento AH Plus.

2.2 Proposição Específica

A proposição específica foi dividida conforme as publicações 1 e 2:

Publicação 1

Avaliar a citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana dos cimentos GuttaFlow bioseal (GFB) e TotalFill BC (TF), comparados ao cimento AH Plus (AHP).

Publicação 2

Avaliar as propriedades físico-químicas (tempo de presa, solubilidade, radiopacidade, pH e escoamento), alteração volumétrica, citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana dos cimentos NeoMTA Plus (NMTAP) e a nova formulação do MTA Fillapex (MTAF), comparados ao cimento AHP.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1

Citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e efeito antimicrobiano dos novos cimentos à base de silicone e silicato de cálcio*

Resumo

Introdução: Este estudo avaliou citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana dos cimentos GuttaFlow® bioseal (GFB) e TotalFill BC® (TF), em comparação ao AH Plus® (AHP). **Métodos:** Células humanas osteoblásticas Saos-2 foram utilizadas para a avaliação da citotoxicidade por meio dos ensaios de metiltetrazólio (MTT) e vermelho neutro (NR); e da bioatividade celular pela atividade da fosfatase alcalina (ALP) e vermelho de alizarina (ARS). O potencial bioativo foi avaliado em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para avaliação da eficácia antimicrobiana foram utilizados os testes de contato direto sobre células planctônicas e sobre biofilme de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*. Os dados da citotoxicidade e bioatividade celular (ALP) foram submetidos aos testes estatísticos ANOVA-*two-away* e Bonferroni. Dados de ARS e de atividade antimicrobiana foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ($\alpha = ,05$). **Resultados:** GFB, TF e AHP não apresentaram efeitos citotóxicos. GFB mostrou maior atividade de ALP aos 7 dias. TF induziu maior deposição de nódulos mineralizados (ARS), maior potencial bioativo (MEV) e mostrou atividade antimicrobiana sobre biofilme e células planctônicas de *E. faecalis* e *C. albicans* ($P < ,05$). Não houve diferença estatística significativa entre GFB e AHP sobre biofilme e células planctônicas de *E. faecalis* e sobre biofilme dual-espécies ($P > ,05$). **Conclusões:** Conclui-se que cimentos GFB e TF mostraram citocompatibilidade, bioatividade celular e potencial bioativo. TF mostrou maior atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans* e GFB mostrou efetividade sobre biofilme de *C. albicans*.

Palavras-chave: bioatividade, biofilme, cimentos endodônticos, citotoxicidade.

* Artigo que será submetido ao periódico *Journal of Endodontics*

Introdução

A biocompatibilidade e atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos favorecem o processo de reparo e controle da infecção (1, 2). A biocompatibilidade e potencial bioativo dos diferentes cimentos varia de acordo com a composição, podendo influenciar o sucesso do tratamento endodôntico. Assim, testes de citotoxicidade e bioatividade são realizados para avaliação inicial da biocompatibilidade dos materiais.

AH Plus (AHP) é um cimento à base de resina epóxi considerado padrão para propriedades físico-químicas de cimentos endodônticos (3). AHP é citocompatível (4, 5) e apresenta alguma atividade antibacteriana (6, 7). EndoSequence BC e TotalFill BC (TF) são cimentos biocerâmicos pré-misturados (8), que apresentam a mesma composição: óxido de zircônio, silicato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico e hidróxido de cálcio (9). Esses cimentos apresentam propriedades biológicas favoráveis, como biocompatibilidade e atividade antibacteriana (3). EndoSequence BC mostrou bioatividade em análises por MEV (10). TF demonstra citocompatibilidade (5, 11) e atividade antibacteriana (12).

GuttaFlow bioseal (GFB) é um cimento obturador composto de gutta-percha, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zircônio e vidro cerâmico bioativo. GFB foi desenvolvido para melhorar a bioatividade do GuttaFlow (13) e a atividade antibacteriana da formulação anterior, GuttaFlow 2 (14). GFB mostrou citocompatibilidade por ensaio de MTT (15, 16) e potencial bioativo pela análise em MEV (13). Ainda, GFB apresenta propriedades físico-químicas de radiopacidade, escoamento (ISO 6876), solubilidade (ANSI/ADA 2000 n° 57 modificada) e estabilidade volumétrica em corcondância com as normas (17).

Micro-organismos resistentes como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* podem persistir após o tratamento endodôntico (7, 12, 18). O uso de cimentos obturadores com atividade antimicrobiana pode prevenir o crescimento de micro-organismos residuais, ajudando no processo de reparo apical e periapical (12). A atividade antibacteriana dos cimentos TF e AHP sobre *E. faecalis* em células planctônicas foi avaliada, mostrando eficácia antibacteriana (12). A avaliação da atividade antimicrobiana do AHP e Guttaflow 2 demonstrou que somente AHP foi efetivo sobre *E. faecalis* (7). A formulação anterior de GFB, Guttaflow 2 não mostrou atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* (14). Até o presente momento, a eficácia antimicrobiana do cimento GFB não foi estudada.

O presente estudo visa avaliar a citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e eficácia antibacteriana de novos cimentos obturadores endodônticos à base de silicone (GFB) e silicato de cálcio (TF), comparados ao cimento AHP.

Material e métodos

Os cimentos endodônticos utilizados neste estudo e seus respectivos fabricantes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Cimentos endodônticos avaliados: número do lote/data de validade, proporção, composição e seus fabricantes

Cimento Endodôntico	Número de lote e data de validade	Proporção	Fabricante	Composição
GuttaFlow bioseal (GFB)	G41719 2017-05	1:1	Coltene/Whaledent GmbH, Langenau, Alemanha	Guta-percha, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zircônio, prata (conservante), coloração, vidro cerâmico bioativo.
TotalFill BC (TF)	14003SP 2016-09	Pré-misturado	FKG/Brasseler, USA Dental, Savannah, Georgia, USA	Óxido de zircônio, silicatos de cálcio, cálcio, fosfato monobásico, hidróxido de cálcio, agentes de preenchimento e espessamento.
AH Plus (AHP)	1401000822 2015-10	1:1	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha	Resina epoxi bisfenol-A e bisfenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos de ferro, dibenzildiamida, aminoadamantano, óleo de silicone.

Avaliação da citotoxicidade e bioatividade celular

Cultura celular e preparação dos eluídos

Os osteoblastos Saos-2 (ATCC HTB-85) foram cultivados em T-75 frascos (Jet Biofil[®], Guangzhou, Luokan, China) contendo meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), penicilina (100 UI mL⁻¹), estreptomicina (100 g mL⁻¹) à 37°C, 95% de atmosfera úmida e 5% de CO₂ até a confluência. Os cimentos foram colocados no fundo de uma placa de 12 poços com área de 314,0 mm² e 3,0 mm de altura (Jet Biofil[®]) e hidratados. As placas foram mantidas à 37°C, por 48 horas para permitir a presa completa dos materiais, expostos à luz ultravioleta-UV durante 30 minutos para descontaminação (19) e 5 mL do meio de cultura de DMEM sem soro fetal bovino foram colocados em cada poço da placa em que o material foi acomodado, e mantido durante 24 horas à 37°C, 95% umidade e 5% de CO₂ para obtenção dos eluídos. DMEM sem soro foi usado como controle negativo e controle positivo com 0,001 M de água oxigenada. AHP foi usado como material de referência.

Ensaio de viabilidade celular: MTT e vermelho neutro (NR)

A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios de 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) e NR (20). Saos-2 foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ células mL⁻¹ em placas de 96 poços (Jet Biofil[®]) contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e cultivado por 24 horas em 37 ° C, 95% de umidade e 5% de CO₂

até a confluência. As células foram expostas aos eluídos dos cimento nas diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 e controles por 24 horas. Para o ensaio MTT, os eluídos dos cimentos foram substituídos com 100 μL de 5 mg mL^{-1} do sal de MTT e as células foram incubadas à 37 ° C, 95% umidade e 5% de CO_2 por 3 horas. Posteriormente, o conteúdo do poço foi removido e o produto colorimétrico solubilizado em 100 μL de isopropanol acidificado 0,04N (Sigma-Aldrich). As densidades ópticas das soluções foram medidas em espectrofotômetro UVM 340 (ASYS, Nova Analítica Importação e Exportação Ltda., SP, Brasil) a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados. O ensaio de NR foi realizado depois que as células foram expostas aos eluídos dos cimentos nas diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8. Os eluídos foram substituídos por 0,1 mL de meio DMEM contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução de NR (Sigma-Aldrich) e incubados a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO_2 por 3 horas. Então, o conteúdo do poço foi removido e o produto colorimétrico solubilizado em 100 μL da mistura de solução de etanol - 50% de etanol e 1% ácido acético (Sigma-Aldrich). As densidades ópticas das soluções foram medidas em um espectrofotômetro (UVM 340) a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados.

Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da ALP foi avaliada usando o kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O princípio do método é a hidrólise do monofosfato de timolftaleína pela fosfatase alcalina produzida pelas células, que liberará a cor azul da timolftaleína em meio alcalino (21). Células (7×10^4 células mL^{-1}) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e expostas aos eluídos dos cimentos (diluição 1: 8) pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. Os eluídos dos materiais foram renovados a cada 2 dias. Após cada período experimental, as células foram lavadas com 200 μL de PBS, seguido da adição de 200 μL de uma solução 0,1% de lauril sulfato de sódio (Sigma-Aldrich) para cada poço. As amostras foram deixadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Cada amostra (12,5 μL) foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) contendo substrato e a enzima. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 590 nm. Três experimentos independentes foram realizados. Os dados foram expressos como atividade de ALP normalizada com o número de células viáveis detectadas no ensaio MTT no respectivo período (22).

Ensaio de mineralização: coloração com vermelho de alizarina (ARS)

Com a finalidade de identificar depósitos de cálcio in vitro, foi realizada a técnica de coloração com ARS (Sigma-Aldrich). As células foram plaqueadas (1×10^4 células mL^{-1}) em placas de cultura de 24 poços (Jet Biofil[®]). Durante 21 dias, o meio de cultura D-MEM osteogênico (D-MEM 10% SFB; 100 IU/mL penicilina; 100 mg/mL estreptomicina; 0,023 g/mL β -glicerolfosfato; 0,055 mg/mL ácido ascórbico) foi renovado a cada 2 dias. Após este período, o meio foi aspirado, os poços lavados com PBS 1x e as células foram fixadas com etanol 70% (Sigma-Aldrich) em temperatura de 4°C por 1 hora. As monocamadas foram então lavadas duas vezes com água destilada anteriormente a adição de 0,5 mL 40 mM AlizarinRed S (2%- pH 4.1). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Após a aspiração do corante, os poços foram lavados 5 vezes com 1 mL de água destilada/poço e o excesso de água foi removido. Para quantificação da mineralização, os nódulos foram dissolvidos com 500 μL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridíneo (Sigma/Aldrich) por poço, seguido da incubação por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Três alíquotas de 100 μL da suspensão de cada poço foram transferidos para placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda (Asys-UVM 340, Biochrom-MikroWin 2000). Três experimentos independentes foram realizados.

Avaliação do potencial bioativo em MEV

Todos os cimentos foram manipulados, compactados em moldes de silicone (1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro) e deixados em estufa a 100% de umidade e 37°C por 7 dias. Após esse período, os corpos de prova ($n = 2$) permaneceram imersos no PBS 1x e incubados a 37°C durante 30 dias. As amostras foram fixadas e desidratadas para análise microestrutural da superfície, tiveram suas superfícies metalizadas com ouro para sua análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Foram analisadas 6 áreas de cada espécime de forma padronizada, totalizando 12 áreas.

O precipitado de minerais foi classificado empregando sistema de escores: **Escore 0**- nenhum precipitado de minerais na superfície do material, **Escore 1**- alguns pontos de cobertura da superfície do material por precipitado de minerais, **Escore 2**- alguns pontos da superfície de cada imagem não coberta por precipitado de minerais, **Escore 3**- total cobertura da superfície por precipitado mineral, **Escore 4**- formação de cristais de hidroxiapatita.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Teste de contato direto dos eluídos dos cimentos sobre biofilme: Ensaio cristal violeta

A ação das soluções sobre a biomassa dos biofilmes mono- e dual-espécies de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e/ou *Candida albicans* (ATCC 10231) foi avaliada por meio do ensaio de cristal violeta. Os biofilmes foram formados em placas de cultura celular de 96 poços pelo período de 72 horas (*E. faecalis*) e 48 horas (*C. albicans* e biofilme dual-espécies), com meio de cultura *Tryptic soy broth* – TSb (Difco Detroit, MI, EUA) suplementado com D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich) para *E. faecalis* e em meio de cultura *Brain Heart Infusion* – BHI (Difco Detroit, MI, EUA) para *C. albicans* e dual-espécies. O ajuste da densidade óptica foi realizado em espectrofotômetro (600 Plus, Femto, SP) na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹.

Os cimentos foram manipulados segundo indicações dos fabricantes, onde $7,5 \pm 0,5$ mm de diâmetro x $1,5 \pm 0,5$ mm de altura dos materiais ficaram em contato com 2 mL de solução salina por 48 horas em estufa a 37°C, quando os eluídos finais foram recolhidos. Após período de formação dos biofilmes, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de PBS 1x (pH 7,2). Em seguida, foram aplicados 200 µL dos eluídos dos cimentos em cada poço e deixados em estufa por 24 horas a 37°C. Após esse período os eluídos foram removidos e cada poço foi lavado com PBS 1x. As placas foram secas a temperatura ambiente por 24 horas para fixação da biomassa residual.

A seguir, os micro-organismos aderentes foram corados com 200 µL da solução de cristal violeta a 0,1% (LabSynth, Diadema, SP, Brasil) por 20 minutos em temperatura ambiente. O excesso do corante foi enxaguado por lavagem com água destilada. As placas foram secas a temperatura ambiente e o corante ligado às células aderentes foi solubilizado com 200 µL de ácido acético a 33%. Para quantificar a biomassa de biofilme remanescente após o tratamento, foi medida a absorvância (590 nm) usando leitor de microplacas UVM 340 (ASYS, Nova Analítica Importação e Exportação Ltda., SP, Brasil). Para o controle positivo foi utilizada a solução salina, em substituição aos eluídos do cimento. Meio de cultura estéril foi o controle negativo. Os dados foram expressos em porcentagem de redução da biomassa.

Teste de contato direto (TCD) sobre células planctônicas

Foram utilizadas microplacas de 96 poços (uma para cada cepa microbiana) onde os materiais foram manipulados e inseridos de forma padronizada na parede lateral do poço ($0,15 \pm 0,025$ g). Após a inserção do material, as placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas para presa do material. Na sequência, as placas foram mantidas durante 30 minutos expostas a luz UV para descontaminação dos cimentos, em seguida 10 μL de cada inóculo foi depositado sobre o cimento. Houve um grupo controle positivo, no qual foi adicionado somente o inóculo. As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 1 h e 30 min.

Após período de contato e incubação, foram adicionados 250 μL de TSb em cada poço da placa contaminada com *E. faecalis* e *Sabouraud Dextrose broth* – SDb (Difco Detroit, MI, EUA) nos poços da placa contaminados com *C. albicans*. Posteriormente, foi realizada a diluição decimal seriada e a semeadura em placas contendo *Tryptic soy agar* (TSa) e *Sabouraud Dextrose agar* (SDa), respectivamente. Após 48 horas de incubação das placas em estufa a 37°C , foi realizada contagem de UFC mL^{-1} e transformação logarítmica (\log_{10}).

Análise estatística

A viabilidade celular e a atividade de ALP foram analisadas estatisticamente por meio dos testes *two-way* ANOVA e Bonferroni *post-test*. A bioatividade celular (coloração com ARS) e atividade antimicrobiana foram analisadas pelos testes estatísticos de ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Citotoxicidade: Ensaios de MTT e NR

A Figura 1 mostra os resultados dos ensaios de citotoxicidade. GFB, TF e AHP, em todas as diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8), não mostraram efeitos citotóxicos para as células Saos-2 ($P < ,05$).

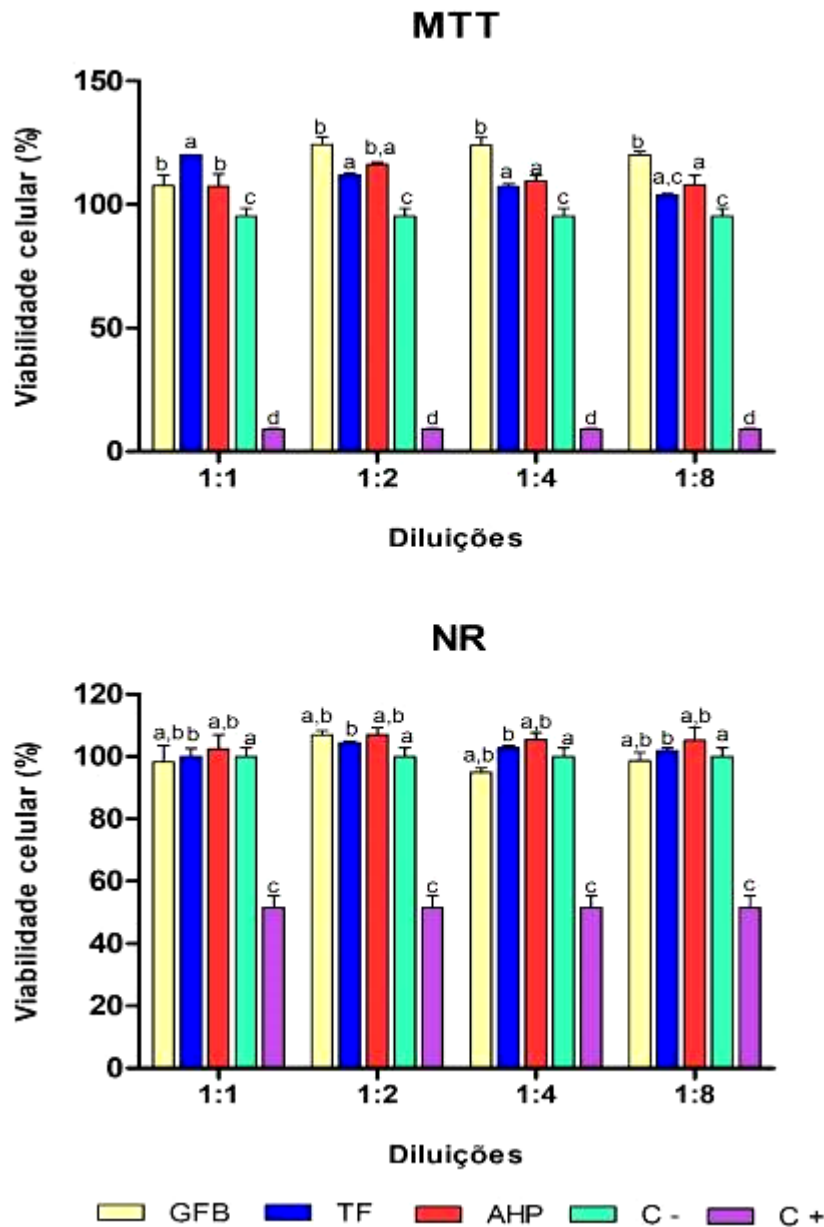


Figura 1. (A) Ensaio de MTT e (B) Vermelho Neutro (NR) após 24 horas de exposição das células Saos-2 aos eluídos dos cimentos nas diluições (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8). GFB, GuttaFlow bioseal; TF, TotalFill BC; AHP, AH Plus e grupos controle negativo (meio de cultura D-MEM) e controle positivo (água oxigenada 0,001 M). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os eluídos dos cimentos e grupos controle. ANOVA two-way e Bonferroni *post test* ($P < ,05$).

Bioatividade celular: atividade de ALP e coloração com ARS

A Figura 2 mostra os resultados da atividade de ALP. Nos períodos de 1 e 3 dias, não houve diferença estatística significativa entre os cimentos avaliados ($P > ,05$). As células tratadas com GFB mostraram maior atividade de ALP em contato com Saos-2 após sete dias de exposição ($P < ,05$).

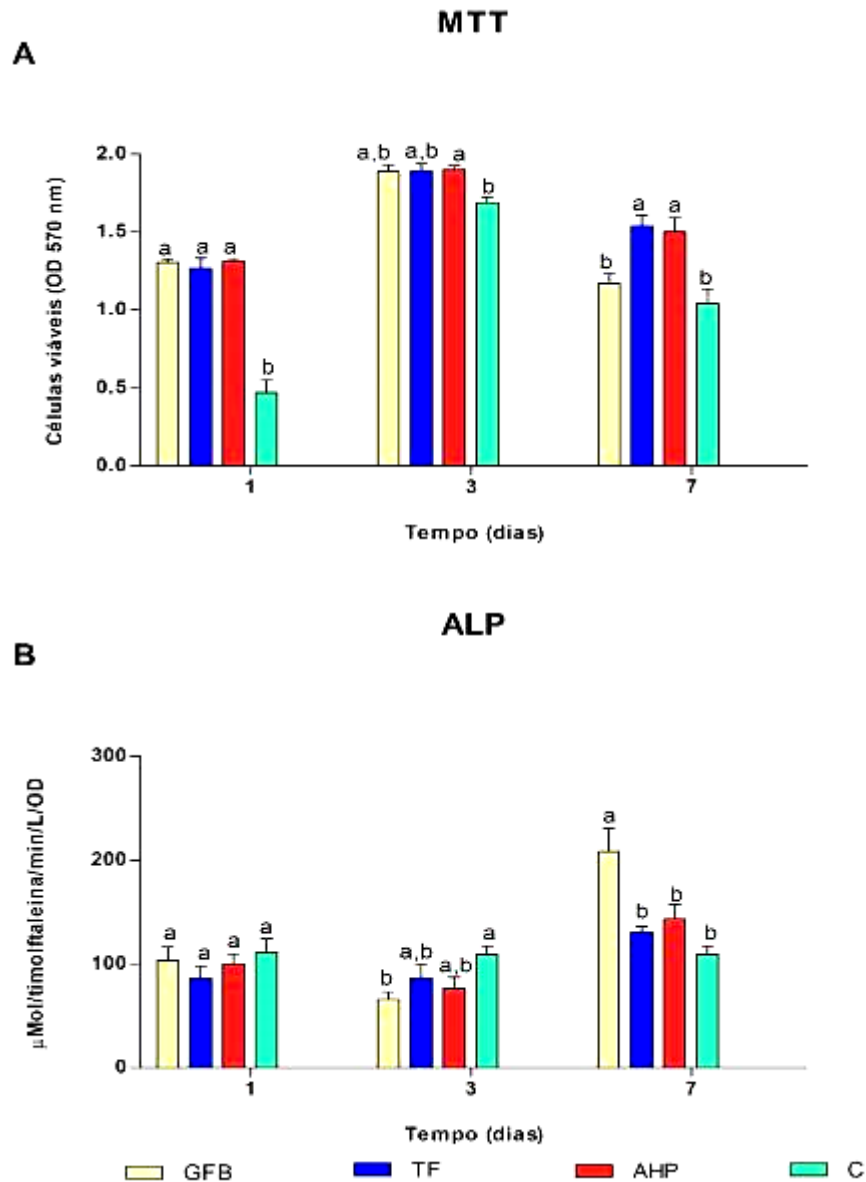


Figura 2. Ensaio de citotoxicidade MTT (A) e de bioatividade celular pela atividade de ALP (B), após 1, 3 e 7 dias de exposição das células Saos-2 aos eluídos dos cimentos na diluição de 1:8. GFB, GuttaFlow bioseal; TF, TotalFill BC; AHP, AH Plus; C; grupo controle negativo (meio de cultura D-MEM). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os eluídos dos cimentos e controle negativo. ANOVA *two-way* e Bonferroni *post test* ($P < ,05$).

O cimento TF induziu maior deposição de nódulos mineralizados ($P < ,05$). GFB não apresentou diferença estatística ($P > ,05$) e AHP induziu menor deposição de nódulos mineralizados ($P < ,05$) quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 3).

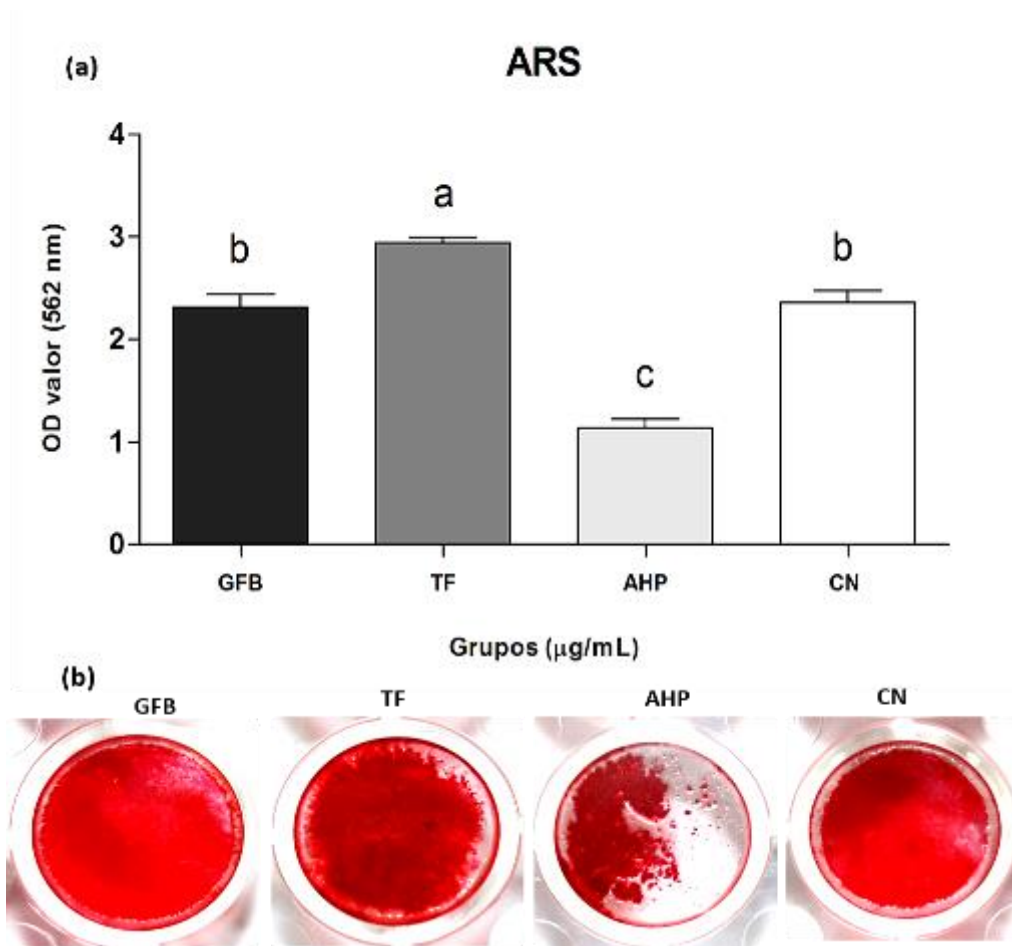


Figura 3. (a) Ensaio de Coloração Vermelha de Alizarina (ARS). Análises estatísticas após 21 dias de exposição das células aos eluídos dos cimentos. (b) Culturas osteogênicas de Saos-2 mostraram deposição de cálcio como demonstrado pelo ARS positivo. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os eluídos dos cimentos e controle negativo (meio de cultura D-MEM osteogênico). GFB: GuttaFlow bioseal, TF: TotalFill BC, AHP: AH Plus, CN: controle negativo.

Potencial bioativo: análise em MEV

TF mostrou maior precipitado de minerais (Escore 3) na sua superfície, seguido de GFB (Escore 2). AHP não mostrou potencial bioativo (Escore 0). As micrografias de cada grupo estão representadas na Figura 4.

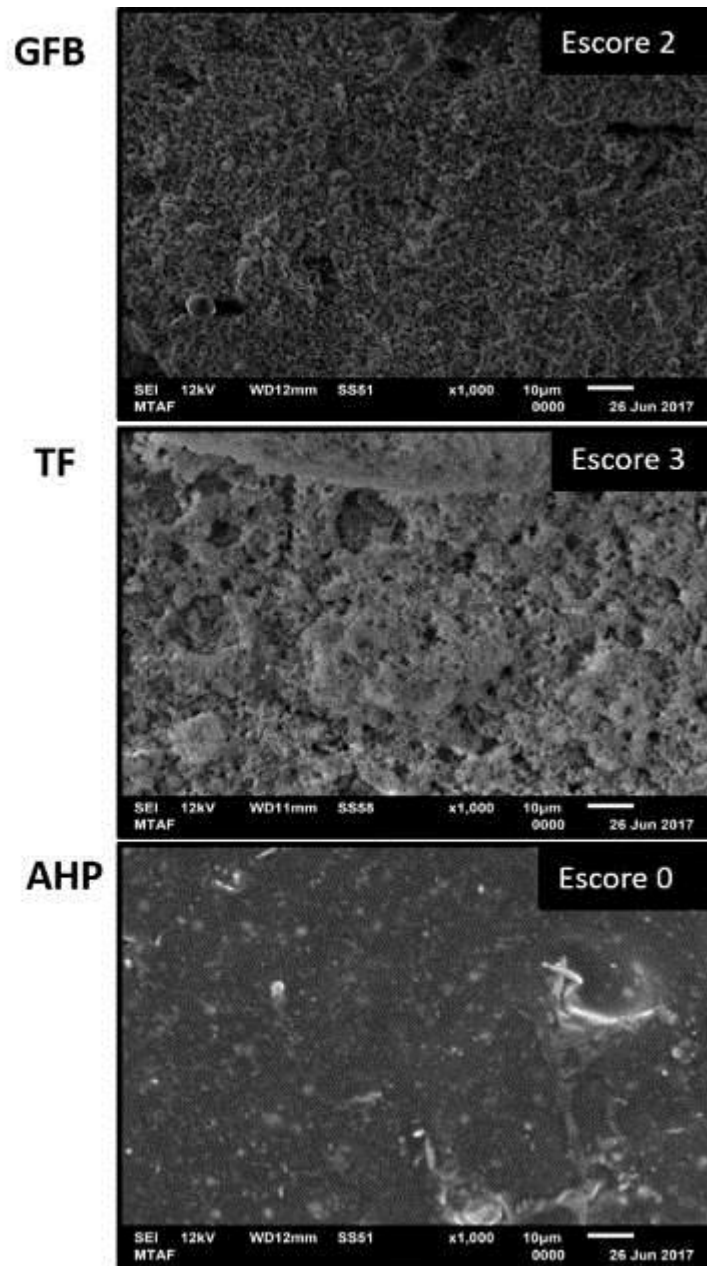


Figura 4. Ensaio de bioatividade em microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cimentos após 30 dias de contato com solução PBS em estufa à 37°C. O escore de cada material está diretamente relacionado com a deposição de minerais na superfície. TF mostrou maior precipitado de minerais (Escore 3), seguido por GFB (Escore 2). AHP não mostrou deposição de minerais (Escore 0). GFB, GuttaFlow bioseal; TF, TotalFill BC; AHP, AH Plus.

Atividade antimicrobiana: ensaio de cristal violeta e TCD sobre células planctônicas

No ensaio de cristal violeta, TF mostrou maior atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e menor ação sobre o biofilme dual-espécies ($P < ,05$). GFB e TF mostraram maior redução da biomassa de biofilme de *C. albicans*, sem diferença estatística significativa entre eles ($P > ,05$), quando comparados ao AHP. Não houve diferença estatística significativa entre GFB e AHP sobre *E. faecalis* e biofilme dual-espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão da porcentagem de redução da biomassa após 24 horas de contato dos eluídos dos cimentos (48 horas) com biofilmes mono- e dual-espécies de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*

Grupos	GFB	TF	AHP
<i>E. faecalis</i>	18,53 (\pm 4,6) ^b	52,48 (\pm 6,9) ^a	15,90 (\pm 4,09) ^b
<i>C. albicans</i>	56,57 (\pm 9,9) ^a	52,31 (\pm 6,6) ^a	12,20 (\pm 4,9) ^b
Dual-espécies	20,35 (\pm 3,1) ^a	14,61 (\pm 6,4) ^b	21,43 (\pm 3,5) ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos. ANOVA e Tukey ($P < ,05$)

No TCD sobre células planctônicas, TF mostrou maior atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e *C. albicans* ($P < ,05$), quando comparado aos demais cimentos e ao grupo C+ (salina). GFB foi estatisticamente semelhante ao cimento AHP e ao C+ sobre *E. faecalis*. Não houve diferença estatística significativa entre GFB e C+ sobre células planctônicas de *C. albicans* (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores de UFC mL⁻¹ (log₁₀) após 1 hora e 30 minutos de contato direto dos cimentos (24 horas de presa) com células plantônicas de *E. faecalis* ou *C. albicans*

Grupos	GFB	TF	AHP	C+
<i>E. faecalis</i>	7,03(\pm 0,41) ^a	4,29 (\pm 1,24) ^b	7,03 (\pm 0,33) ^a	7,67 (\pm 0,26) ^a
<i>C. albicans</i>	5,12 (\pm 0,42) ^a	0 (\pm 0) ^c	2,77 (\pm 0,45) ^b	5,36 (\pm 0,44) ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos. ANOVA e Tukey ($P < ,05$)

Discussão

Testes de viabilidade e bioatividade celular avaliam o dano celular e efeitos biológicos de biomateriais (23). A citotoxicidade foi avaliada por ensaios de MTT e NR, e bioatividade celular pela atividade de ALP e ensaio ARS em células osteoblásticas Saos-2, de acordo com Tanomaru-Filho et al. (24). Todos os cimentos avaliados no presente estudo mostraram citocompatibilidade em contato com células Saos-2, com destaque para GFB, concordando com estudo prévio (16). TF e AHP também mostraram citocompatibilidade em ensaio MTT em contato com células imortalizadas de fibroblastos gengivais humanos e com células do ligamento periodontal (5, 11).

A atividade de ALP permite avaliar o potencial de diferenciação das células (25). Nos períodos de 1 e 3 dias, não houve diferença na atividade de ALP entre os cimentos avaliados. No entanto, as células Saos-2 em contato com o cimento GFB mostraram maior atividade de ALP no período de 7 dias. No presente estudo, o cimento TF induziu maior deposição de nódulos de mineralização no ensaio de ARS. Não existem estudos de bioatividade celular dos cimentos GFB e TF. A bioatividade celular dos materiais é importante, em função do contato com a região apical em casos de extravasamentos, além de poder favorecer o reparo e regeneração dos tecidos periapicais (13).

No ensaio de bioatividade em MEV, TF mostrou maior deposição de minerais (Escore 3), seguido por GFB (Escore 2), porém novos estudos são necessários para identificação dos minerais depositados. EndoSequence BC mostrou potencial bioativo com deposição de minerais contendo íons cálcio e fosfato na análise em MEV/EDX (10). Potencial bioativo do GFB pode ser explicado pela incorporação de partículas de silicato de cálcio nos componentes de guta-percha e polidimetilsiloxano do cimento, que em contato com os fluídos formam cristais de hidroxiapatita (13, 16). Maior deposição de precipitado mineral foi observado para TF, uma vez que cimentos biocerâmicos à base de silicato de cálcio demonstram hidratação e produção de hidróxido de cálcio, necessário para induzir a formação de tecido mineralizado tais como os íons cálcio, essenciais para a formação de hidroxiapatita favorecendo o reparo apical (24). A composição do TF com silicato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico e hidróxido de cálcio, além de óxido de zircônio, justificam sua bioatividade (9). TF mostrou maior bioatividade em MEV, quando comparado ao cimento AHP (10). O cimento Endosequence BC, que apresenta mesma composição que o TF, apresenta reação de hidratação com formação de silicato de cálcio e hidróxido de cálcio que promovem a formação de hidroxiapatita (9). A deposição de hidroxiapatita induz formação

de tecido mineralizado apical, contribuindo no processo de reparo (26). Endosequence BC demonstra bioatividade, a qual foi menor que MTA e Biodentine (27) e também demonstra habilidade de deposição de fosfato de cálcio por análise em espectroscopia de energia dispersiva EDS (28).

A atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos foi avaliada sobre células planctônicas e biofilme de *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans*. Esses micro-organismos são frequentemente isolados de dentes com infecções periapicais persistentes e em caso de insucesso do tratamento endodôntico (1). *E. faecalis* não faz parte da microbiota comum dos sistemas de canais radiculares, no entanto, quando presente, demonstra resistência ao tratamento endodôntico (29). *C. albicans* é a espécie fúngica encontrada em cepas puras isoladas ou em associação a bactérias Gram-positivas e negativas. Essa espécie fúngica possui a capacidade de invadir e aderir em túbulos dentinários sobrevivendo às condições ambientais severas (18). Esses micro-organismos são comumente encontrados na forma de biofilme o que lhes garante maior resistência aos agentes antimicrobianos quando comparados ao estado planctônico (30). O estudo da ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos é importante para avaliar sua eficácia contra esses patógenos, de forma a prevenir e combater as infecções associadas que levam ao insucesso do tratamento.

No presente estudo, TF mostrou atividade antimicrobiana sobre células planctônicas e biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans*. TF demonstra maior efetividade contra *E. faecalis* quando comparado ao cimento AHP sobre células planctônicas (12). GFB e AHP mostraram maior atividade antimicrobiana sobre o biofilme dual-espécies. Guttaflow 2 e Roekoseal (com composições similares ao GFB) não mostraram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e AHP mostrou maior efetividade contra *E. faecalis* na forma de células planctônicas e biofilme (31). No presente estudo, AHP foi estatisticamente semelhante ao GFB contra biofilme e células planctônicas de *E. faecalis* e biofilme dual-espécies, que sugere que a propriedade antimicrobiana do cimento GFB foi melhorada em comparação à formulação anterior (Guttaflow 2). Porém, até o presente momento, não há estudos na literatura que avaliem a atividade antimicrobiana do cimento GFB. A sua atuação sobre biofilmes residuais podem favorecer o sucesso do tratamento endodôntico (30).

Em conclusão, todos os cimentos mostraram biocompatibilidade. TF e GFB mostraram bioatividade celular e potencial bioativo, com destaque para o cimento TF. TF mostrou eficácia sobre *E. faecalis* e *C. albicans* e GFB mostrou ser mais efetivo sobre biofilme dual-espécies.

Referências

1. Siqueira JF, Jr., Favieri A, Gahyva SM, et al. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod* 2000;26:274-7.
2. Christian Gomes Moura C, Cristina Cunha T, Oliveira Crema V, Dechichi P, Carlos Gabrielli Biffi J. A study on biocompatibility of three endodontic sealers: intensity and duration of tissue irritation. *Iran Endod J* 2014;9:137-43.
3. Silva Almeida LH, Moraes RR, Morgental RD, Pappen FG. Are Premixed Calcium Silicate-based Endodontic Sealers Comparable to Conventional Materials? A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod* 2017;43:527-35.
4. Konjhodzic-Prsic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A. In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Med Arch* 2015;69:24-7.
5. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent* 2017;9:e574-e8.
6. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2014;40:505-8.
7. Shakya VK, Gupta P, Tikku AP, et al. An Invitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy and Flow Characteristics for AH Plus, MTA Fillapex, CRCS and Gutta Flow 2 Root Canal Sealer. *J Clin Diagn Res* 2016;10:ZC104-8.
8. Hess D, Solomon E, Spears R, He J. Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. *J Endod* 2011;37:1547-9.
9. Baraba A, Pezelj-Ribaric S, Roguljic M, Miletic I. Cytotoxicity of Two Bioactive Root Canal Sealers. *Acta Stomatol Croat* 2016;50:8-13.
10. Carvalho CN, Grazziotin-Soares R, de Miranda Candeiro GT, et al. Micro Push-out Bond Strength and Bioactivity Analysis of a Bioceramic Root Canal Sealer. *Iran Endod J* 2017;12:343-8.
11. Rodriguez-Lozano FJ, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, et al. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J* 2017;50:67-76.
12. Poggio C, Trovati F, Ceci M, Colombo M, Pietrocola G. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. *J Clin Exp Dent* 2017;9:e743-e8.

13. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dent Mater* 2016;32:e113-26.
14. Wainstein M, Morgental RD, Waltrick SB, et al. In vitro antibacterial activity of a silicone-based endodontic sealer and two conventional sealers. *Braz Oral Res* 2016;30:1-5.
15. Collado-Gonzalez M, Tomas-Catala CJ, Onate-Sanchez RE, Moraleda JM, Rodriguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on Human Periodontal Ligament Stem Cells. *J Endod* 2017;43:816-22.
16. Saygili G, Saygili S, Tuglu I, Davut Capar I. In Vitro Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iran Endod J* 2017;12:354-9.
17. Tanomaru Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, et al. Physicochemical Properties and Volumetric Change of Silicone/ Bioactive Glass and Calcium Silicate-based Endodontic Sealers. *J Endod* 2017;43:2097-101.
18. O'Donnell LE, Millhouse E, Sherry L, et al. Polymicrobial Candida biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res* 2015;15:1-14.
19. Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V, Chitnis DS. Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian J Med Microbiol* 2008;26:241-2.
20. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008;3:1125-31.
21. Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem* 1970;16:431-6.
22. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem* 1981;27:493-501.
23. Gomes-Cornelio AL, Rodrigues EM, Salles LP, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J* 2017;50:39-47.
24. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J* 2017;50 Suppl 2:e31-e9.
25. Wang Y, Yan M, Wang Z, et al. Dental pulp stem cells from traumatically exposed pulps exhibited an enhanced osteogenic potential and weakened odontogenic capacity. *Arch Oral Biol* 2013;58:1709-17.

26. Saghiri MA, Lotfi M, Saghiri AM, et al. Scanning electron micrograph and surface hardness of mineral trioxide aggregate in the presence of alkaline pH. *J Endod* 2009;35:706-10.
27. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46:808-14.
28. Xuereb M, Vella P, Damidot D, Sammut CV, Camilleri J. In situ assessment of the setting of tricalcium silicate-based sealers using a dentin pressure model. *J Endod* 2015;41:111-24.
29. Sagsen B, Er O, Esel D, Yagmur G, Altintop Y. In vitro pharmacodynamic activities of root canal sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Contemp Dent Pract* 2009;10:35-42.
30. Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *Int Endod J* 2010;43:978-87.
31. Kapralos V, Koutroulis A, Orstavik D, Sunde PT, Rukke HV. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers against Planktonic Bacteria and Bacteria in Biofilms. *J Endod* 2018;44:149-54.

3.2 Publicação 2

Propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e efeito antimicrobiano de cimentos à base de silicato de cálcio: NeoMTA Plus e MTA Fillapex*

Resumo

Objetivo Avaliar algumas propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana dos cimentos NeoMTA Plus® (NMTAP) e MTA Fillapex (MTAF), em comparação ao AH Plus (AHP).

Metodologia Tempo de presa (TP) e escoamento foram avaliados segundo norma ISO-6876. pH foi avaliado em diferentes períodos e a solubilidade pela porcentagem de perda de massa. Radiopacidade foi avaliada por análise radiográfica em milímetros de alumínio (mmAl). Alteração volumétrica (AV) foi avaliada em micro-CT. Células humanas Saos-2 foram utilizadas para avaliação da citotoxicidade por meio dos ensaios de metiltetrazólio (MTT) e vermelho neutro (NR), e da bioatividade celular pela atividade da fosfatase alcalina (ALP) e vermelho de Alizarina (ARS). O potencial bioativo foi avaliado em MEV. A eficácia antimicrobiana foi avaliada pelos testes de contato direto sobre células planctônicas e sobre biofilme de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*. Os dados físico-químicos, do ensaio ARS e atividade antimicrobiana foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey; e de citotoxicidade e atividade de ALP pelos testes ANOVA-*two-away* e Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

Resultados MTAF mostrou maior TP, escoamento, solubilidade, AV, citotoxicidade, menor radiopacidade e atividade sobre células planctônicas de *C. albicans*. NMTAP apresentou maior pH, citocompatibilidade, bioatividade celular, potencial bioativo e ação antibiofilme sobre *C. albicans* e biofilme dual-espécies.

Conclusões NMTAP apresenta propriedades físico-químicas adequadas, biocompatibilidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antibiofilme, porém menor escoamento e radiopacidade. MTAF apresenta redução volumétrica, radiopacidade inferior e solubilidade superior às recomendações ISO, citotoxicidade e maior efetividade sobre células planctônicas de *C. albicans*.

Palavras-chave: bioatividade, biofilme, citotoxicidade, micro-CT, silicato de cálcio.

* Artigo que será submetido ao periódico *International Endodontic Journal*

Introdução

Mineral Trióxido Agregado (MTA) é composto basicamente por silicato tricálcico e silicato dicálcico, e indicado para tratamentos reparadores em Endodontia (Mestieri *et al.* 2015). Novos cimentos à base de silicato de cálcio são indicados como material obturador (Prati & Gandolfi 2015). NeoMTA Plus® (NMTAP) e MTA Fillapex® (MTAF) são cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio. A primeira formulação do MTAF (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brasil) é composta de resina salicilato, resina natural, óxido de bismuto, nanopartículas de sílica e MTA (Viapiana *et al.* 2016).

Altos valores de escoamento e baixa radiopacidade foram observados para o MTA Fillapex (Lee *et al.* 2017, Tanomaru-Filho *et al.* 2013), porém dentro dos limites recomendados pelas normas ANSI/ADA e ISO que estabelecem com valores mínimos de ≥ 20 mm e ≥ 3 mmAl, respectivamente. Também foram relatados para o MTAF radiopacidade (6,73 mmAl) e solubilidade semelhantes ao cimento AHP (Prullage *et al.* 2016). Porém, MTAF mostrou maior citotoxicidade quando comparado a outros cimentos, tais como Endosequence BC, MTA Plus e FillCanal (Baraba *et al.* 2016, Mestieri *et al.* 2015). Em sua nova formulação, o agente radiopacificador óxido de bismuto foi substituído por tungstato de cálcio. Para esta versão do material foram observados pH alcalino, tempo de presa longo e solubilidade elevada quando comparado ao AHP (Siboni *et al.* 2017b), e demonstrou potencial bioativo por análise em microscopia eletrônica de varredura – MEV (Siboni *et al.* 2017b).

NMTAP (Avalon Biomed IncTM - Bradenton, FL, USA) é composto de pó de silicato di- e tricálcico, sulfato de cálcio, sílica e óxido de tântalo, e o gel é à base de água com agentes espessantes e polímeros solúveis em água, sendo sua formulação semelhante ao MTA Plus, que apresenta como radiopacificador óxido de bismuto (Camilleri 2015, Tanomaru-Filho *et al.* 2017b). As indicações do material incluem terapia pulpar de dentes vitais (capeamento pulpar, pulpotomia), reparo radicular (reabsorção ou perfuração) e uso como cimento obturador endodôntico. O material deve ser manipulado nas proporções pó/líquido de 1:1 e 4:1, de acordo com as indicações como cimento obturador ou reparador, respectivamente. Como cimento obturador, NMTAP mostrou propriedades de radiopacidade, pH, tempo de presa, porosidade e solubilidade similares ao MTA Plus, conforme normas ISO 6876-2012 (Siboni *et al.* 2017a). Este material demonstra elevada capacidade de liberar íons cálcio e hidroxila que mantém a formação de fosfato de cálcio (Siboni *et al.* 2017a), essencial para a deposição de hidroxiapatita (Tran *et al.* 2016). Além disso, como material reparador

mostrou ser biocompatível (Tomas-Catala *et al.* 2017) e no ensaio de ARS mostrou significativa produção de nódulos de mineralização quando comparado ao MTA (Tanomaru-Filho *et al.* 2017a). Estudos são necessários para avaliar a alteração volumétrica e atividade antimicrobiana do material.

O presente estudo visa avaliar as propriedades físico-químicas, citotoxicidade, bioatividade celular, potencial bioativo e atividade antimicrobiana dos cimentos NMTAP e MTAF em sua nova formulação. A hipótese nula é que não há diferença nas propriedades físico-químicas, biológicas (citotoxicidade e bioatividade) e antimicrobiana dos cimentos NMTAP e MTAF, quando comparado ao cimento AH Plus (AHP).

Materiais e métodos

Os cimentos endodônticos avaliados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Cimentos endodônticos, número de lote/data de validade, proporção, composição e seus respectivos fabricantes

Cimento obturador	Número de lote e data de validade	Proporção	Fabricante	Composição
NeoMTA Plus (NMTAP)	2014090301 2017-06	0,33 g pó 150 µL gel	Avalon Biomed Inc TM - Bradenton, FL, USA	Pó: silicato di- e tricálcico, sulfato de cálcio, sílica, tântalo. Gel aquoso: não descrito pelo fabricante.
MTA-Fillapex (MTAF)	38108- Ref 8288 2017-11	1:1	Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brasil	Base: Resina Salicilato, Resina Natural, Tungstato de Cálcio, Sílica Nanoparticulada, Pigmentos; Catalisador: Resina Diluente, Mineral Trióxido Agregado, Sílica Nanoparticulada, Pigmentos.
AH Plus (AHP)	1401000822 2015-10	1:1	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha	Pasta A: resina epoxi bisfenol-A e bisfenol-F, tungstato de cálcio (TC), OZr, sílica, óxido de ferro. Pasta B: dibenzil-diamina, aminoadamantano, TC, OZr, sílica, silicone.

Avaliação das propriedades físico-químicas

Tempo de presa (ISO 6876-2012). Moldes de gesso medindo 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura foram imersos em água durante 24 horas a 37°C e depois preenchidos com cada material (n = 6). Agulha Gilmore com massa de 100 ± 0,5 g e diâmetro de 2,0 ± 0,1 foi apoiada na superfície do cimento a cada período de tempo padronizado. Os materiais foram mantidos em estufa a 37°C e 95% de umidade. Tempo de presa (TP) dos cimentos foi determinado como o tempo, em minutos, entre a manipulação do material e o momento em que não foram observadas marcas de agulha na superfície do cimento.

Radiopacidade. Espécimes (n = 5) medindo 10 mm de diâmetro por 1 mm de espessura, foram confeccionados para cada material avaliado. Cada espécime foi posicionado em 5 filmes radiográficos oclusais (Insight-Kodak Comp, Rochester, NY) e expostos, juntamente

com uma escala de alumínio com espessura variável (de 2 a 16 mm, em incrementos de 2 mm). Aparelho de raio-X Focus (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finlândia) foi operado à 60 kV, 7 mA, 0,32 pulsos por segundo, e a uma distância foco-filme de 33 cm. Os filmes foram processados em um processador automático padrão (Dent-X 9000; Dent-X, Elmsford, NY). As radiografias foram digitalizadas e as imagens foram importadas para o software Image Tool 3.0 (University of Texas Health Science Center em San Antonio [UTHSCSA], San Antonio, TX). A radiopacidade dos cimentos avaliados foi estimada a partir da espessura de alumínio (em mm). Os valores registrados para cada espécime foram calculados para obter um valor único em mmAl (Tanomaru-Filho *et al.* 2007).

Solubilidade (ANSI/ADA 2000) modificada. Moldes de silicone medindo 1,5 mm de altura e 7,75 mm de diâmetro (Carvalho-Junior *et al.* 2007) foram preenchidos com cada um dos cimentos avaliados (n = 6). Um fio de nylon foi incorporado no cimento fresco. Para os cimentos à base de silicato de cálcio que requerem umidade para a reação de presa, gazes molhadas foram colocadas na superfície. Os espécimes foram mantidos em estufa a 37°C e 95% de umidade por 3 vezes o TP. Os espécimes foram removidos dos moldes, colocados em desumidificador até estabilização da massa (10 dias) e pesados em balança analítica de 0,0001 g de precisão (Adventurer - Ohaus, Modelo AR2140 - Indústria de balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) para obter a massa inicial. Em seguida, eles foram colocados em frascos de plástico fechados contendo 7,5 mL de água destilada. Os espécimes foram colocados nos recipientes com fios de nylon e mantidos em estufa a 37°C durante 7 dias. Após este período, foram lavados em água destilada e colocados em um desumidificador até a estabilização e obtenção da massa final. A solubilidade dos materiais correspondeu à perda de massa de cada amostra expressa em percentagem.

pH. Tubos de polietileno (Embramed Ind. Com., São Paulo, SP, Brasil) medindo 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n = 10). Os tubos foram imersos em frascos de plástico contendo 10 mL de água deionizada. Os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 37°C. Foram realizadas medições de pH nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias, com troca para novo tubo a cada período. O pH da solução foi analisado em cada período usando pHmetro digital previamente calibrado (Digimed, São Paulo, Brasil). Após cada medição (em triplicata), o pH médio de cada espécime em cada grupo e período experimental foi calculado.

Escoamento (ISO 6876-2012). Após a manipulação do cimento, 0,05 mL do material foi colocado no centro de uma placa de vidro usando uma seringa graduada (n = 10). A 180 ± 5 segundos após o início da manipulação, outra placa de vidro (20 g) foi colocada na placa com

o cimento e 100 g de peso foi colocada na placa de vidro superior que permaneceu por 10 minutos. Após esse período, os diâmetros máximo e mínimo do material na placa de vidro foram medidos usando um paquímetro digital (Mitutoyo, Tokyo, Japan). Quando foi observada uma diferença de menos de 1 mm entre os diâmetros, o valor médio foi usado. Uma segunda avaliação foi feita fotografando o material na placa ao lado de uma régua milimétrica. As imagens obtidas foram avaliadas usando o Software Tool 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX) para obter a área de escoamento do material expresso em mm² (Tanomaru-Filho *et al.* 2007).

Alteração volumétrica: microtomografia computadorizada (micro-CT)

Foram confeccionados corpos-de-prova dos cimentos medindo 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura (n = 6) por um único operador treinado e calibrado, e mantidos em estufa a 37°C e umidade relativa por 3 vezes o tempo de presa. Para a presa dos cimentos NMTAP e MTAF, uma gaze úmida foi colocada sobre os materiais. Posteriormente, os espécimes foram escaneados por micro-CT (Bruker-MicroCT 1176, Kontich, Belgium). Os espécimes foram imersos em água destilada durante 7 e 30 dias e foram escaneados novamente após os períodos experimentais. O procedimento de digitalização foi realizado com os seguintes parâmetros radiográficos: 50 kV de voltagem e 500 µA, filtro de alumínio de 0,5 mm, voxel isotrópico de 18 µm e um ciclo de evolução de 360°. A reconstrução das imagens foi realizada com o software NRecon (V1.6.4.7; Bruker-MicroCT) de forma padronizada e foram utilizados os mesmos parâmetros para o mesmo material nos diferentes períodos. As imagens reconstruídas foram sobrepostas nos diferentes períodos usando o programa Data Viewer (V1.5.2.4; Bruker- MicroCT). As imagens foram analisadas com o software CTAAn (V1.11.8; Bruker-MicroCT). O volume total dos cimentos nas cavidades foi calculado em cada intervalo de tempo (Tanomaru-Filho *et al.* 2017b).

Avaliação da citotoxicidade e bioatividade celular

Cultura celular e preparação dos eluídos

Os osteoblastos Saos-2 (ATCC HTB-85) foram cultivados em T-75 frascos (Jet Biofil[®], Guangzhou, Luokan, China) contendo meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), penicilina (100 UI mL⁻¹), estreptomicina (100 g mL⁻¹) à 37°C, 95% de atmosfera úmida e 5% de CO₂ até a confluência. Os cimentos foram colocados no fundo de uma placa de 12 poços com área de 314,0 mm² e 3,0 mm de altura (Jet

Biofil[®]) e hidratados. As placas foram mantidas à 37°C, por 48 horas para permitir a presa completa dos materiais, expostos à luz ultravioleta-UV durante 30 minutos para descontaminação (Katara *et al.* 2008) e 5 mL do meio de cultura de DMEM sem soro fetal bovino foi colocado em cada poço da placa em que o material foi acomodado e mantido durante 24 horas à 37°C, 95% umidade e 5% de CO₂ para obtenção dos eluídos. DMEM sem soro foi usado como controle negativo e controle positivo com 0,001 M de água oxigenada. AHP foi usado como material de referência.

Ensaio de viabilidade celular: MTT e vermelho neutro (NR)

A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios de 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) e NR (Repetto *et al.* 2008). Saos-2 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células mL⁻¹ em placas de 96 poços (Jet Biofil[®]) contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e cultivado por 24 horas em 37 ° C, 95% de umidade e 5% de CO₂ até a confluência. As células foram expostas aos eluídos dos cimentos nas diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 e controles por 24 horas. Para o ensaio MTT, os eluídos dos cimentos foram substituídos com 100 µL de 5 mg mL⁻¹ do sal de MTT e as células seguiram para incubação à 37 ° C, 95% umidade e 5% de CO₂ por 3 horas. Posteriormente, o conteúdo do poço foi removido e o produto colorimétrico solubilizado em 100 µL de isopropanol acidificado 0,04N (Sigma-Aldrich). As densidades ópticas das soluções foram medidas em espectrofotômetro UVM 340 (ASYS, Nova Analítica Importação e Exportação Ltda., SP, Brasil) a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados. O ensaio de NR foi realizado depois que as células foram expostas aos eluídos dos cimentos nas diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8. Os eluídos foram substituídos por 0,1 mL de meio DMEM contendo 50 µg mL⁻¹ da solução de NR (Sigma-Aldrich). e incubados a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ por 3 horas. Então, o conteúdo do poço foi removido e o produto colorimétrico solubilizado em 100 µL da mistura de solução de etanol - 50% de etanol e 1% ácido acético (Sigma-Aldrich). As densidades ópticas das soluções foram medidas em um espectrofotômetro (UVM 340) a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados.

Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da ALP foi avaliada usando o kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O princípio do método é a hidrólise do monofosfato de timolftaleína pela fosfatase alcalina produzida pelas células, que liberará a cor azul da timolftaleína em meio alcalino (Roy 1970). Células (7×10^4 células mL⁻¹) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e expostas aos eluídos dos cimentos (diluição 1: 8) pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. Os eluídos dos

materiais foram renovados a cada 2 dias. Após cada período experimental, as células foram lavadas com 200 μL de PBS, seguido da adição de 200 μL de uma solução 0,1% de lauril sulfato de sódio (Sigma-Aldrich) para cada poço. As amostras foram deixadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Cada amostra (12,5 μL) foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) contendo substrato e a enzima. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 590 nm. Três experimentos independentes foram realizados. Os dados foram expressos como atividade de ALP normalizada com o número de células viáveis detectadas no ensaio MTT no respectivo período (Westgard *et al.* 1981).

Ensaio de mineralização: coloração com vermelho de alizarina (ARS)

Com a finalidade de identificar depósitos de cálcio *in vitro*, foi realizada a técnica de coloração com ARS (Sigma-Aldrich). As células foram plaqueadas (1×10^4 células mL^{-1}) em placas de cultura de 24 poços (Jet Biofil[®]). Durante 21 dias, o meio de cultura D-MEM osteogênico (D-MEM 10% SFB; 100 IU/mL penicilina; 100 mg/mL estreptomicina; 0,023 g/mL β -glicerolfosfato; 0,055 mg/mL ácido ascórbico) foi renovado a cada 2 dias. Após este período, o meio foi aspirado, os poços lavados com PBS 1x e as células foram fixadas com etanol 70% (Sigma-Aldrich) em temperatura de 4°C por 1 hora. As monocamadas foram então lavadas duas vezes com água destilada anteriormente a adição de 0,5 mL 40 mM AlizarinRed S (2%- pH 4.1). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Após a aspiração do corante, os poços foram lavados 5 vezes com 1 mL de água destilada/poço. Para quantificação da mineralização, os nódulos foram dissolvidos com 500 μL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridíneo (Sigma/Aldrich) por poço, seguido da incubação por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Três alíquotas de 100 μL da suspensão de cada poço foram transferidos para placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda (Asys-UVM 340, Biochrom-MikroWin 2000). Três experimentos independentes foram realizados.

Avaliação do potencial bioativo em MEV

Todos os cimentos foram manipulados, compactados em moldes de silicone (1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro) e deixados em estufa a 100% de umidade e 37°C por 7 dias. Após esse período, os corpos de prova ($n = 2$) permaneceram imersos no PBS 1x e incubados a 37°C durante 30 dias. As amostras foram fixadas e desidratadas para análise microestrutural da superfície, tiveram suas superfícies metalizadas com carbono para sua análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Foram analisadas 6 áreas de cada espécime de forma padronizada, totalizando 12 áreas.

O precipitado de minerais foi classificado empregando sistema de escores: Escore 0- nenhum precipitado de minerais na superfície do material, **Escore 1-** alguns pontos de cobertura da superfície do material por precipitado de minerais, **Escore 2-** alguns pontos da superfície de cada imagem não coberta por precipitado de minerais, **Escore 3-** total cobertura da superfície por precipitado mineral, **Escore 4-** formação de cristais de hidroxiapatita.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Teste de contato direto dos eluídos dos cimentos sobre biofilme: Ensaio cristal violeta

A ação das soluções sobre a biomassa dos biofilmes mono- e dual-espécies de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e/ou *Candida albicans* (ATCC 10231) foi avaliada por meio do ensaio de cristal violeta. Os biofilmes foram formados em placas de cultura celular de 96 poços pelo período de 72 horas (*E. faecalis*) e 48 horas (*C. albicans* e biofilme dual-espécies), com meio de cultura *Tryptic soy broth* – TSb (Difco Detroit, MI, EUA) suplementado com D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich) para *E. faecalis* e em meio de cultura *Brain Heart Infusion* – BHI (Difco Detroit, MI, EUA) para *C. albicans* e dual-espécies. O ajuste da densidade óptica foi realizado em espectrofotômetro (600 Plus, Femto, SP) na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹.

Os cimentos foram manipulados segundo indicações dos fabricantes, onde $7,5 \pm 0,5$ mm de diâmetro x $1,5 \pm 0,5$ mm de altura dos materiais ficaram em contato com 2 mL de solução salina por 48 horas em estufa a 37°C, quando os eluídos finais foram recolhidos. Após período de formação dos biofilmes, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de PBS 1x (pH 7,2). Em seguida, foram aplicados 200 µL dos eluídos dos cimentos em cada poço e deixados em estufa por 24 horas a 37°C. Após esse período os eluídos foram removidos e cada poço foi lavado com PBS 1x. As placas foram secas a temperatura ambiente por 24 horas. A seguir, os micro-organismos aderentes foram corados com 200 µL da solução de cristal violeta a 0,1% (LabSynth, Diadema, SP, Brasil) por 20 minutos em temperatura ambiente. O excesso do corante foi enxaguado por lavagem com água destilada. As placas foram secas a temperatura ambiente e o corante ligado às células aderentes foi solubilizado com 200 µL de ácido acético a 33%. Para quantificar a biomassa de biofilme remanescente após o tratamento, foi medida a absorbância (590 nm) usando leitor de microplacas UVM 340 (ASYS, Nova Analítica Importação e Exportação Ltda., SP, Brasil). Para o controle positivo foi utilizada a solução salina, em substituição aos eluídos do cimento. Meio de cultura estéril foi o controle negativo. Os dados foram expressos em porcentagem de redução da biomassa.

Teste de contato direto (TCD) sobre células planctônicas

Foram utilizadas microplacas de 96 poços (uma para cada cepa microbiana) onde os materiais foram manipulados e inseridos de forma padronizada na parede lateral do poço ($0,15 \pm 0,025$ gramas). Após a inserção do material, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para presa do material. Na sequência, as placas foram mantidas durante 30 minutos expostas a luz UV para descontaminação dos cimentos, em seguida $10 \mu\text{L}$ de cada inóculo foi depositado sobre o cimento. Houve um grupo controle positivo, no qual foi adicionado somente o inóculo. As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 1 h e 30 min.

Após período de contato e incubação, foram adicionados $250 \mu\text{L}$ de TSb em cada poço da placa contaminada com *E. faecalis* e *Sabouraud Dextrose broth* – SDb (Difco Detroit, MI, EUA) nos poços da placa contaminados com *C. albicans*. Posteriormente, foi realizada a diluição decimal seriada e a semeadura em placas contendo *Triptic soy agar* (TSa) e *Sabouraud Dextrose agar* (SDa), respectivamente. Após 48 horas de incubação das placas em estufa a 37°C , foi realizada contagem de UFC mL^{-1} e transformação logarítmica (\log_{10}).

Análise estatística

Tempo de presa (TP), radiopacidade, solubilidade, pH, escoamento, alteração volumétrica (AV) em Micro-CT, formação de nódulos mineralizados (ARS) e atividade antimicrobiana foram analisadas pelos testes estatísticos de ANOVA e Tukey. A viabilidade celular e a atividade de ALP foram analisadas por meio dos testes *two-way* ANOVA e Bonferroni *post-test*. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Propriedades físico-químicas

Os resultados da avaliação das propriedades físico-químicas estão representados na Tabela 2. MTAF mostrou maior tempo de presa e solubilidade ($P < 0,05$). NMTAP e MTAF mostraram valores inferiores de radiopacidade ($P < 0,05$), comparados ao AHP. MTAF teve maiores valores de escoamento ($P < 0,05$). MTAF mostrou maior redução volumétrica nos dois períodos avaliados ($P < 0,05$). NMTAP mostrou maior ganho volumétrico aos 7 e 30 dias, seguido de AHP que teve ganho de volume aos 7 dias e redução aos 30 dias.

Tabela 2 Média e desvio padrão dos valores de tempo de presa, radiopacidade, solubilidade, escoamento e alteração volumétrica observados em diferentes cimentos endodônticos

Testes	AHP	NMTAP	MTAF
Tempo de presa (minutos)	384.0 (± 0.0) ^b	236.2 (± 9.15) ^c	420.5 (± 6.03) ^a
Radiopacidade (mmAl)	9.13 (± 0.44) ^a	2.71 (± 0.20) ^b	2.61 (± 0.05) ^b
Solubilidade 7 dias (% perda de massa)	0.039 (± 0.048) ^b	-0.52 (± 1.68) ^b	30.39 (± 3.23) ^a
Escoamento (mm)	21.41 (± 1.14) ^b	14.24 (± 1.01) ^c	28.38 (± 0.95) ^a
Escoamento (mm ²)	407.2 (± 114.2) ^b	187.7 (± 33.71) ^c	652.9 (± 58.46) ^a
Alteração volumétrica 7 dias (%)	0.2827 (± 0.1311) ^b	1.149 (± 0.4110) ^b	-2.032 (± 1.090) ^a
Alteração volumétrica 30 dias (%)	-0.5281 (± 0.09783) ^c	1.126 (± 0.5555) ^b	-4.271 (± 1.802) ^a

AH Plus (AHP), NeoMTA Plus (NMTAP), MTA-Fillapex (MTAF). mmAl = milímetro de Alumínio; % perda de massa = porcentagem de perda de massa. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística significativa.

A Fig. 1 representa uma imagem tridimensional (3D) da sobreposição das imagens reconstruídas do cimento NMTAP nos diferentes períodos (7 e 30 dias).



Figura 1 Sobreposição realizada no programa CTVol (V2.0; Bruker-MicroCT) das imagens reconstruídas do cimento NMTAP: (A) Imagens sobrepostas do período inicial (cor verde) e 7 dias (vermelho); (B) Imagens sobrepostas do período inicial (cor verde) e 30 dias (vermelho).

NMTAP teve maiores valores de pH em todos os períodos, seguido por MTAF ($P < 0,05$). AHP não mostrou diferença do controle ($P < 0,05$) conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 Valores de pH (média e desvio padrão) observados nos diferentes períodos experimentais

Períodos experimentais	AHP	NMTAP	MTAF	Controle
1 dia	6.58 (± 0.16) ^c	10.42 (± 0.31) ^a	7.95 (± 0.46) ^b	6.65 (± 0.24) ^c
3 dias	6.59 (± 0.22) ^c	9.48 (± 0.61) ^a	7.10 (± 0.10) ^b	6.64 (± 0.09) ^c
7 dias	6.23 (± 0.39) ^c	10.26 (± 0.30) ^a	7.16 (± 0.10) ^b	6.45 (± 0.26) ^c
14 dias	6.42 (± 0.43) ^c	10.00 (± 0.52) ^a	7.92 (± 0.18) ^b	6.42 (± 0.21) ^c
21 dias	6.36 (± 0.36) ^c	9.37 (± 0.36) ^a	7.83 (± 0.10) ^b	6.68 (± 0.13) ^c
28 dias	6.07 (± 0.39) ^c	9.24 (± 0.40) ^a	7.57 (± 0.11) ^b	6.35 (± 0.29) ^c

AH Plus (AHP), NeoMTA Plus (NMTAP), MTA-Fillapex (MTAF), Controle = água destilada e deionizada. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística significativa.

Citotoxicidade: Ensaios de MTT e VN

Nos ensaios de MTT e VN, Saos-2 em contato com o MTAF mostraram menor viabilidade celular em comparação com os demais cimentos em todas as diluições avaliadas e com o controle negativo ($P < 0,05$), conforme Figura 2.

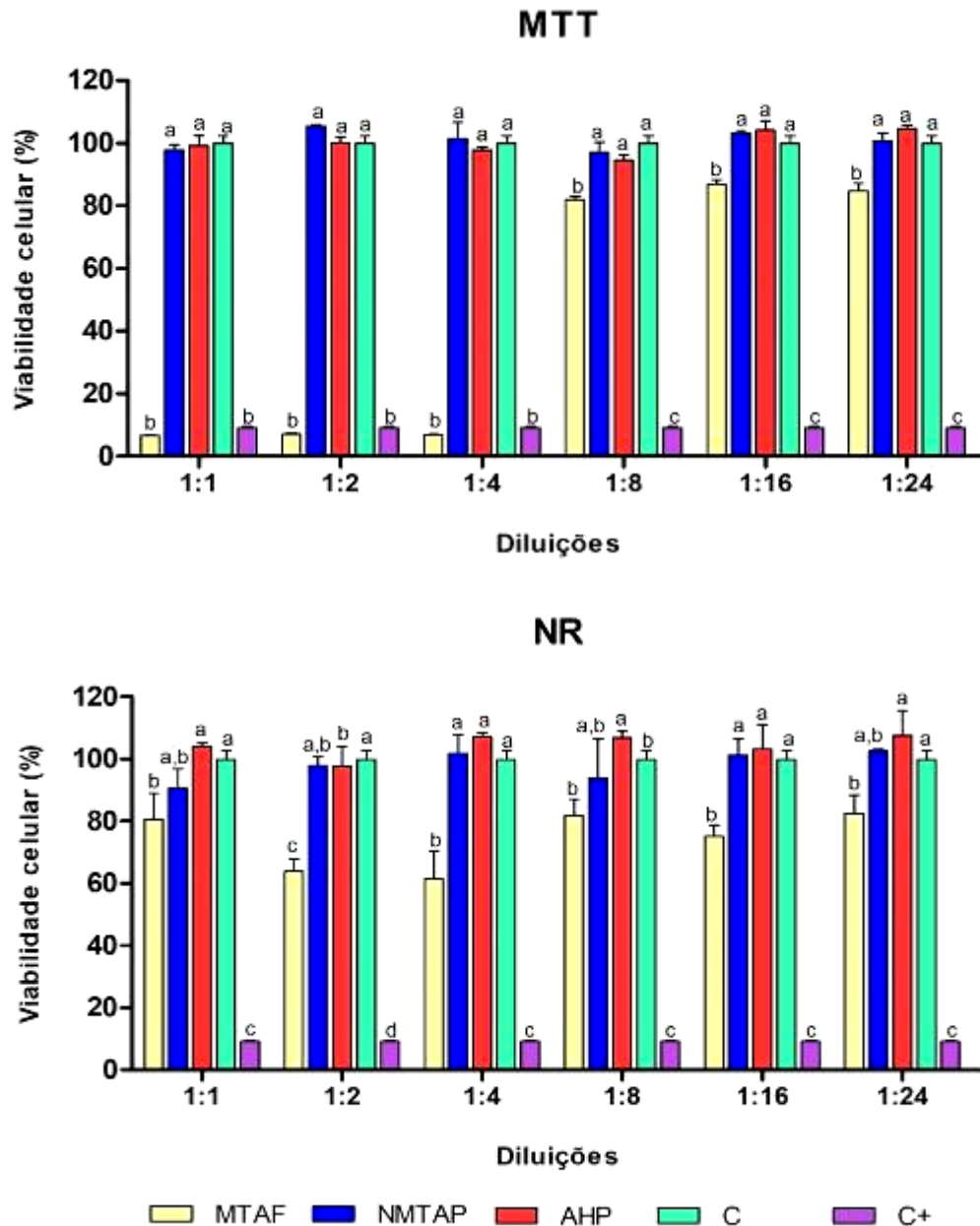


Figura 2 (A) Ensaio de MTT e (B) Vermelho Neutro (NR) após 24 horas de exposição das células Saos-2 aos eluídos dos cimentos nas diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:24). MTAF, MTA-Fillapex; NMTAP, NeoMTA Plus; AHP, AH Plus; e grupos controle negativo (meio de cultura D-MEM) e controle positivo (água oxigenada 0,001M). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os eluídos dos cimentos e grupos controle, ANOVA two-way e Bonferroni *post test* ($P < 0,05$).

Bioatividade celular: atividade de ALP e ensaio de mineralização (ARS)

NMTAP e AHP mostraram maior atividade de ALP no período de 7 dias ($P < 0.05$) em relação ao grupo controle. MTAF apresentou menor atividade de ALP nos períodos de 1 e 7 dias ($P < 0.05$) quando comparados ao controle, conforme mostrado na Figura 3.

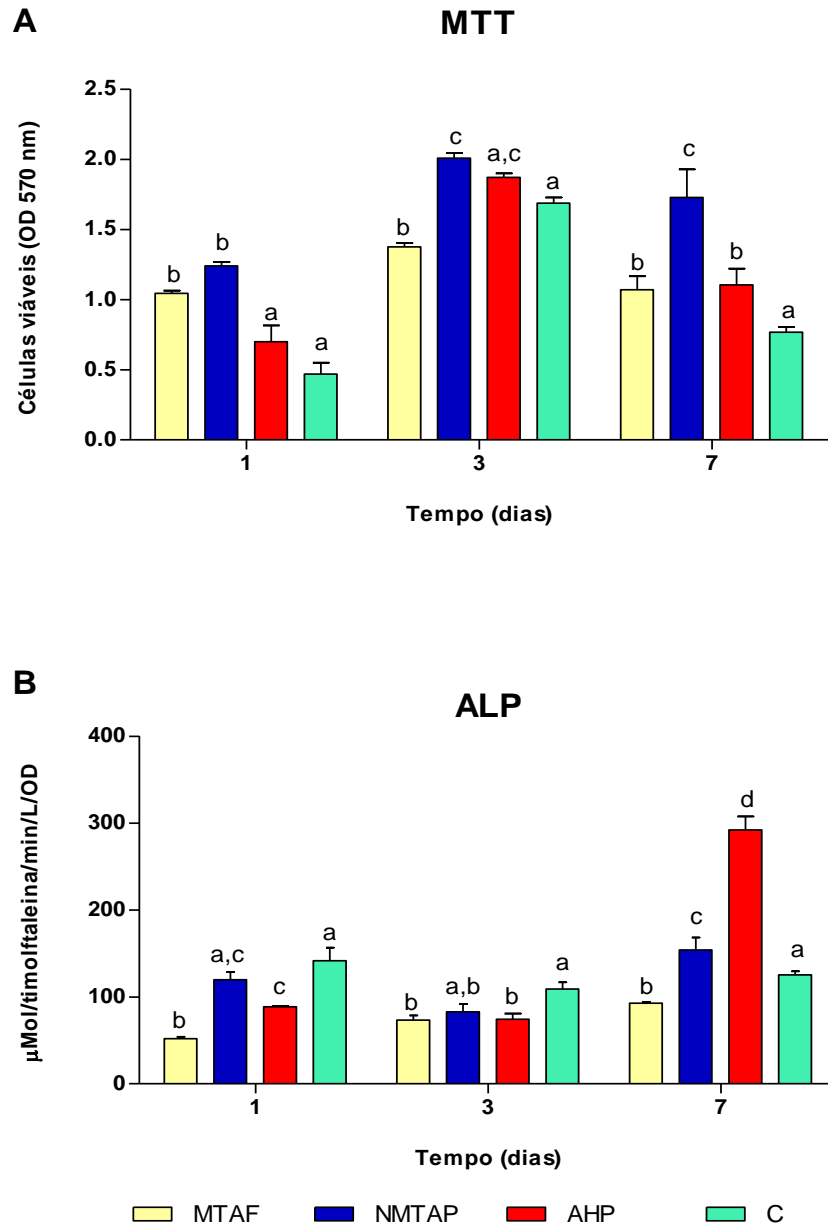


Figura 3 Ensaio de citotoxicidade MTT (A) e de bioatividade celular pela atividade de ALP (B), após 1, 3 e 7 dias de exposição das células Saos-2 aos eluídos dos cimentos na diluição de 1:24. MTAF, MTA Fillapex; NMTAP, NeoMTA Plus; AHP, AH Plus; C: grupo controle negativo (meio de cultura D-MEM). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os eluídos dos cimentos e controle negativo. ANOVA *two-way* e Bonferroni *post test* ($P < 0,05$).

A Figura 4 mostra os resultados do ensaio de mineralização (ARS). Os cimentos NMTAP e AHP induziram maior deposição de nódulos mineralizados quando comparados ao grupo controle ($P < 0,05$). MTAF não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle ($P > 0,05$).

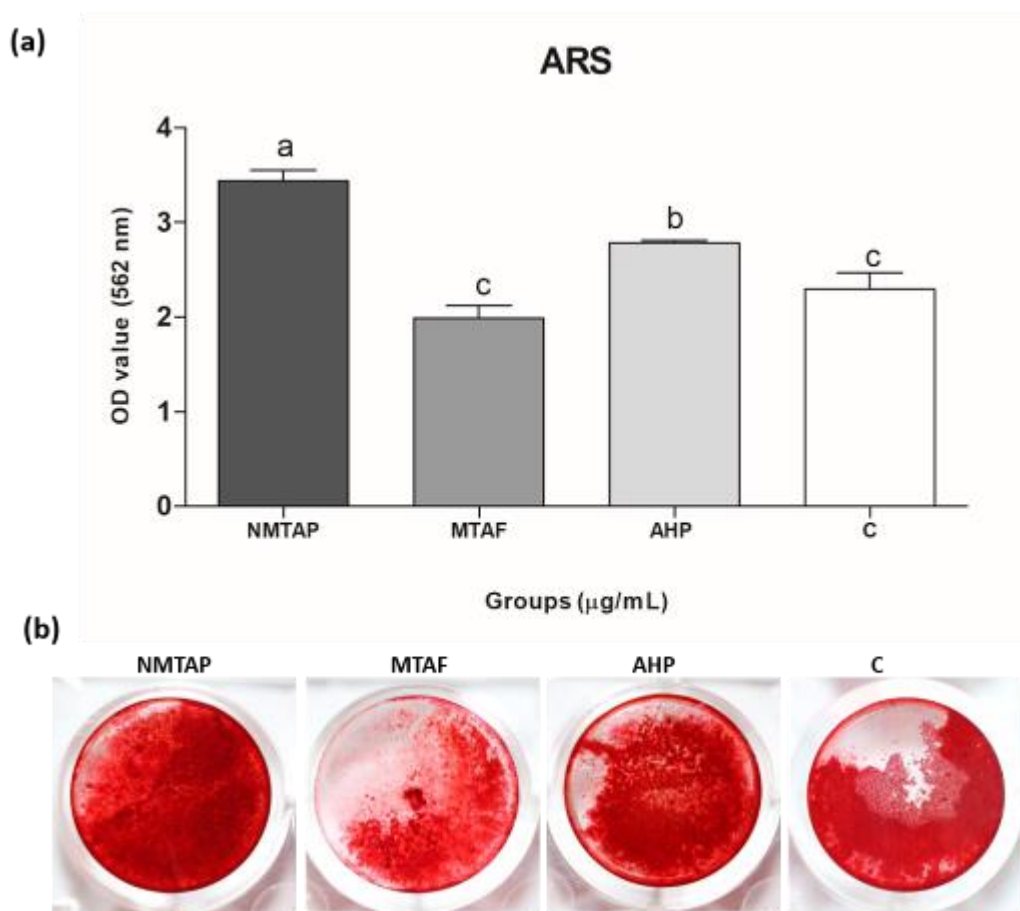


Figura 4 (a) Ensaio de Coloração vermelho de alizarina (ARS). Análises estatísticas após 21 dias de exposição das células aos eluídos dos cimentos. (b) Culturas osteogênicas de Saos-2 mostraram deposição de cálcio como demonstrado pelo ARS positivo. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significante entre os eluídos dos cimentos e grupo controle (meio de cultura D-MEM osteogênico). NMTAP, NeoMTA Plus; MTAF, MTA FillapexAHP, AH Plus; CN: grupo controle negativo.

Potencial bioativo: análise em MEV

NMTAP mostrou maior deposição de minerais (Escore 4), seguido por MTAF (Escore 2). AHP não mostrou potencial bioativo (Escore 0), conforme Figura 5.

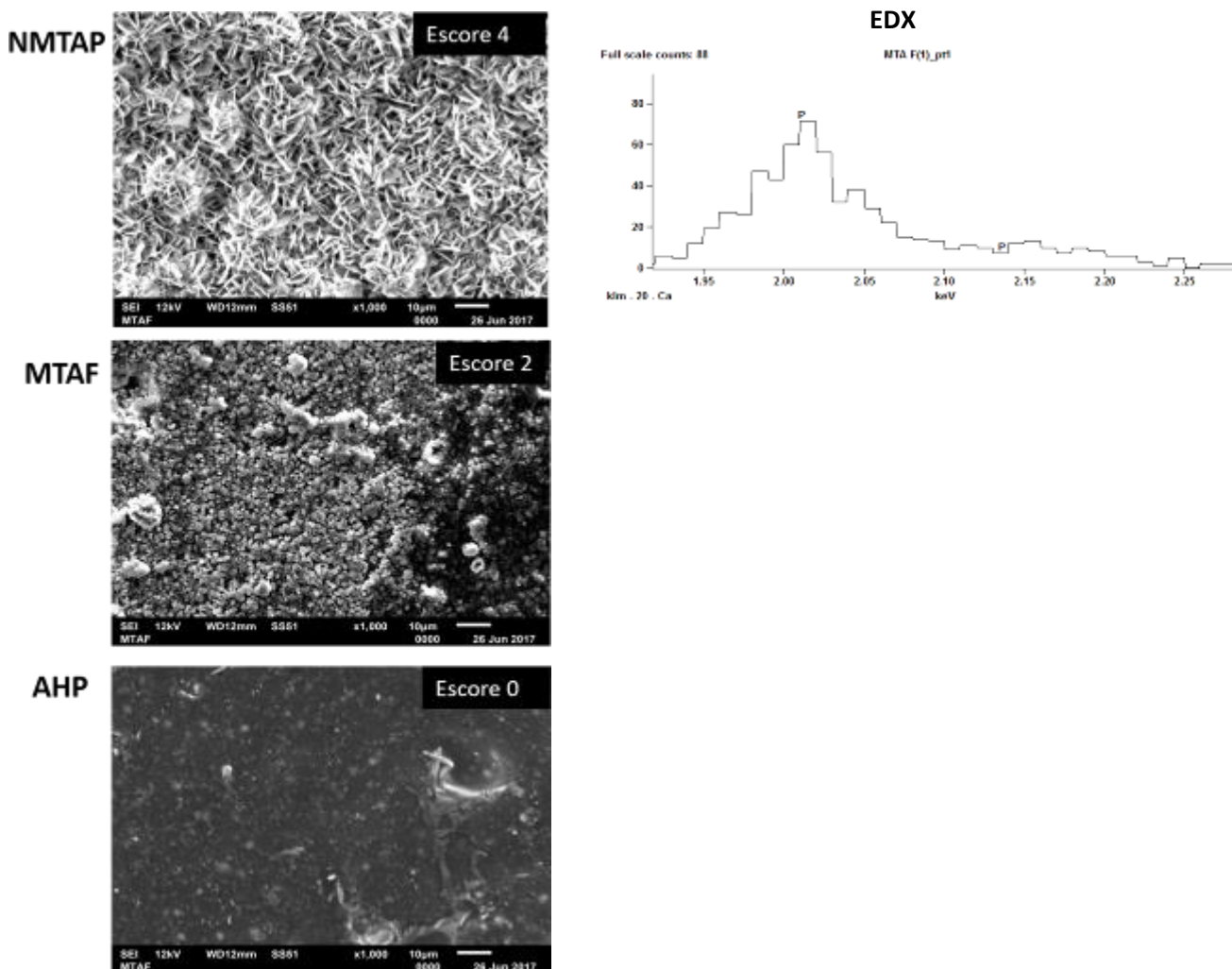


Figura 5 Ensaio de bioatividade em microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cimentos após 30 dias de contato com solução PBS. NMTAP apresentou escore 4, com maior deposição de minerais, seguido por MTAF que mostrou menor deposição de minerais (escore 2). A análise em Espectroscopia Dispersiva de Raio-X (EDX) do cimento NMTAP mostrou deposição de íons fosfato do material. AHP não mostrou potencial bioativo (escore 0). NMTAP, NeoMTA Plus; MTAF, MTA Fillapex; AHP, AH Plus.

Atividade antimicrobiana: ensaio cristal violeta e TCD sobre células planctônicas

No ensaio de cristal violeta, NMTAP mostrou maior atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e biofilme dual-espécies quando comparado ao MTAF ($P < 0,05$). NMTAP e MTAF mostraram efetividade contra *C. albicans*, sem diferença estatística significativa entre eles (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão da porcentagem de redução da biomassa após 24 horas de contato dos eluídos dos cimentos (48 horas) com biofilmes mono- e dual-espécies de *E. faecalis* e/ou *C. albicans*

Grupos	NMTAP	MTAF	AHP
<i>E. faecalis</i>	13,46 ($\pm 5,6$) ^a	5,58 ($\pm 2,4$) ^b	14,77 ($\pm 4,2$) ^a
<i>C. albicans</i>	21,36 ($\pm 10,2$) ^a	13,0 ($\pm 5,4$) ^{ab}	12,20 ($\pm 4,9$) ^b
Dual-espécies	42,40 ($\pm 3,8$) ^a	15,36 ($\pm 3,3$) ^c	22,05 ($\pm 2,9$) ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos. ANOVA e Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados do TCD sobre células planctônicas estão representados na Tabela 5. Todos os cimentos mostraram redução da contagem bacteriana quando comparados com o grupo C+ ($P < 0,05$), exceto o AHP sobre *E. faecalis* ($P > 0,05$). NMTAP foi mais efetivo contra *E. faecalis* e MTAF mostrou eliminação completa de *C. albicans*. Não houve diferença estatística significativa entre NMTA e AHP sobre *C. albicans* ($P > 0,05$).

Tabela 5. Média e desvio padrão dos valores de UFC mL⁻¹ (\log_{10}) após 1 hora e 30 minutos de contato direto dos cimentos (24 horas de presa) com células planctônicas de *E. faecalis* ou *C. albicans*

Grupos	NMTAP	MTAF	AHP	C+
<i>E. faecalis</i>	5,41 ($\pm 0,69$) ^d	6,63 ($\pm 0,30$) ^{bc}	7,15 ($\pm 0,32$) ^{ac}	7,67($\pm 0,23$) ^a
<i>C. albicans</i>	3,41($\pm 0,80$) ^b	0 (± 0) ^c	3,18($\pm 0,62$) ^b	5,33 ($\pm 0,47$) ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos. ANOVA e Tukey ($P < 0,05$).

Discussão

A hipótese nula neste estudo foi rejeitada porque há diferenças nas propriedades físico-químicas, biológicas e antimicrobianas dos cimentos NMTAP e MTAF, quando comparados ao cimento AHP.

Cimentos obturadores à base de MTA e silicato de cálcio são desenvolvidos visando associar adequadas propriedades biológicas e físico-químicas para obturação dos canais radiculares (Baraba *et al.* 2016). O tempo de presa adequado é de 30 minutos a 72 horas (ISO 6876-2012) ou com variação menor que 10% do tempo determinado pelo fabricante (ANSI/ADA 2000) (Lee *et al.* 2017). Em condições de umidade, MTAF mostrou maior tempo de presa (Lee *et al.* 2017, Prullage *et al.* 2016) quando comparado ao NMTAP e AHP. O tempo de presa prolongado dos cimentos aumenta o potencial de dissolução do material, podendo afetar a solubilidade (Vivan *et al.* 2010). Fato corroborado com os resultados deste estudo, pois o MTAF apresentou elevada solubilidade.

A radiopacidade permite a observação do material obturador endodôntico no exame radiográfico (Lee *et al.* 2017). No presente estudo, AHP mostrou maior radiopacidade quando comparado aos cimentos NMTAP e MTAF, que mostraram radiopacidade menor que as recomendações da norma ISO ($\geq 3,00$ mmAl). A nova formulação do MTAF apresenta a troca do radiopacificador óxido de bismuto pelo tungstato de cálcio. MTAF mostrou baixa radiopacidade (2,61 mmAl) quando comparado à sua formulação anterior, que mostrou valor de 7,17 mmAl (Gandolfi *et al.* 2016), o que demonstra que a modificação do agente radiopacificador prejudicou esta propriedade. AHP apresenta maior radiopacidade devido à presença de dois radiopacificadores, tungstato de cálcio e óxido de zircônio (Siboni *et al.* 2017b).

A solubilidade dos cimentos endodônticos influencia a capacidade de selamento dos materiais (Poggio *et al.* 2010). MTAF mostrou solubilidade maior que o recomendado pela norma ISO 6876, conforme já observado (Borges *et al.* 2014). O alto valor de solubilidade de MTAF pode ser relacionado à resina de salicilato presente em sua composição e a alta deposição de íons cálcio apresentada pelo material (Gandolfi *et al.* 2016, Portella *et al.* 2015). Além disso, a redução volumétrica do material observada neste estudo por meio da análise em Micro-CT pode estar relacionada à alta solubilidade de MTAF. NMTAP mostrou adequado valor de solubilidade (ISO 6876-2012). Porém, a avaliação da solubilidade em materiais hidrofílicos como os cimentos à base de silicato de cálcio pode mostrar aumento da massa (Marciano *et al.* 2016). Desta forma, a análise complementar da solubilidade desses materiais

pelo teste de alteração volumétrica em Micro-CT pode fornecer informações importantes (Torres *et al.* 2017). O escoamento permite que o cimento preencha os espaços de difícil acesso, como istmos e canais acessórios. MTAF teve os maiores valores de escoamento, concordando com outros estudos (Lee *et al.* 2017, Tanomaru-Filho *et al.* 2013), seguido por AHP e NMTAP. A alta proporção de resina do MTAF pode promover o maior escoamento do material (Lee *et al.* 2017).

NMTAP, MTAF e AHP mostraram alteração volumétrica observada em diferentes períodos usando micro-CT. NMTAP mostrou aumento de volume nos dois períodos avaliados, MTAF teve maior redução volumétrica, seguido por AHP. A significativa redução volumétrica do MTAF pode estar relacionada à sua alta solubilidade (Viapiana *et al.* 2014) que pode prejudicar o selamento do espaço endodôntico (Gandolfi *et al.* 2016). Em contrapartida, o aumento volumétrico do NMTAP pode ser explicado pelo aumento de massa favorecendo o preenchimento adequado do sistema de canais radiculares (Torres *et al.* 2017). AH Plus mostrou menor alteração volumétrica nos diferentes períodos avaliados, com valores similares aos observados em estudo prévio (Tanomaru-Filho *et al.* 2017b), e pode ser explicado pela ligação dos polímeros resinosos do material que propiciam a absorção de água após a presa e baixa solubilidade (Poggio *et al.* 2010), gerando um aumento de volume do material.

O pH elevado dos cimentos é uma propriedade desejável, pois está relacionado com atividade antimicrobiana e também com a indução da formação de tecido mineralizado quando em contato com os tecidos (Holland *et al.* 2001). O pH alcalino pode favorecer atividade antimicrobiana (Zhou *et al.* 2013). Na avaliação do pH, NMTAP mostrou os maiores valores de pH nos diferentes intervalos de tempo, seguido por MTAF e AHP que foi similar ao grupo controle e mostrou um pH próximo ao neutro. Cimentos à base de silicato de cálcio apresentam pH alcalino (Zhou *et al.* 2013). AHP é um cimento à base de resina epóxica e isso pode explicar o pH neutro desse material (Siboni *et al.* 2017b).

A citotoxicidade e bioatividade celular dos materiais foram avaliadas em osteoblastos Saos-2 (Tanomaru-Filho *et al.* 2017a). No presente estudo, MTAF foi mais citotóxico quando comparado aos outros cimentos avaliados (Baraba *et al.* 2016, Mestieri *et al.* 2015) com diminuição notável da viabilidade celular, afetando as propriedades de adesão das células. A resposta citotóxica do MTAF pode ser explicada pela alta solubilidade do material, que leva a liberação de componentes tóxicos, como a resina de salicilato, potencialmente irritantes ao tecido apical (Baraba *et al.* 2016). NMTAP e AHP mostraram adequada viabilidade celular, concordando com outros estudos (Rodriguez-Lozano *et al.* 2017, Tomas-Catala *et al.* 2017).

A avaliação de ALP determina a bioatividade celular do material e seu potencial para induzir reparo com formação de tecido mineralizado (Tanomaru-Filho *et al.* 2017a). Neste estudo, MTAF mostrou menor atividade de ALP, em concordância com estudo prévio (Salles *et al.* 2012). NMTAP e AHP tiveram um aumento de atividade de ALP ao sétimo dia, com destaque para AHP que mostrou maior atividade de ALP (Barros *et al.* 2014). Na avaliação da bioatividade celular pelo ensaio de coloração ARS, o cimento NMTAP induziu maior deposição de nódulos de mineralização, em concordância com estudo prévio (Tanomaru-Filho *et al.* 2017a).

O potencial bioativo do NMTAP é relacionado a sua composição à base de silicato de cálcio que induz a formação de nódulos de mineralização (Tanomaru-Filho *et al.* 2017a). No ensaio de bioatividade em MEV, NMTAP mostrou grande deposição de minerais, seguido por MTAF. Na análise em EDX, NMTAP mostrou significativa deposição de íons fosfato, que promovem formação de cristais de hidroxiapatita (Baraba *et al.* 2016) importantes para o processo de mineralização e reparo apical pós tratamento endodôntico (Mestieri *et al.* 2015, Tanomaru-Filho *et al.* 2013).

O estudo das propriedades antimicrobianas dos cimentos foi avaliado sobre *E. faecalis* e/ou *C. albicans*, que são micro-organismos associados à infecções periapicais persistentes, devido à sua capacidade de resistir ao tratamento endodôntico (Eldeniz *et al.* 2007). Cimentos endodônticos com propriedades antimicrobianas podem reduzir e prevenir o crescimento desses microorganismos, auxiliando no processo de reparo tecidual pós tratamento endodôntico. No presente estudo, NMTAP mostrou maior atividade antibiofilme sobre *E. faecalis*, *C. albicans* e sobre biofilme dual-espécies, sendo que os períodos utilizados para incubação dos biofilmes (48 e 72 h) foram padronizados em testes pilotos.

MTAF mostrou maior efetividade sobre células planctônicas de *C. albicans* em concordância com estudo prévio (Jafari *et al.* 2017). A atividade antimicrobiana de MTAF foi avaliada sobre células planctônicas de *E. faecalis* em contato com cimento fresco e após presa do cimento e foi observado menor efetividade após 7 dias de presa do material (Morgental *et al.* 2011). No entanto, a eficácia antimicrobiana do MTAF sobre células planctônicas de *E. faecalis* foi demonstrada (Hasheminia *et al.* 2017), concordando com o presente estudo. Não existem estudos sobre as propriedades antimicrobianas do cimento NMTAP.

Conclusão

NMTAP apresenta propriedades físico-químicas (tempo de presa, solubilidade e pH), biocompatibilidade e bioatividade celular adequadas, assim como maior atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, *C. albicans* e sobre biofilme dual-espécies, porém menor escoamento e radiopacidade segundo as normas ISO-6876. MTAF apresentou redução volumétrica, citotoxicidade e efetividade antimicrobiana sobre células planctônicas de *C. albicans* e menor bioatividade celular, além de radiopacidade inferior e solubilidade superior às recomendações ISO-6876.

Referências

- ANSI/ADA (2000) American National Standards Institute/American Dental Association. Specification no. 57 ADA. Laboratory testing methods: endodontic filling and sealing materials. Endodontic sealing materials. Chicago, USA, 2000.
- Baraba A, Pezelj-Ribaric S, Roguljic M, Miletic I (2016) Cytotoxicity of Two Bioactive Root Canal Sealers. *Acta Stomatologica Croatica* **50**, 8-13.
- Barros J, Costa-Rodrigues J, Lopes MA, Pina-Vaz I, Fernandes MH (2014) Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH plus and pulp canal sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *Journal of Endodontics* **40**, 1149-55.
- Borges AH, Orcati Dorileo MC, Dalla Villa R *et al.* (2014) Physicochemical properties and surfaces morphologies evaluation of MTA FillApex and AH plus. *Scientific World Journal* **1**, 1-7.
- Camilleri J (2015) Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *Journal of Endodontics* **41**, 1139-45.
- Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoretic MA, Consani S, Sousa-Neto MD (2007) Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *Journal of Endodontics* **33**, 1110-6.
- Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE (2007) Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International Endodontic Journal* **40**, 329-37.
- Gandolfi MG, Siboni F, Prati C (2016) Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dental Materials* **32**, e113-26.

- Hasheminia M, Razavian H, Mosleh H, Shakerian B (2017) In vitro evaluation of the antibacterial activity of five sealers used in root canal therapy. *Dental Research Journal (Isfahan)* **14**, 62-7.
- Holland R, de Souza V, Nery MJ *et al.* (2001) Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Brazilian Dental Journal* **12**, 3-8.
- ISO (6876-2012) International Organization for Standardization (2012). Dentistry - Root Canal Sealing Materials. London, UK: British Standards Institution ISO 6876.
- Jafari F, Jafari S, Samadi Kafil H, Momeni T, Jamloo H (2017) Antifungal Activity of Two Root Canal Sealers against Different Strains of Candida. *Iran Endodontic Journal* **12**, 98-102.
- Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V, Chitnis DS (2008) Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian Journal of Medical Microbiology* **26**, 241-2.
- Lee JK, Kwak SW, Ha JH, Lee W, Kim HC (2017) Physicochemical Properties of Epoxy Resin-Based and Bioceramic-Based Root Canal Sealers. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2017**, 2582849.
- Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J (2016) Calcium silicate-based sealers: Assessment of physicochemical properties, porosity and hydration. *Dental Materials* **32**, e30-40.
- Mestieri LB, Gomes-Cornelio AL, Rodrigues EM *et al.* (2015) Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *Journal of Applied Oral Science* **23**, 467-71.
- Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM (2011) Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **44**, 1128-33.
- Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Colombo M, Bianchi S, Visai L (2010) Solubility of root canal sealers: a comparative study. *The International Journal of Artificial Organs* **33**, 676-81.
- Portella FF, Collares FM, Santos PD *et al.* (2015) Glycerol Salicylate-based Pulp-Capping Material Containing Portland Cement. *Brazilian Dental Journal* **26**, 357-62.
- Prati C, Gandolfi MG (2015) Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dental Materials* **31**, 351-70.
- Prullage RK, Urban K, Schafer E, Dammaschke T (2016) Material Properties of a Tricalcium Silicate-containing, a Mineral Trioxide Aggregate-containing, and an Epoxy Resin-based Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics* **42**, 1784-8.
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125-31.

Rodriguez-Lozano FJ, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM (2017) Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *International Endodontic Journal* **50**, 67-76.

Roy AV (1970) Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clinical Chemistry* **16**, 431-6.

Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimaraes FC *et al.* (2012) Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *Journal of Endodontics* **38**, 971-6.

Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG (2017a) Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *International Endodontic Journal* **50 Suppl 2**, e83-e94.

Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG (2017b) Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *International Endodontic Journal* **50 Suppl 2**, e120-e36.

Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM *et al.* (2017a) Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *International Endodontic Journal* **50 Suppl 2**, e31-e9.

Tanomaru-Filho M, Bosso R, Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Radiopacity and flow of different endodontic sealers. *Acta Odontologica Latinoamericana* **26**, 121-5.

Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Tanomaru JM, Bier CA (2007) Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Australian Endodontic Journal* **33**, 23-6.

Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chavez-Andrade GM *et al.* (2017b) Physicochemical Properties and Volumetric Change of Silicone/ Bioactive Glass and Calcium Silicate-based Endodontic Sealers. *Journal of Endodontics* **43**, 2097-101.

Tomas-Catala CJ, Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D *et al.* (2017) Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal* **50 Suppl 2**, e63-e72.

Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli J, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2017) Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *Journal of Applied Oral Science* **25**, 374-80.

- Tran D, He J, Glickman GN, Woodmansey KF (2016) Comparative Analysis of Calcium Silicate-based Root Filling Materials Using an Open Apex Model. *Journal of Endodontics* **42**, 654-8.
- Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M (2014) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International Endodontic Journal* **47**, 437-48.
- Viapiana R, Moizadeh AT, Camilleri L, Wesselink PR, Tanomaru Filho M, Camilleri J (2016) Porosity and sealing ability of root fillings with gutta-percha and BioRoot RCS or AH Plus sealers. Evaluation by three ex vivo methods. *International Endodontic Journal* **49**, 774-82.
- Vivan RR, Zapata RO, Zeferino MA *et al.* (2010) Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **110**, 250-6.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T (1981) A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clinical Chemistry* **27**, 493-501.
- Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M (2013) Physical properties of 5 root canal sealers. *Journal of Endodontics* **39**, 1281-6.

4 DISCUSSÃO

Novos cimentos endodônticos são desenvolvidos visando melhorar propriedades físico-químicas e biológicas quando comparados aos cimentos disponíveis no mercado. MTAF foi estudado na sua formulação atual com tungstato de cálcio como radiopacificador e apresentou maior tempo de presa, concordando com estudos prévios^{38,62}. A maior solubilidade apresentada pelo material pode ter relação com seu tempo de presa longo⁸⁷, além de outros fatores relacionados com sua composição. AHP mostrou maior valor de radiopacidade, devido à presença de dois agentes radiopacificadores em sua composição, tungstato de cálcio e óxido de zircônio, que confere ao material maior radiopacidade⁶.

MTAF mostrou valor de solubilidade superior ao recomendado pela norma ISO⁷³, enquanto NMTAP mostrou o menor valor de solubilidade. MTAF também mostrou maiores valores de escoamento, como observados por alguns estudos^{61,62} seguido por TF e AHP. A alta proporção de resina natural e de salicilato pode explicar, o escoamento elevado apresentado por este material, além da alta solubilidade apresentada, o que pode prejudicar o selamento do sistema de canais radiculares^{59,62}.

NMTAP mostrou os maiores valores de pH, conforme já demonstrado⁸⁶, seguido por MTAF; e AHP apresentou pH próximo ao neutro de acordo com estudo prévio⁶. O pH alcalino é comum para cimentos à base de silicato de cálcio^{6,41}.

A microtomografia computadorizada (micro-CT) é uma ferramenta para avaliação de propriedades de materiais como a alteração dimensional, permitindo análise tridimensional qualitativa e quantitativa⁸⁸, de forma a complementar os testes de alteração dimensional convencional^{89,90}. O uso do micro-CT para avaliação da alteração volumétrica permite uma melhor compreensão do comportamento dos cimentos endodônticos⁹⁰.

MTAF mostrou maior redução volumétrica e NMTAP mostrou maior aumento volumétrico. A elevada solubilidade de MTAF pode explicar a significativa redução volumétrica do material. Em contrapartida, o aumento volumétrico do cimento NMTAP pode ser explicado pela baixa solubilidade, além da expansão do material e consequente aumento volumétrico.

Cimentos à base de silicone e silicato de cálcio foram avaliados neste estudo. Na avaliação da citotoxicidade, GFB, TF e AHP mostraram citocompatibilidade em contato com as células Saos-2 para os testes de MTT e VN realizados, de forma similar aos estudos publicados^{29,33,43,91}. Biocompatibilidade dos cimentos endodônticos é fundamental no

processo de reparo apical que deverá ocorrer após tratamento⁹². Já a bioatividade dos materiais é caracterizada pelo potencial dos cimentos endodônticos em promover reparo e formação de tecido mineralizado⁹³.

Na avaliação da bioatividade celular, GFB mostrou maior atividade de ALP, seguido por TF e AHP. AHP também mostrou atividade de ALP em estudo prévio⁹⁴. No ensaio de coloração ARS, todos os cimentos mostraram deposição de nódulos de mineralização e apenas TF mostrou bioatividade em MEV. No Capítulo 2, MTAF mostrou maior citotoxicidade quando comparado aos cimentos avaliados. Alguns estudos também observaram maior citotoxicidade do cimento MTAF^{39,70,72,95,96}. A resposta citotóxica do MTAF pode ser explicada pela alta solubilidade do material, que leva a liberação de componentes tóxicos potencialmente irritantes⁷⁰. NMTAP mostrou elevada deposição de cristais de hidroxiapatita, adequada viabilidade celular nos períodos avaliados e bioatividade celular, em concordância com estudo prévio³⁰, que avaliou NMTAP como cimento reparador e observou deposição de íons cálcio pelo ensaio de coloração ARS e esse resultado se deve ao potencial de deposição de minerais de cimentos à base de silicato de cálcio, que auxilia no processo de mineralização e reparo apical pós tratamento endodôntico^{61,72}.

Micro-organismos como *E. faecalis* e *Candida albicans* são associados à infecções periapicais persistentes e ao insucesso do tratamento endodôntico^{3,11,15}. Este estudo avaliou as propriedades antimicrobianas dos cimentos à base de silicone e silicato de cálcio. No preparo dos inóculos e formação de biofilme, cepas padrão de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* foram utilizadas. Serão realizados os testes de contato direto dos eluídos dos cimentos sobre biofilme com coloração cristal violeta, contato direto sobre células planctônicas e capacidade anti-adesão de biofilme de *E. faecalis* em MEV.

O teste de contato direto (TCD) foi introduzido em 1996⁹⁷, é um método quantitativo e reproduzível que permite a detecção da ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos⁹⁸. O TCD avalia o efeito do contato direto entre o cimento endodôntico e o micro-organismo testado e independe da solubilidade e difusibilidade dos componentes antimicrobianos do cimento⁹⁷. Este teste também é capaz de distinguir entre propriedades bactericidas e bacteriostáticas do material e pode ser usado para testar cimentos em vários estágios de presa^{3,11}. *C. albicans* pode ser encontrada em cepas puras isoladas ou em conjunto com bactérias Gram positivas e negativas^{17,18}. A maioria dos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano dos cimentos endodônticos em bactérias planctônicas (bactérias isoladas flutuantes), que no entanto, não simula uma situação in vivo, pois a maioria das bactérias na cavidade oral se apresentam na forma de biofilme e suas características são diferentes¹¹. No

biofilme, as bactérias se agregam em uma matriz polimérica hidratada e constituem colônias sésseis que são resistentes a agentes antimicrobianos^{98,99}.

O método de cristal violeta é o método de coloração mais utilizado para a quantificação de biomassa de biofilme¹⁰⁰. Após a coloração, o corante adsorvido é diluído utilizando um solvente, no caso será usado o ácido acético a 33% . A quantidade de corante solubilizado pelo solvente (medido por absorvância óptica a 570 nm) será diretamente proporcional para o tamanho do biofilme formado¹⁰¹.

A atividade antimicrobiana dos cimentos AHP, MTAF e Gutta Flow 2 sobre *E. faecalis* foi avaliada por teste de difusão em ágar e teste de contato direto, mostrando inibição bacteriana para AHP, seguido por MTAF⁴⁸. A atividade antibacteriana dos cimentos AHP e Endosequence BC sobre *E. faecalis* foi avaliada mostrando efetividade¹⁰². No presente estudo, TF mostrou atividade antimicrobiana sobre células planctônicas e biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans*. TF demonstra atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*^{75,103}. GFB e AHP mostraram ser efetivos sobre biofilme de *C. albicans* e biofilme dual-espécies. NMTAP mostrou maior atividade antibiofilme sobre *C. albicans* e biofilme dual-espécies. MTAF mostrou maior efetividade contra células planctônicas de *C. albicans*, concordando com estudo prévio¹⁹. Não existe correlação entre a solubilidade e a atividade antimicrobiana por meio do TCD, uma vez que este avalia o efeito do contato direto entre o cimento e o micro-organismo independente da solubilidade e difusibilidade dos componentes antimicrobianos do cimento⁹⁷. Porém, não há estudos na literatura que descrevam as propriedades antimicrobianas dos cimentos GFB e NMTAP.

Os cimentos obturadores disponíveis no mercado diferem quanto a sua composição, propriedades físico-químicas e biológicas. A compreensão das propriedades dos cimentos obturadores permite maior base científica para aplicação na prática clínica¹⁵, além de contribuir para o desenvolvimento de novos cimentos obturadores.

5 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA CORRESPONDENTE ÀS PUBLICAÇÕES 1 E 2

A 1: Avaliação de Citotoxicidade e Bioatividade

A 1.1: Preparo dos eluídos dos cimentos

Os cimentos foram manipulados utilizando espátula de aço inoxidável e placa de vidro estéreis. Na sequência, foram colocados no fundo de poços vazios de placas de cultura de 12 poços (314.0 mm² área e 3.0 mm altura) (Jet Biofil®, Guangzhou, Luokan, China). As placas permaneceram em estufa a 37°C e umidade relativa por 48 horas, até a completa presa dos materiais. Após este período, as placas foram expostas a luz ultravioleta - UV durante 30 minutos para descontaminação. Em seguida, colocou-se 5 mL de meio de cultura Dulbecco modificado - DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) sem soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) em cada poço das placas em que o material foi acomodado e mantido durante 24 horas (37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂) para criar o eluído de cada material (ISO 10993-5 2005) (Figura A1).

Figura A1- Placa de 12 poços com os eluídos dos cimentos



Fonte: Arquivo pessoal do autor

A 1.2: Cultura celular

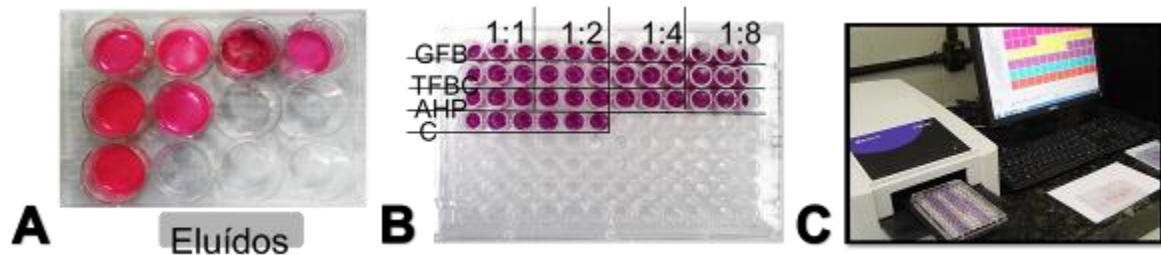
Células Saos-2 (ATCC HTB-85), que são células semelhantes a osteoblastos humanos, foram cultivadas em frascos T-75 (Jet Biofil, Guangdong, Guangzhou, Luokan, China), contendo meio DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), penicillina (100 IU

mL⁻¹), e estreptomicina (100 mg mL⁻¹) mantidos em 95 % de umidade, 5% CO₂ e 37 °C até a confluência. As células aderentes em fase de crescimento logarítmico foram detectadas pela mistura de tripsina / ácido etilenodiaminotetracético (0,25%) (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 3 minutos.

A 1:3: *Ensaio de viabilidade celular*

A viabilidade celular foi avaliada por meio dos testes 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-brometo de difenil-tetrazólio (MTT) e vermelho neutro (Neutral Red - NR). Para realizar estes ensaios, as células Saos-2 foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ células mL⁻¹ em placas de 96 poços (Jet Biofil) contendo DMEM suplementado com 10 % de SFB e foram cultivadas por 24 horas a 37 °C, 95 % de umidade e 5 % CO₂ para obter células aderentes antes da exposição aos materiais. Na publicação 1 as células foram expostas aos eluídos dos cimentos por 24 horas nas diluições de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, e na publicação 2 nas diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:24 como ao controle negativo, meio DMEM sem soro, e ao controle positivo, DMSO 20%. A diluição máxima utilizada está de acordo com a citotoxicidade dos cimentos, de forma que não causem dano celular e foram determinadas em estudos pilotos.

O ensaio MTT baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal de cor amarela que é o brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-brometo de difenil-tetrazólio, solúvel em água (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO), em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional ao número de células vivas. O ensaio MTT foi realizado em dois momentos distintos, simultaneamente ao ensaio NR após exposição das células Saos-2 aos eluídos dos cimentos nas diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 (publicação 1) e 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:24 (publicação 2), por 24 horas e simultaneamente ao ensaio ALP após exposição de Saos-2 aos eluídos dos cimentos na diluição 1:8 e 1:24 (publicação 1 e 2, respectivamente) pelos períodos de 1, 3 e 7 dias. Após cada período experimental, o meio foi trocado por 100 µL de DMEM contendo solução de MTT 5 mg mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas durante 3 horas, a 37 °C, 95 % de umidade e 5% de CO₂. Em seguida, lavou-se cada um dos poços com PBS 1x (tampão fosfato) e adicionou-se 100 µL de isopropanol acidificado 0,04 N (Sigma-Aldrich) para solubilizar o formazan. A densidade óptica de (OD) 570 nm foi mesurada num espectrofotômetro UVM 340 (ASYS, Nova Analítica Importação e Exportação Ltda., SP, Brasil). Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação (n = 3) e o experimento foi repetido três vezes independentemente (Figura A2).

Figura A2 - Ensaio MTT – Publicação 1

(A) Preparo dos eluídos dos cimentos, meio de cultura incompleto em contato com os materiais e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas; (B) Diluições dos cimentos em contato com as células por 24 horas e após incubação com sal de MTT (Sigma); (C) Leitura da placa- espectrofotômetro (DO=570 nm)

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Vermelho neutro (Neutral Red - NR) é um corante vital que é incorporado por endocitose e se acumula nos lisossomos das células que possuem membrana intacta. Para o ensaio NR, as células permaneceram em contato com os extratos dos cimentos nas diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 na publicação 1 e 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:24 na publicação 2, pelo período de 24 horas. Após este período, os mesmos foram substituídos por 0,1 mL de meio DMEM incompleto (sem SFB) contendo 50 µg do NR / mL (Sigma-Aldrich), seguido de incubação a 37°C, 95 % de umidade e 5 % de CO₂ por 3 horas. O corante foi então removido e o produto colorimétrico foi solubilizado em 100 µL de etanol a 50 % e solução de ácido acético a 1 % (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro a 570 nm (UVM 340). Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação (n = 3) e o experimento foi repetido três vezes independentemente (Figura A3).

Figura A3- Ensaio NR – Publicação 1

(A) Preparo dos eluídos dos cimentos – meio de cultura DMEM incompleto em contato com os materiais e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas; (B) Diluições dos cimentos em contato com as células por 24 horas e após incubação com solução de vermelho neutro (NR); (C) Leitura da placa (DO=570 nm)

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A 1.4: Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

O princípio deste método é a hidrólise do monofosfato de timolftaleína pela fosfatase alcalina produzida pelas células, que libera a cor azul da timolftaleína em meio alcalino. A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi determinada usando o kit comercial Labtest (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) (Figura A4). Após 24 horas do plaqueamento (7×10^4 células mL^{-1}) em placas de 96 poços, células SAOS-2 foram expostas aos eluídos dos materiais, na diluição 1:8 (publicação 1) e 1:24 (publicação 2). Os eluídos dos cimentos foram renovados a cada dois dias durante o período de exposição das amostras. Após 1, 3 e 7 dias, os eluídos foram removidos e as células lavadas com 200 μL de PBS 1x, em seguida 200 μL de uma solução de lauril sulfato de sódio (1 % em água destilada, Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada poço. As amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Cada uma das amostras foi transferida para um microtubo (Eppendorf, Hamburg, Germany) contendo o substrato e o tampão. Em seguida as amostras (100 μL) foram incubadas em banho maria a 37°C por 10 minutos com 500 μL de reagente de cor (Figura A4.B). A densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro (UVM 340) a 590 nm (figura A4.C)

O experimento foi repetido três vezes ($n = 3$) independentemente. Os dados foram expressos como a atividade de ALP normalizada pelo número de células viáveis detectadas no ensaio de MTT no respectivo período de cultura (Figura A4.D).

Figura A4- Avaliação enzimática (atividade de ALP) nos períodos de 1, 3 e 7 dias



(A) Preparo dos eluídos dos cimentos em estufa a 37°C por 24 h; (B) Incubação das amostras lisadas com de 200 μL de lauril sulfato de sódio em banho maria a 37°C por 10 min; (C) Imagem representativa da placa de ALP período de 7 dias correspondente à Publicação 1. Leitura da placa (DO=590 nm); (D) Imagem representativa da citotoxicidade avaliada por MTT no período de 7 dias. Leitura da placa (DO=570 nm)

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

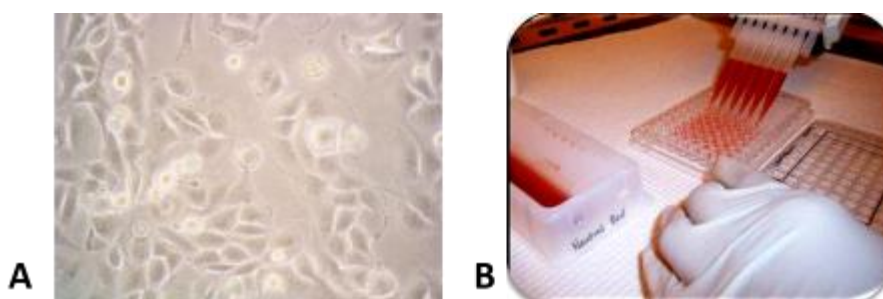
A 1.5: Coloração Vermelho de Alizarina (ARS)

O vermelho de alizarina (Alizarin Red S – ARS) é um derivado de antraquinona, e pode ser usada para identificar o depósito de cálcio na cultura de células. Através de um processo de quelação, o cálcio forma um complexo de alizarina S vermelho. Com o objetivo de avaliar a quantidade de cálcio depositado pelos diferentes materiais, células osteoblásticas SAOS-2 (Figura A5.A) foram contadas e plaqueadas (1×10^4 células mL^{-1}) em placas de cultura de 24 poços em DMEM suplementado com 10 % de SFB. Durante 21 dias o meio de cultura osteogênico DMEM (DMEM 10 % SFB, 100 IU / mL penicillina, 100 mg/mL estreptomicina, 0,023 g/mL β -glycerolfosfatase, 0,055 mg/mL ácido ascórbico - Sigma Chemicals St Louis) com e sem os eluídos dos cimentos foi renovado a cada 2 dias.

Após este período, o meio foi então aspirado, e as placas lavadas com PBS e as células fixadas com etanol 70% a 4 °C por 1 hora. Na sequência foi realizada a lavagem com água destilada (duas vezes) e a adição de 0,3 mL 40 mM de ARS (2% - pH 4,1) (Figura A5.B). Em seguida as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos, e realizada a aspiração do corante, e lavagem dos poços por 4 vezes com 1 mL de água destilada/poço. As placas permaneceram anguladas durante 2 minutos, para facilitar a remoção do excesso de água e foram fotografadas (Canon EOS-1D, Canon Inc, Tokyo, Japan).

A mineralização foi quantificada através da dissolução dos nódulos com 500 μL da solução de 10% de cloreto de cetilpiridínio (Sigma-Aldrich) por poço e, incubada por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Três alíquotas de 100 μL da ressuspensão de cada poço foram transferidas para uma placa de 96 poços, e realizada a leitura em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda (Asys-UVM 340).

Figura A5- Ensaio de coloração ARS



(A) Células osteoblásticas Saos-2; (B) Adição de 0,3 mL 40 mM de ARS em cada poço contendo células Saos-2 que estiveram em contato com os eluídos dos cimentos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A 2: Avaliação do potencial bioativo em MEV

Todos os cimentos foram manipulados, compactados em moldes de silicone (1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro) e deixados em estufa a 100% de umidade e 37°C por 7 dias até a presa completa dos materiais (Figura A6.A). Após esse período, os corpos de prova (n = 2) permaneceram imersos em PBS 1x (para 500 mL de água destilada; NaCl anidro – 90 g, Na_2HPO_4 – 13,65 g, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_2\text{H}_2\text{O}$ – 2,42 g) e incubados a 37°C durante 30 dias (Figura A6.B).

Os espécimes foram colocados em recipientes com sílica em estufa a 60°C, tiveram suas superfícies metalizadas com carbono para sua análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) no modo de análise por elétrons secundários, com objetivo de identificar a deposição de minerais na superfície dos materiais (Figura A6.C) .

Foram analisadas 6 áreas de cada espécime de forma padronizada, totalizando 12 áreas. O precipitado de minerais foi classificado empregando sistema de escores: Escore 0- nenhum precipitado de minerais na superfície do material, Escore 1- alguns pontos de cobertura da superfície do material por precipitado de minerais, Escore 2- alguns pontos da superfície de cada imagem não coberta por precipitado de minerais, Escore 3- total cobertura da superfície por precipitado mineral, Escore 4- formação de cristais de hidroxiapatita.

Figura A6- Potencial bioativo em MEV



(A) Moldes de silicone de 1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro e amostras dos cimentos; (B) Corpo de prova imerso em 500 mL de PBS 1x, incubados a 37°C durante 30 dias; (C) Espécimes colocados no suporte para análise em MEV.

Fonte: Arquivo pessoal do autor e da Dr^a Gisselle M. Chávez Andrade.

A 3: Avaliação das propriedades antimicrobianas

Micro-organismos e preparo dos inóculos

Foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e/ou *Candida albicans* (ATCC 10231). Para os testes foi preparada uma suspensão microbiana em meio de cultura apropriado para cada cepa e o ajuste da densidade óptica (DO) foi realizado em espectrofotômetro (600 Plus, Femto, SP) a uma concentração equivalente a 1×10^8 UFC mL⁻¹.

A 3.1: *Teste de contato direto dos eluídos dos cimentos sobre biofilme: Ensaio cristal violeta*

A ação das soluções sobre a biomassa dos biofilmes mono- e dual-espécies de *E. faecalis* e/ou *C. albicans* foi avaliada por meio do ensaio de cristal violeta. Os biofilmes foram formados em placas de cultura celular de 96 poços pelos períodos de 72 horas (*E. faecalis*) e 48 horas (*C. albicans* e biofilme dual-espécies) com meio de cultura *Tryptic soy broth* – TSb (Difco Detroit, MI, EUA) suplementado com D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich) para *E. faecalis*; e *Brain Heart Infusion* – BHI (Difco Detroit, MI, EUA) para *C. albicans* e dual-espécies. Os períodos estabelecidos para formação dos biofilmes foram determinados e padronizados por meio de testes pilotos. Foi utilizada uma placa de cultura para cada cepa microbiana e para o biofilme dual-espécies. Para o controle positivo foi utilizada a solução salina, em substituição aos eluídos do cimento. Meio de cultura estéril foi o controle negativo.

Os cimentos foram manipulados segundo indicações dos fabricantes, onde $7,5 \pm 0,5$ mm de diâmetro x $1,5 \pm 0,5$ mm de altura dos materiais ficaram imersos em 1 mL de solução salina por 48 horas em estufa a 37°C, quando os eluídos finais foram recolhidos. Após período de formação dos biofilmes, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de PBS 1x (pH 7,2). Em seguida, foram aplicados 200 µL dos eluídos dos cimentos em cada poço e deixados em estufa por 24 horas a 37°C. Após esse período os eluídos foram removidos e cada poço foi lavado com PBS 1x. As placas foram secas a temperatura ambiente. A seguir, os micro-organismos aderentes foram corados com 200 µL da solução de cristal violeta a 0,1% por 20 minutos em temperatura ambiente (Figura A7.A). A solução de cristal violeta foi preparada a partir do pó P.A. de cristal violeta (LabSynth, Diadema, SP, Brasil) que foi diluído em água destilada para obter a concentração de 0,1%. O excesso do corante foi enxaguado por lavagem com água destilada. As placas foram secas a temperatura ambiente e o corante ligado às células aderentes foi solubilizado com 200 µL de ácido acético a 33%. Para quantificar a biomassa de biofilme remanescente após o tratamento, foi medida a absorvância (DO = 590 nm) usando espectrofotômetro UVM 340 (Figura A7.B). Os dados foram expressos em porcentagem de redução da biomassa.

Figura A7- Ensaio de Cristal Violeta

(A) Micro-organismos aderentes corados com 200 μL da solução de cristal violeta a 0,1% por 20 min.;
 (B) Leitura em espectrofotômetro (DO=590 nm).

Fonte: Arquivo pessoal do autor e da Dr^a Gisselle M. Chávez Andrade.

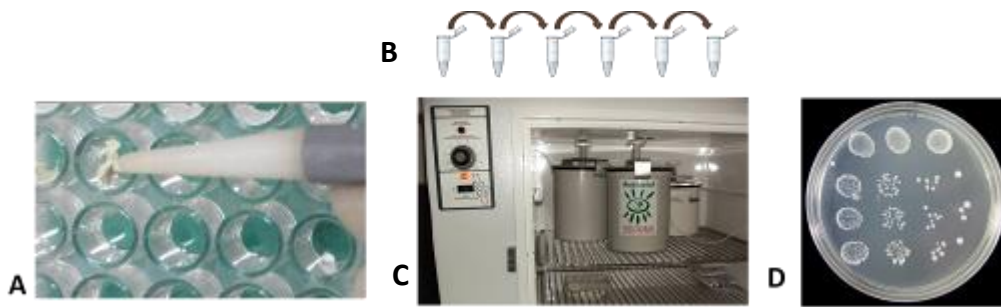
A 3.2: Teste de contato direto (TCD) sobre células planctônicas

Foram utilizadas microplacas de 96 poços (uma para cada cepa microbiana: *E faecalis* ou *C. albicans*) onde os materiais foram manipulados segundo instruções do fabricante e inseridos de forma padronizada na parede lateral do poço ($0,15 \pm 0,025$ g, n = 8). As placas foram matidas em estufa a 37°C por 24 horas para presa inicial dos materiais. Posteriormente, após 30 minutos em UV na câmara de fluxo laminar para esterilização, 10 μL de cada inóculo microbiano foi depositado sobre o cimento. Houve um grupo controle positivo, no qual foi adicionado somente o inóculo. Na sequência, as placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 1 h e 30 min.

Após período de contato e incubação, foram adicionados 250 μL de TSb em cada poço da placa contaminada com *E. faecalis* e Sabouraud Dextrose broth – SDb (Difco Detroit, MI, EUA) nos poços da placa contaminados com *C. albicans*. Posteriormente, foi realizada a diluição decimal seriada e a semeadura em placas contendo *Tryptic soy agar* (TSA) e *Sabouraud Dextrose agar* (SDA), respectivamente.

A diluição decimal seriada foi realizada da seguinte forma: primeiro, o conteúdo de cada poço foi transferido para microtubos estéreis e a partir desse tubo “mãe”, 100 μL da suspensão foi transferida para outro microtubo com 900 μL de solução salina estéril. Assim em diante foram realizadas quatro diluições. Foram plaqueadas, em triplicata, 20 μL de cada diluição, incluindo o conteúdo do tubo “mãe”.

Após 48 horas de incubação das placas em estufa a 37°C, foi realizada contagem de UFC mL^{-1} e transformação logarítmica (\log_{10}).

Figura A8- TCD sobre células planctônicas

(A) Cimentos depositados na parede lateral da placa de 96 poços; (B) Diluição decimal seriada e (C) incubação das placas de petri por 48 horas em estufa a 37°C; (D) Placa de petri com crescimento bacteriano (*E. faecalis*) em TSA.

Fonte: Arquivo pessoal do autor e da Dr^a Gisselle M. Chávez Andrade.

APÊNDICE B – METODOLOGIA DETALHADA CORRESPONDENTE À PUBLICAÇÃO 2

B 1: Avaliação das Propriedades Físico-Químicas

B 1.1: *Tempo de presa*

O tempo de presa foi avaliado de acordo com norma ISO-6876 (2012). Foram utilizados moldes de gesso do tipo especial IV – micro-granulado (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura. Os moldes de gesso foram mantidos em água destilada por 24 horas à 37°C antes de serem utilizados para o preparo dos corpos de prova dos respectivos materiais (n = 6). Logo após manipulação, os cimentos foram inseridos nos respectivos moldes, e mantidos em estufa à 37°C e 95 % de umidade, durante o período de avaliação. Foi utilizada agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm apoiada sobre a superfície de cada um dos cimentos (Figura B1). O tempo de presa foi determinado como o período, em minutos, entre a manipulação e o momento em que a agulha já não produzisse marcas na superfície dos cimentos.

Figura B1- Determinação do tempo de presa



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

B 1.2: Radiopacidade

Os materiais foram manipulados segundo instruções dos fabricantes e inseridos em moldes de silicone com diâmetro interno de 10 mm e altura de 1 mm (n = 5), e mantidos em estufa (37 °C, 95 % de umidade) por 3 vezes o tempo de presa de cada material. Após os materiais tomarem presa, um disco de cada um deles e uma escala de alumínio foram colocados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY). A tomada radiográfica foi realizada com o aparelho de raios-X Focus (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland), a 60 kV, 7 mA, 18 pulsos/segundo e 33 cm de distância focal. Os filmes foram processados, e após a secagem as imagens foram digitalizadas e avaliadas por meio do programa Image J (Figura B2).

Áreas de cada um dos degraus da escala milimetrada de alumínio foram analisadas para determinação da radiopacidade dos cimentos equivalente em milímetros de alumínio (mmAl), utilizando a seguinte fórmula:

$$[(DRC - DR_{escala}) \times 2 / DR_{ant/pos}] + \text{mmAl imediatamente anterior à DRC}$$

Onde:

DCR = densidade radiográfica do cimento;

DR_{escala} = densidade radiográfica da escala de Al;

DR_{ant/pos} = DR do incremento da escala de Al imediatamente posterior a DRC - DR do incremento de alumínio imediatamente anterior a DRC.

Figura B2- Teste de radiopacidade



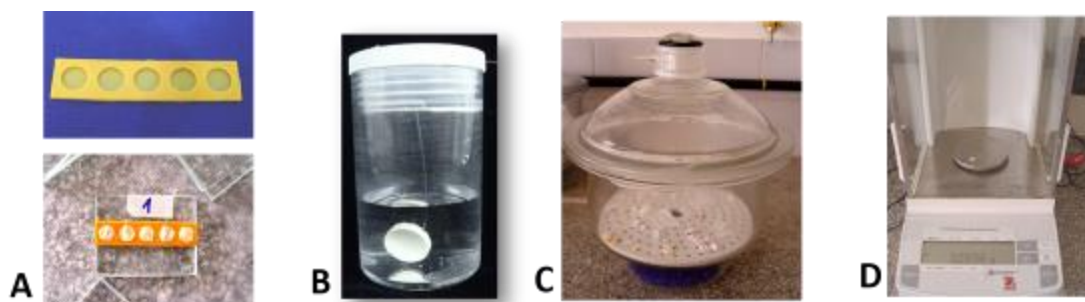
(A) Corpos-de-prova posicionados ao lado de uma escala de alumínio sobre filme oclusal; (B) Feixe de raio-x posicionado a 33 cm de distância do conjunto filme-espécimes; (C) Radiografia digitalizada e analisada no programa Image J.

Fonte: Arquivo pessoal do autor e da Dr^a Gisselle M. Chávez Andrade.

B 1.3: Solubilidade

A solubilidade foi avaliada de acordo com a norma ANSI/ADA nº 57 (2000) modificada por Carvalho-Junior et al. (2007). Segundo a norma, os corpos-de-prova devem ser preparados usando moldes de 20 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura. A partir de moldes de silicone, no presente estudo foram confeccionados então corpos-de-prova com 7,75 mm de diâmetro interno e 1,5 mm de altura, para cada um dos materiais avaliados ($n = 6$). Os moldes de silicone foram acomodados sobre uma placa de vidro recoberta por uma película de papel celofane. Um fio de nylon impermeável (5 cm de comprimento) foi colocado no interior de cada um dos espécimes (Figura B3.A), e outra placa de vidro, também coberta com uma película de celofane, foi colocada sobre o molde e pressionada manualmente, de tal maneira que as placas tocassem a superfície do molde uniformemente. Para NMTAP e MTAF que necessitam de umidade para tomarem presa, foram acomodadas gazes umedecidas (em água destilada) entre os moldes as placas de vidro.

Figura B3- Teste de solubilidade



(A) Moldes de silicone de 7,75 x 1,5 mm e corpos-de-prova com fio de nylon inseridos; (B) Espécime suspenso em frasco contendo 7,5 mL de água destilada e deionizada por 7 dias; (C) Estabilização da massa em dessecador com sílica; (D) Pesagem dos espécimes em balança de precisão.

Fonte: Arquivo pessoal do autor e da Dr^a Gisselle M. Chávez Andrade.

O conjunto foi armazenado em estufa com temperatura de 37°C e 95% de umidade pelo período de 3 vezes o tempo de presa. Após a presa dos materiais, os corpos-de-prova foram colocados em dessecador com sílica até a estabilização da massa (10 dias). As pesagens foram realizadas em balança de precisão de 0,0001 g (Adventurer - Ohaus, Modelo AR2140 - Indústria de balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) a cada 24 horas. Após a determinação da massa inicial, os espécimes foram suspensos, por meio da fixação dos fios de nylon, no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 7,5 mL de água destilada e deionizada (Figura B3.B). Os recipientes permaneceram em estufa a 37 °C pelo

período de 7 dias. Decorrido esse período, os corpos de prova foram removidos da água destilada, lavados, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até a estabilidade e obtenção da massa final (Figura B3.C). As pesagens foram realizadas três vezes para cada espécime em balança de precisão, a cada 24 horas (Figura B3.D). A solubilidade (S) dos cimentos avaliados correspondeu à perda de massa de cada espécime [massa inicial (MI) menos massa final (MF)], expressa em porcentagem, que foi calculada através da seguinte fórmula: $S = (MI - MF) / MI \times 100$.

B 1.4: *pH*

A análise de pH foi realizada utilizando tubos de polietileno, com 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro, preenchidos com cada um dos materiais avaliados (n = 10). Em seguida cada tubo foi inserido em um frasco contendo 10 mL de água destilada e deionizada, sendo que o conjunto frasco + tubo contendo cimento foi mantido em estufa durante os períodos experimentais.

Figura B4- Teste de pH



Tubos de polietileno medindo 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro preenchidos com os cimentos e imersos em frascos contendo 10 mL de água destilada e deionizada e mantidos em estufa nos diferentes períodos experimentais: 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. O pH foi mensurado em cada período experimental em triplicata.

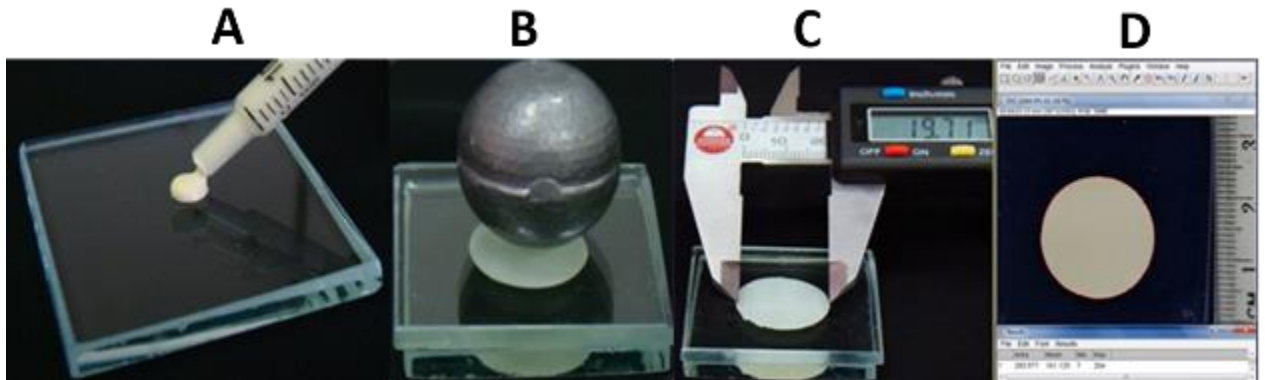
Autores: Prof^ª. Dr^ª Raqueli Viapiana e Prof^ª. Dr^ª Roberta Bosso-Martelo.

Os períodos experimentais foram de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A cada período, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco com 10 mL de água destilada e deionizada. Como controle utilizou-se água destilada e deionizada, que foi acondicionada em frascos pelos respectivos períodos experimentais (n = 10). O pH das soluções foi medido imediatamente após o término de cada período experimental com um pHmetro Digimed (São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado, tendo sido realizadas três aferições para cada espécime e obtido o pH médio (Figura B4).

B 1.5: *Escoamento*

O teste de escoamento foi realizado de acordo com a norma ISO-6876 (2012). Após a manipulação dos materiais, com auxílio de uma seringa de insulina graduada, $0,05 \pm 0,005$ mL de cada um dos materiais ($n = 10$) foi colocado no centro de uma placa de vidro (Figura B5.A). Na sequência, outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o cimento (após 180 segundos após à manipulação dos cimentos), e sobre esta placa foi posicionado um dispositivo metálico de 100 g, totalizando 120 g (Figura B5.B). O dispositivo metálico permaneceu por 10 minutos sobre as placas de vidro.

Figura B5- Teste de Escoamento



(A) 0,05 mL de cada cimento colocado em placa de vidro; (B) Outra placa de vidro e um dispositivo metálico foram posicionados sobre o material totalizando 120 g; (C) Mensuração do diâmetro médio de cada espécime utilizando um paquímetro digital; (D) Fotografias digitalizadas e mensuradas quanto a área de escoamento em mm^2 por meio do programa Image Tool 3.00.

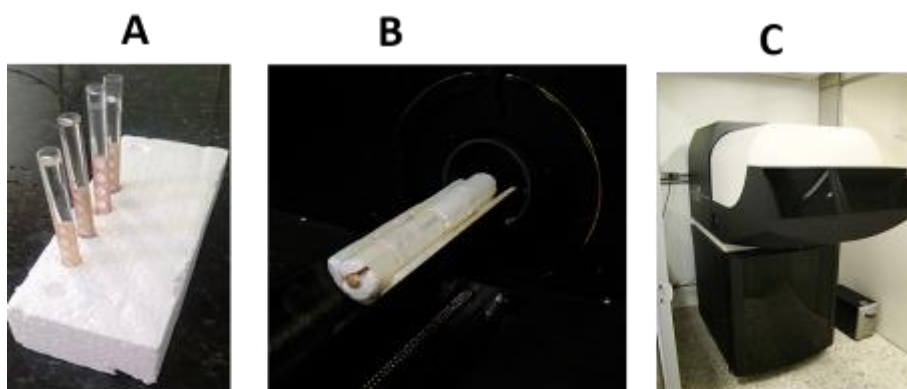
Autores: Prof^ª. Dr^ª Raquel Viapiana e Prof^ª. Dr^ª. Roberta Bosso Martelo.

Duas técnicas foram utilizadas para avaliar o escoamento. Na primeira, o diâmetro médio (diâmetros máximo e mínimo) de cada espécime foi medido com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Tokyo, Japão) com precisão de 0,1 mm (Figura B5.C). Na segunda, um método adicional (modificação da norma ISO) foi usado no qual os corpos-de-prova foram fotografados, e as imagens obtidas foram digitalizadas para a mensuração da área de escoamento (em mm^2) por meio do programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00 (Figura B5.D).

B 2: Alteração Volumétrica: Microtomografia Computadorizada (micro-CT)

Foram confeccionados corpos-de-prova dos cimentos medindo 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura ($n = 6$) por um único operador treinado e calibrado, e mantidos em estufa a 37°C e umidade relativa por 3 vezes o tempo de presa. Para a presa dos cimentos NMTAP e MTAF, uma gaze úmida foi colocada sobre os materiais. Posteriormente, os espécimes foram escaneados por micro-CT (Bruker-MicroCT 1176, Kontich, Belgium). Em seguida, os espécimes foram imersos em água destilada durante 7 e 30 dias (Figura B6.A) e foram escaneados novamente após os períodos experimentais.

Figura B6- Teste de alteração volumétrica em micro-CT



(A) Espécimes imersos em água destilada durante 7 e 30 dias e mantidos em estufa à 37°C; (B) Espécimes introduzidos no interior de suporte de isopor; (C) Micro-CT (Bruker-MicroCT 1176, Kontich, Belgium).

Fonte: Arquivo do próprio autor e de Fernanda F. Esteves Torres.

O procedimento de digitalização foi realizado com os seguintes parâmetros radiográficos: 50 kV de voltagem e 500 μ A, filtro de alumínio de 0,5 mm, voxel isotrópico de 18 μ m, pixel da câmera de 12.45, 721 registros em tiff. e ciclo de evolução de 360°. A reconstrução das imagens foi realizada com o software NRecon (V1.6.4.7; Bruker-MicroCT) de forma padronizada e foram utilizados os mesmos parâmetros para o mesmo material nos diferentes períodos (Figuras B6.B e B6.C). As imagens reconstruídas foram sobrepostas nos diferentes períodos usando o programa Data Viewer (V1.5.2.4; Bruker- MicroCT). As imagens foram analisadas com o software CTAn (V1.11.8; Bruker-MicroCT). O volume total dos cimentos nas cavidades foi calculado em cada intervalo de tempo.

B 2.1: Parâmetros de escaneamento (SkyScan1176):

[System]

Scanner=SkyScan1176

Instrument S/N=11C08026

Hardware version=A

Software=Version 1. 1 (build 7)

Home directory=C:\SkyScan1176

Source Type=PANalytical's Microfocus Tube

Camera=Princeton Instruments

Camera Pixel Size (um)= 12.45

CameraXYRatio=0.9870

Bed shift in X per 1000 lines=0.000000

Bed shift in Y per 1000 lines=0.000000

[Acquisition]

Data directory=H:\Micro CT\16-01-2017\Alteração volumétrica\7 dias\Neo MTA\Parte de cima

Filename Prefix=Parte de cima_

Filename Index Length=4

Number of Files= 721

Source Voltage (kV)= 50

Source Current (uA)= 500

Number of Rows= 1336

Number of Columns= 2000

Image crop origin X= 0

Image crop origin Y=0

Camera binning=2x2

Image Rotation=0.0120

Gantry direction=CC

Number of connected scans=1

Image Pixel Size (um)= 17.48

Object to Source (mm)=120.299

Camera to Source (mm)=172.040

System Matrix Calibration=NO

Vertical Object Position (mm)=112.794

Optical Axis (line)= 652

Filter=Al 0.5mm

Image Format=TIFF

Data Offset (bytes)= 264

Horizontal overlap (pixel)=64

Camera horizontal position=Center

Depth (bits)=16

Visual Camera=OFF

Synchronised Scan=OFF

Delay for external event (ms)=(5)

List mode=OFF (2)

Screen LUT=0

Exposure (ms)= 380

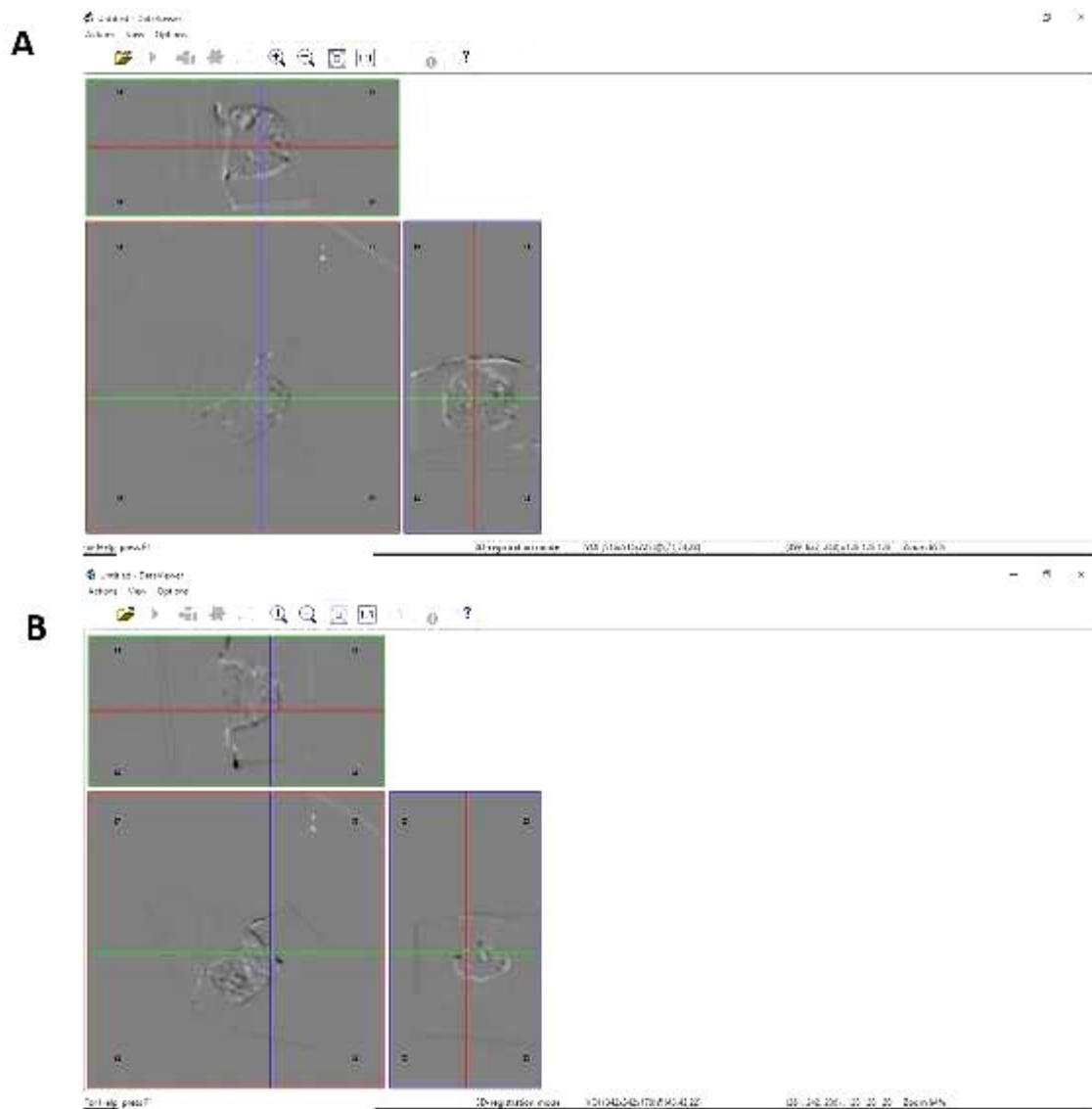
Rotation Step (deg)=0.500
Frame Averaging=ON (3)
Use 360 Rotation=YES
Geometrical Correction=ON
Camera Offset=OFF
Scanning Start Angle=-0.044
Median Filtering=ON
Flat Field Correction=ON
Rotation Direction=CC
Scanning Trajectory=ROUND
User Name=
User Rights=full access
Type Of Motion=STEP AN
Source Temperature=32.74 °C
Study Date and Time=Jan 23, 2017 11:54:58
Scan duration=00:28:27

B 2.2: Parâmetros de reconstrução no software NRecon:

Reconstruction Program=NRecon
Program Version=Version: 1.6.9.8
Program Home Directory=E:\Micro CT\Softwares MicroCT\Softwares Agosto 2014\NRecon antigo
Reconstruction engine=NReconServer
Engine version=Version: 1.6.9
Reconstruction from batch=Yes
Postalignment=1.50
Reconstruction servers= DESKTOP-622P9ER
Option for additional F4F float format=OFF
Reconstruction mode=Standard
Dataset Origin=SkyScan1176
Dataset Prefix=Parte de cima_
Dataset Directory=E:\Micro CT\Alteração Volumétrica\7 dias\Neo MTA\Parte de cima
Output Directory=E:\Micro CT\Alteração Volumétrica\7 dias\Neo MTA\Parte de cima\rec 2
Time and Date=Mar 14, 2017 10:23:55
First Section=212
Last Section=699
Reconstruction duration per slice (seconds)=4.782787
Total reconstruction time (488 slices) in seconds=2334.000000
Section to Section Step=1
Sections Count=488
Result File Type=BMP
Result File Header Length (bytes)=1134
Result Image Height (pixels)=1284
Pixel Size (um)=17.49322

Reconstruction Angular Range (deg)=360.00
Use 180+=OFF
Angular Step (deg)=0.5000
Smoothing=10
Smoothing kernel=0 (Asymmetrical boxcar)
Ring Artifact Correction=5
Draw Scales=OFF
Object Bigger than FOV=OFF
Reconstruction from ROI=ON
ROI Top (pixels)=1741
ROI Bottom (pixels)=454
ROI Left (pixels)=274
ROI Right (pixels)=1561
ROI reference length=2000
Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100
Filter type=0
Filter type meaning(1)=0: Hamming (Ramp in case of optical scanner); 1: Hann; 2: Ramp; 3:
Almost Ramp;
Filter type meaning(2)=11: Cosine; 12: Shepp-Logan; [100,200]: Generalized Hamming,
 $\alpha=(iFilter-100)/100$
Undersampling factor=1
Threshold for defect pixel mask (%)=0
Beam Hardening Correction (%)=30
CS Static Rotation (deg)=0.00
Minimum for CS to Image Conversion=0.000000
Maximum for CS to Image Conversion=0.150000
HU Calibration=OFF
BMP LUT=0
Cone-beam Angle Horiz.(deg)=16.547293
Cone-beam Angle Vert.(deg)=11.096256

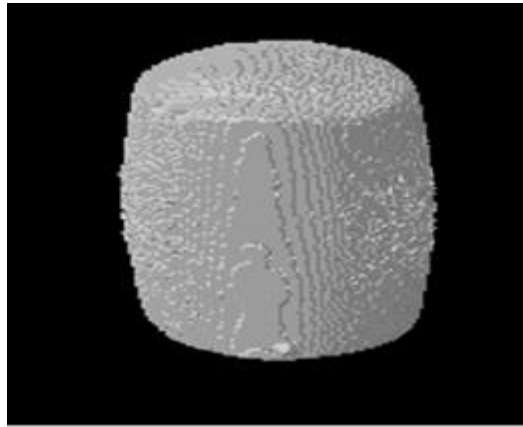
Figura B7- Imagens reconstruídas do cimento NMTAP sobrepostas no software DataViewer



(A) Imagens sobrepostas nos períodos inicial e de 7 dias; **(B)** Imagens sobrepostas nos períodos inicial e 30 dias.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura B8- Ilustração em 3D realizado no software CTVol representando a cavidade preenchida pelo cimento AH Plus



Autor: Fernanda F. Esteves Torres.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 15 de Março de 2020.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 15 de março de 2018.

Luciana Guilherme Navarro