

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/03/2024.



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



Anahi de Paula Melo

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

Araraquara

2022



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



Anahi de Paula Melo

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

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

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

Araraquara

2022

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Anahi de Paula Melo

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

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

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

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

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

Araraquara, 28 de março de 2022.

//DADOS CURRICULARES

Anahi de Paula Melo

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

A Deus,

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

A minha mãe,

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

Ao Alao,

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

Aos meu irmãos,

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

Ao Paulo,

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 CONCLUSÃO

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

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

REFERÊNCIAS*

1. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J*. 2018; 51(3): 284-317.
2. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018; 51(2): 177-205.
3. Camilleri J, Ford TP. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006; 39(10): 747–54.
4. Saghiri MA, Orangi J, Asatourian A, Gutmann JL, Garcia-Godoy F, Lotfi M et al. Calcium silicate-based cements and functional impacts of various constituents. *Dent Mater J*. 2017; 36(1): 8-18.
5. Cintra LT, Benetti F, Queiroz IOA, Lopes JMA, Oliveira SHP, Araújo GS et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod*. 2017; 43(5): 774-8.
6. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2017; 51(3): 177–205.
7. Wu BC, Wei CK, Hsueh NS, Ding SJ. Comparative cell attachment, cytotoxicity and antibacterial activity of radiopaque dicalcium silicate cement and white-coloured mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2015; 48(3): 268–76.
8. Ha WN, Nicholson TM, Kahler B, Walsh LJ. Mineral trioxide aggregate: a review of properties and testing methodologies. *Materials*. 2017; 10(11): 1261.
9. Žižka R, Šedý J, Gregor L, Voborná I. Discoloration after regenerative endodontic procedures: a critical review. *Iran Endod J*. 2018; 13(3): 278–84.
10. Donnermeyer D, Bürklein S, Dammaschke T, Schäfer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology*. 2019; 107(4): 421-36.
11. Okamura T, Chen L, Tsumano N, Ikeda C, Komasa S, Tominaga K et al. Biocompatibility of a high-plasticity, calcium silicate-based, ready-to-use material. *Materials (Basel)*. 2020; 13(21): 4770.
12. Koutroulis A, Kuehne SA, Cooper PR, Camilleri J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 19019.

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

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

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

39. Yavari HR, Shahi S, Rahimi S, Shakouie S, Roshangar L, Mesgari Abassi M et al. Connective tissue reaction to white and gray MTA Mixed with distilled water or chlorhexidine in rats. *Iran Endod J.* 2009; 4(1): 25-30.
40. Manochehrifar H, Parirokh M, Kakooei S, Oloomi MM, Asgary S, Eghbal MJ et al. The effect of Mineral Trioxide Aggregate mixed with chlorhexidine as direct pulp capping agent in dogs teeth: a histologic study. *Iran Endod J.* 2016; 11(4): 320-4.
41. Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *J Microbiol Biotechnol.* 2017; 27(3): 429-38.
42. Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against gram-positive and gram-negative bacteria. *J Food Drug Anal.* 2017; 25(2): 403-8.
43. Oliveira JR, Viegas DJ, Martins APR, Carvalho CAT, Soares CP, Camargo SEA et al. *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Arch Oral Biol.* 2017; 82: 271–9.
44. Zuzarte M, Alves-Silva JM, Alves M, Cavaleiro C, Salgueiro L, Cruz MT. New insights on the anti-inflammatory potential and safety profile of *Thymus carnosus* and *Thymus camphoratus* essential oils and their main compounds. *J. Ethnopharmacol.* 2018; 225:10–7.
45. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, Almeida M, Navarro LG, Steier L et al. Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive glass and calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017; 43(12): 2097-2101.
46. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate-based sealer, Bio-C Sealer. *J Endod* 2019; 45(10): 1248-52.
47. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, Belladonna FG, De-Deus GA, Lima IC et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J.* 2017; 50(4): 407–14.
48. Torres FFE, Jacobs R, EzEldeen M, Guerreiro-Tanomaru JM., Dos Santos BC, Lucas-Oliveira É et al. Micro-computed tomography high resolution evaluation of dimensional and morphological changes of 3 root-end filling materials in simulated physiological conditions. *J Mater Sci Mater Med.* 2020; 31(2): 14.
49. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009; 35(7): 1051-5.
50. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 755-62.

51. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J.* 2019; 52(7): 979-86.
52. Farrugia C, Lung CYK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The relationship of surface characteristics and antimicrobial performance of pulp capping materials. *J Endod.* 2018; 44(7): 1115-20.
53. Somma F, Cretella G, Carotenuto M, Pecci R, Bedini R, De Biasi M et al. Quality of thermoplasticized and single point root fillings assessed by micro-computed tomography. *Int Endod J.* 2011; 44(4): 362-9.
54. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Shrestha A, Bramante CM. Antibacterial properties associated with chitosan nanoparticle treatment on root dentin and 2 types of endodontic sealers. *J Endod.* 2015; 41(8): 1353-8.
55. Perez AP, Perez N, Lozano CMS *et al.* The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicle. *Phytomedicine* 2019; 57: 339–51.
56. Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and thyme essential oil-new insights into selected Therapeutic Applications. *Molecules.* 2020; 25(18): 4125.
57. Alves M, Goncalves MJ, Zuzarte M, Alves-Silva JM, Cavaleiro C, Cruz MT et al. Unveiling the antifungal potential of two iberian thyme essential oils: effect on *C. albicans* germ tube and preformed biofilms. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 446.
58. Aires A, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. Antimicrobial effects of essential oils on oral microbiota biofilms: the toothbrush in vitro model. *Antibiotics (Basel).* 2020; 10(1): 21.
59. Bedran NR, Nadelman P, Magno MB, de Almeida Neves A, Ferreira DM, Braga Pintor AV et al. Does calcium hydroxide reduce endotoxins in infected root canals? systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 2020; 46(11): 1545-58.
60. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015; 13(1): 43-60.
61. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, Espir CG, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Solubility, porosity, dimensional and volumetric Change of Endodontic Sealers. *Braz Dent J.* 2019; 30(4): 368-73.
62. Shen YF, Huang TH, Ng HY, Fang HY, Hsu TT. Mineral trioxide aggregate mixed with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic antimicrobial strategy in hard tissue regeneration. *Materials (Basel).* 2018; 11(9): 1734.

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