



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



Giulia Bueno Rodrigues

**Propriedades físico-químicas e antibiofilme de materiais endodônticos
biocerâmicos obturadores e reparadores e associações com cetramida**

Araraquara

2022



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



Giulia Bueno Rodrigues

**Propriedades físico-químicas e antibiofilme de materiais endodônticos
biocerâmicos obturadores e reparadores e associações com cetramida**

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2022

R696p

Rodrigues, Giulia Bueno

Propriedades físico-químicas e antibiofilme de materiais endodônticos biocerâmicos obturadores e reparadores e associações com cetramida / Giulia Bueno Rodrigues. -- Araraquara, 2022

55 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Materiais dentários. 2. Propriedades físicas e químicas. 3. Biofilmes. 4. Microtomografia por raio-X. 5. Endodontia. 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.

Giulia Bueno Rodrigues

**Propriedades físico-químicas e antibiofilme de materiais endodônticos
biocerâmicos obturadores e reparadores e associações com cetramida**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Endodontia

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

2º Examinador: Guilherme Ferreira Silva

3º Examinador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

Araraquara, 29 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Giulia Bueno Rodrigues

NASCIMENTO: 11/12/1996 – São Carlos – SP

FILIAÇÃO: Roberta Aparecida Correa Bueno Rodrigues

Giuliano Bonfá Rodrigues

2014-2019: Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, FOAR

2019-2020: Especialização em Radiologia Odontológica e Imaginologia (FACOP - Bauru).

2020-Atual: Mestrado em Odontologia – Área de Endodontia (Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, FOAR)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Roberta Aparecida Correa Bueno Rodrigues e Giuliano Bonfá Rodrigues**, por serem minha base para tudo, confiarem em minha capacidade, me apoiando e incentivando sempre. Pelo amor, companheirismo e cumplicidade. Sou eternamente grata a vocês.

Aos meus irmãos, meu namorado e toda minha família agradeço todo o apoio durante esse período, vocês são muito importantes em todas as etapas de minha vida.

À minha orientadora **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, agradeço por todo conhecimento compartilhado desde a graduação na iniciação científica até o mestrado, e pela oportunidade de se realizar a pós-graduação com ela. Muito obrigada pelo companheirismo e por todos os ensinamentos passados nesse período.

Ao **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, pelo conhecimento científico transmitido, pelas oportunidades desde minha graduação e pela contribuição na realização desta dissertação e artigos.

À **Gisselle Moraima Chavez Andrade**, por toda ajuda, orientação, e conhecimento a mim transmitidos durante toda minha trajetória na área da pesquisa. Mas principalmente à agradeço por essa amizade que construímos desde minha graduação e pelos incentivos diários, sem você nada disso seria possível. Muito obrigada!

À minha amiga **Luana**, agradeço por nossa convivência diária! Mesmo de longe sempre estávamos prontamente ali ajudando uma à outra e isso com certeza foi muito importante na minha trajetória. Obrigada por tudo!

Aos meus colegas de pós-graduação **Anahi, Larissa, Danilo, Ana Flávia, Sammêa e Victória**, agradeço a companhia durante esse período, nas disciplinas e congressos, sempre presentes quando foi preciso. Não estaria aqui hoje se não fosse todos vocês.

Aos meus colegas do doutorado, **Airton, Karina, Jáder, Fernanda, Hernán e Victor**, obrigada por toda ajuda durante esse período. Vocês foram essenciais no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À **CNPq** pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Rodrigues GB. Propriedades físico-químicas e antibiofilme de materiais endodônticos biocerâmicos obturadores e reparadores e associações com cetramida [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Objetivo: Materiais biocerâmicos devem apresentar propriedades físico-químicas e antibiofilme adequadas. Foram avaliados **(Publicação 1):** cimentos biocerâmicos reparadores: NeoPutty (Nusmile, EUA) e MTA Repair HP (Angelus, Brasil) **(Publicação 2):** e os cimentos endodônticos biocerâmicos Neo-MTA 2 (Nusmile, EUA) e BioRoot RCS (Septodont, França) associados ou não a cetramida (CTR) 1%. **Metodologia:** Tempo de presa (TP) foi avaliado segundo norma ISO-6876 empregando agulha Gilmore. Tubos de polietileno preenchidos com os cimentos foram utilizados para avaliação do pH nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias da imersão em água deionizada. Tubos de dentina bovina foram imersos em água destilada por 24 h a 37°C, preenchidos com os cimentos, e depois foi realizado escaneamento em Microtomografia computadorizada (Micro-CT. SkyScan 1176. Bruker, Bélgica) a 9 µm. Após imersão dos cimentos reparadores em PBS por 7 dias e dos cimentos obturadores por 7 e 28 dias, novo escaneamento foi realizado para avaliação da alteração volumétrica e porosidade. A reconstrução (NRecon - V1.6.4.7; SkyScan, Bélgica), sobreposição (Data Viewer - V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica) e análise (CTAn - V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica) das imagens obtidas com os escaneamentos foi realizada. Modelos 3D das cavidades foram obtidos por meio do programa CTVol (V2.3.1.0). A atividade antibiofilme, foi avaliada pelo teste de contato direto modificado com biofilme (TCDM). Os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos adequados para cada experimento com nível de significância de 5%. **Publicação 1 – Resultados:** NeoPutty apresentou maior TP que MTA Repair HP ($p < 0,05$). MTA Repair HP apresentou maiores valores de pH ($p < 0,05$). Em todos os períodos, os dois cimentos apresentaram pH alcalino. NeoPutty demonstrou maior solubilidade ($p < 0,05$) que MTA-HP. Porém, ambos materiais apresentaram menos que 3% de solubilidade. A alteração volumétrica e porosidade apresentaram valores menores que 1%, sem diferença significativa entre materiais ($p > 0,05$). Ambos os cimentos apresentaram ação antibiofilme em comparação ao grupo controle, sem diferença estatística entre si ($p > 0,05$). **Conclusões:** NeoPutty e MTA Repair HP apresentam pH alcalino, baixa solubilidade, baixa porosidade e estabilidade dimensional, além de ação antibiofilme, sugerindo a aplicação clínica. **Publicação 2 – Resultados:** BR e BR+CTR apresentaram menor TP que NMTA2 e NMTA2+CTR ($p < 0,05$). Em todos os períodos, os cimentos avaliados e associações apresentaram pH alcalino. Não houve diferença significativa na alteração volumétrica entre a extremidade e a parte interna dos espécimes ($p > 0,05$). Os grupos que apresentaram diferença estatística entre os períodos de 7 e 28 dias ($p < 0,05$) são NEO MTA2 na análise da extremidade e NEO+CTR na análise da parte interna do espécime, sendo que após 28 dias os materiais apresentam diminuição do volume. As associações com CTR demonstraram maior atividade antibiofilme ($p < 0,5$) quando comparados com os cimentos sem associação. **Conclusões:** Os materiais apresentaram adequados tempo de presa e pH, atividade antibiofilme e baixa alteração volumétrica. A associação com CTR não prejudicou as propriedades físico-químicas, além de aumentar a atividade antibiofilme de Neo-MTA 2 e BioRoot RCS.

Palavras-chave: Materiais dentários. Propriedades físicas e químicas. Biofilmes. Microtomografia por raio-X. Endodontia.

Rodrigues GB. Physicochemical and antibiofilm properties of endodontic and repair bioceramic materials and associations with cetrimide [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Objective: Bioceramic materials must have physicochemical and antibiofilm properties. We evaluated (**Publication 1**): bioceramic repair materials: NeoPutty (Nusmile, USA) and MTA Repair HP (Angelus, Brazil) and the bioceramic endodontic cements (Publication 2): Neo-MTA 2 (Nusmile, USA) and BioRoot RCS (Septodont, France) associated or not with 1% cetrimide (CTR). **Methodology:** Setting time (ST) was evaluated according to ISO-6876 using Gilmore needle. Polyethylene tubes filled with cement were used to evaluate the pH in the periods of 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days of immersion in deionized water. Bovine dentin tubes were immersed in distilled water for 24 h at 37°C, filled with cements, and then scanned in Computerized Microtomography (Micro-CT. SkyScan 1176. Bruker, Belgium) at 9 µm. After immersion of the repair cements in PBS for 7 days and the endodontics cements for 7 and 28 days, a new scan was performed to evaluate the volumetric change and porosity. The reconstruction (NRecon - V1.6.4.7; SkyScan, Belgium), overlay (Data Viewer - V1.5.2.4; SkyScan, Belgium) and analysis (CTAn - V1.15.4.0; SkyScan, Belgium) of the images obtained with scans were performed. 3D models of the cavities were obtained using the CTVol program (V2.3.1.0). Antibiofilm activity was evaluated by the modified direct contact test with biofilm. The data obtained were submitted to the appropriate statistical tests for each experiment with a significance level of 5%. **Publication 1 – Results:** NeoPutty presented higher ST than MTA Repair HP ($p < 0.05$). MTA Repair HP showed higher pH values ($p < 0.05$). In all periods, the two cements presented alkaline pH. NeoPutty demonstrated greater solubility ($p < 0.05$) than MTA-HP. However, both materials showed less than 3% solubility. The volumetric change and porosity presented values lower than 1%, with no significant difference between materials ($p > 0.05$). Both cements showed antibiofilm action compared to the control group, with no statistical difference between them ($p > 0.05$). **Conclusions:** NeoPutty and MTA Repair HP have alkaline pH, low solubility, low porosity and dimensional stability, in addition to antibiofilm action, suggesting clinical application. **Publication 2 – Results:** BR and BR+CTR showed lower ST than NMTA2 and NMTA2+CTR ($p < 0.05$). In all periods, the evaluated cements and associations presented alkaline pH. There was no significant difference in volumetric change between the tip and the inside of the specimens ($p > 0.05$). The groups that presented statistical difference between the periods of 7 and 28 days ($p < 0.05$) are NEO MTA2 in the analysis of the extremity and NEO+CTR in the analysis of the internal part of the specimen, and after 28 days the materials show a decrease in volume. Associations with CTR showed greater antibiofilm activity ($p < 0.5$) when compared with cements without association. **Conclusions:** The materials showed adequate setting time and pH, antibiofilm activity and low volumetric change. The association with CTR did not impair the physicochemical properties, in addition to increasing the antibiofilm activity of Neo-MTA 2 and BioRoot RCS.

Keywords: Dental materials. Physical and Chemical Properties. Biofilms. X-Ray Microtomography. Endodontics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 PUBLICAÇÕES	14
3.1 Publicação 1	14
3.2 Publicação 2	26
4 DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA	45
ANEXO A - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	55

1 INTRODUÇÃO

Materiais endodônticos devem seguir normas ISO (*International Organization for Standardization* - ISO 6876)¹ e ADA (*American Institute/American Dental Association* - nº 57)² que determinam parâmetros para propriedades como solubilidade, pH, tempo de presa e escoamento. Alteração volumétrica e porosidade podem ser avaliadas por microtomografia computadorizada (Micro-CT)^{3,4}, complementando testes da ISO. Outra propriedade importante dos materiais endodônticos é a ação antimicrobiana, que pode contribuir para o controle da infecção persistente no sistema de canais radiculares.

Estabilidade dimensional e baixa solubilidade são desejadas para um material endodôntico, uma vez que a contração ou dissolução do mesmo pode comprometer o sucesso do tratamento^{5,6}. Segundo especificações da ANSI/ADA nº 57² e ISO 6876¹, a alteração dimensional não deve exceder 1,0% em contração ou 0,1% em expansão. A metodologia convencional de solubilidade preconizada pelas normas ISO/ADA apresenta limitações para avaliação de cimentos biocerâmicos uma vez que está baseada na perda de massa após imersão em água destilada seguida por desidratação. A imersão em solução fisiológica tamponada (PBS) demonstra menor solubilidade dos biocerâmicos quando comparados à imersão em água destilada^{4,7}. Valores de solubilidade mais baixos após imersão em PBS podem ser encontrados devido à precipitação da hidroxiapatita de cálcio na superfície dos materiais a base de silicato de cálcio⁸.

Outra propriedade importante para materiais é a porosidade, que pode ser relacionada ao selamento. A presença de poros pode ocorrer pelo processo de mistura no momento da manipulação do cimento⁹. Para diminuir a influência da manipulação e facilitar o emprego clínico, novos materiais prontos para uso foram desenvolvidos. Para avaliar a porosidade de um material, novas metodologias estão sendo propostas, como a análise em microtomografia computadorizada (Micro-CT)^{10,11}.

Micro-CT é uma ferramenta não destrutiva que permite avaliar a microestrutura interna de materiais endodônticos, além da adaptação marginal de cimentos¹². Além disso, a Micro-CT pode ser utilizada para avaliação da alteração volumétrica de cimentos endodônticos após imersão em diversos fluídos⁴. Com a análise volumétrica

(em mm³), podemos relacionar a propriedade de solubilidade com a alteração dimensional dos materiais⁴.

MTA Repair HP (MTA HP. Angelus, PR, Brasil) é um cimento reparador a base de silicato tricálcico desenvolvido para melhorar características do MTA, como a consistência e manipulação. Apresentado na forma de pó-líquido, seu pó contém silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio e tungstato de cálcio e o líquido água e plastificante para melhorar a manipulação¹³. A biocompatibilidade e capacidade de induzir biomineralização do MTA Repair HP é comprovada¹³⁻¹⁵. Além disso, apresenta propriedades físico-químicas satisfatórias, como baixa solubilidade, escoamento, radiopacidade¹³ e resistência a compressão¹⁶. Até o momento, nenhum estudo foi desenvolvido avaliando a estabilidade volumétrica do MTA Repair HP.

NeoPutty é um novo cimento reparador pronto para uso e segundo o fabricante (Nusmile, Houston, TX USA) é constituído por um pó inorgânico extremamente fino de silicato tricálcico/dicálcico em meio orgânico. Segundo o fabricante, NeoPutty apresenta propriedades biológicas como bioatividade e biocompatibilidade, além de radiopacidade, estabilidade dimensional, pH elevado, consistência adequada para inserção na cavidade, tempo de trabalho de 1h e de presa de 4 horas, além de não causar escurecimento dentário. Sua indicação abrange vários procedimentos, como por exemplo: pulpotomias, selamento de perfurações, retrobturação, reabsorção radicular, etc. Ainda existem poucos estudos na literatura sobre esse material e suas propriedades.

BioRoot RCS (Septodont, Saint Maur des Fossés, França) é um cimento obturador biocerâmico composto por silicato tricálcico, óxido de zircônio e povidona no pó e cloreto de cálcio dihidratado e água no líquido. BioRoot demonstrou ser biocompatível e bioativo¹⁷, além de apresentar adequadas propriedades físico-químicas¹⁸ e antimicrobianas contra *Enterococcus faecalis*^{19,20}. Porém, por ser a base de silicato de cálcio, alguns estudos mostram alta solubilidade¹⁸ e maior porosidade quando comparado a um cimento de resina epóxi AH-Plus (Dentsply)^{21,22}.

Neo-MTA 2 é um novo cimento na apresentação pó-líquido e segundo o fabricante (Nusmile, Houston, TX USA) é composto por um pó inorgânico extremamente fino de silicato tricálcico e dicálcico e um gel à base de água para ser utilizado como material reparador (selamento de perfurações, retrobturação, pulpotomia) ou obturador de canais radiculares, dependendo da quantidade de gel

incorporada. Ainda, segundo o fabricante, o NeoMTA 2 foi produzido para facilitar a manipulação em comparação ao NeoMTA com maior radiopacidade (óxido de tântalo). Na consistência putty (utilizado como reparador), seu tempo de presa é de 14 minutos. Quando adicionado mais gel (utilizado como obturador) apresenta em torno de 1 hora e 10 minutos para a presa final. Ainda não há estudos sobre as propriedades desse novo cimento endodôntico.

Ação antimicrobiana é desejável aos materiais reparadores, já que essa propriedade pode colaborar para a desinfecção da dentina adjacente, aumentando as chances de sucesso do tratamento. Os materiais à base de silicato tricálcico já mostraram apresentar ação antimicrobiana devido ao pH alcalino²³. Esta propriedade pode ser associada com a liberação de íons hidroxila durante o processo de hidratação do material^{24,25}. Substâncias como a cetramida (CTR)²⁶ podem ser adicionadas ao material, visando aumentar a atividade antimicrobiana e contribuindo para o sucesso do tratamento. A CTR ou brometo de cetil-trimetil-amônio é um surfactante catiônico que apresenta efetividade antimicrobiana e antibiofilme sobre *E. faecalis*^{27,28} e tem sido associado às soluções irrigadoras como clorexidina (CHX)²⁸, soluções quelantes (EDTA)^{27,29} e a cimentos obturadores^{26,30}. Desta maneira, a incorporação de agentes amônio quaternários aos materiais endodônticos tem sido relatada, demonstrando potencial para melhorar a ação antimicrobiana.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

2.1 Objetivo Geral

Avaliação físico-química convencional e em Micro-CT, e atividade antibiofilme de materiais endodônticos biocerâmicos reparadores e obturadores associados ou não a Cetramida.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar as propriedades físico-químicas (pH, tempo de presa, solubilidade, alteração volumétrica e porosidade) e atividade antibiofilme de novo cimento reparador NeoPutty (Nusmile, EUA) em comparação ao MTA Repair HP (Angelus, Brasil);

Avaliar as propriedades físico-químicas (pH, tempo de presa e alteração volumétrica) e atividade antibiofilme de novo cimento endodôntico Neo-MTA 2 (Nusmile, EUA) em comparação ao BioRoot RCS (Septodont, França) associados ou não a cetramida (CTR) 1%.

3 PUBLICAÇÕES

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

3.1 Publicação 1*

Propriedades físico-químicas e atividade antibiofilme de um novo material reparador biocerâmico - NeoPutty

Resumo

Introdução: NeoPutty (Nusmile, EUA) é um novo cimento reparador biocerâmico pronto para uso à base de silicato tricálcico/dicálcico. Propriedades físico-químicas e a ação antibiofilme do NeoPutty foram comparadas ao MTA Repair HP (MTA-HP).

Métodos: Tempo de presa (TP) foi avaliado segundo norma ISO-6876. pH foi avaliado nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias da imersão dos materiais em água deionizada. A solubilidade foi determinada pela perda de massa após 7 dias de imersão em água destilada. A alteração volumétrica e porosidade foram avaliadas por meio de microtomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176), utilizando tubos de dentina bovina preenchidos com os cimentos. O escaneamento dos espécimes foi realizado 24 horas após manipulação e após 7 dias de imersão em PBS. A atividade antibiofilme, foi avaliada pelo teste de contato direto com biofilme de *Enterococcus faecalis* (TCDM). Os dados obtidos nos testes físico-químicos foram submetidos ao teste t não pareado ($\alpha=0,05$) e no teste antimicrobiano ao teste de ANOVA e Tukey ($\alpha = ,05$). **Resultados:** NeoPutty apresentou maior TP quando que MTA Repair HP ($P < ,05$). Em todos os períodos, os dois cimentos apresentaram pH alcalino. No entanto, MTA Repair HP apresentou maior pH ($P < ,05$). NeoPutty demonstrou maior solubilidade ($P < ,05$) que MTA-HP. Porém, ambos materiais apresentaram menos que 3% de solubilidade. A alteração volumétrica e porosidade apresentaram valores menores que 1%, sem diferença significativa entre materiais ($P < ,05$). Ambos os cimentos apresentaram ação antibiofilme em comparação ao grupo controle, sem diferença estatística entre si ($P < ,05$). **Conclusões:** Os materiais apresentam pH alcalino, adequada solubilidade, porosidade e estabilidade dimensional, além de ação antibiofilme, sugerindo a aplicação clínica.

* Artigo redigido segundo as normas do periódico *Journal of Endodontics* para o qual será submetido.

Palavras-chave: Endodontia, micro-tomografia computadorizada, propriedades físico-químicas

Introdução

Materiais reparadores à base de silicatos de cálcio são indicados para tratamento de perfurações radiculares, proteção da polpa e obturação retrógrada (1). As propriedades ideais de um material reparador incluem estabilidade dimensional, baixa solubilidade, capacidade de selamento de comunicações entre periodonto e sistema de canais radiculares (SCR), e potencial antimicrobiano (2).

NeoPUTTY é um novo cimento reparador pronto para uso que segundo o fabricante (Nusmile, Houston, TX USA) é constituído por um pó inorgânico extremamente fino de silicato tricálcico/dicálcico em meio orgânico. Sun et al (3) demonstraram baixa citotoxicidade do NeoPutty em comparação ao EndoSequence BC RRM Putty e ao cimento à base de óxido de zinco e eugenol. MTA Repair HP (MTA HP. Angelus, PR, Brasil) é um cimento reparador à base de silicato tricálcico na forma de pó-líquido que apresenta propriedades biológicas e físico-químicas adequadas (4), como solubilidade, tempo de presa, capacidade de alcalinização e atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* (4, 5).

Estabilidade dimensional e baixa solubilidade são propriedades desejadas para um material endodôntico, já que a contração ou dissolução pode comprometer o sucesso do tratamento (6, 7). Segundo especificações da ANSI/ADA nº57 e ISO 6876, a alteração dimensional não deve exceder 1,0% em contração ou 0,1% em expansão. A porosidade do material reparador pode comprometer o selamento (8). Micro-CT (9, 10) permite avaliar porosidade e alteração volumétrica de um material, por meio da visualização da microestrutura interna (11).

O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado com o controle da microbiota e da infecção presente no SCR (12). A ação antimicrobiana de materiais reparadores é desejável, e pode contribuir para o controle da infecção persistente. *E. faecalis* participa da microbiota em casos de insucesso endodôntico e lesões periapicais persistentes (13).

Ainda existem poucos estudos na literatura sobre o cimento NeoPutty e suas propriedades. A hipótese nula é de que o novo cimento NeoPutty, apresenta adequadas propriedades físico-químicas e ação antibiofilme similares ao cimento MTA Repair HP.

Metodologia

Tabela 1 - Materiais com seus respectivos fabricantes, composição e proporção

MATERIAIS	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO	PROPORÇÃO
NeoPUTTY	Avalon Biomed, Houston, TX USA	Tricalcium/dicalcium silicate in an organic medium.	Pronto para uso
MTA Repair HP	Angelus, Londrina, PR, Brasil	Pó: Silicato tricálcico; Silicato dicálcico; Aluminato tricálcico; Óxido de Cálcio; Tungstato de Cálcio; Líquido: Água e plastificante.	1g pó: 300 µL líquido

Propriedades físico-químicas

Tempo de presa (TP)

A avaliação do tempo de presa (TP) foi realizada de acordo com norma ISO-6876;2012 (14). Foram confeccionados anéis em gesso especial com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura ($n = 6$) e utilizadas as agulhas de Gilmore. Os anéis de gesso foram armazenados a 37°C e imersos em água por 24h antes do teste. TP (em minutos) foi determinado como o período entre a manipulação e o momento em que a agulha não produziu marcas nos cimentos.

pH

Tubos de polietileno de 10 x 1,6 mm (comprimento x diâmetro) ($n = 10$) preenchidos com cada material foram utilizados para avaliação do pH. Os tubos foram imersos em frascos plásticos contendo 10 mL de água deionizada e mantidos em estufa a 37°C. As mensurações de pH foram realizadas após 1, 3, 7, 14 e 21 dias da manipulação dos materiais, usando pHmetro digital (Digimed, SP, Brasil), a temperatura ambiente de 25°C. Após cada mensuração em triplicata, foi calculada a média para cada grupo e período experimental.

Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado segundo às normas ISO-6876;2012 (14) e os corpos de prova segundo estudo prévio (15). Foram confeccionados corpos de prova medindo 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura ($n = 7$). Cada molde foi preenchido com o cimento a ser avaliado e um fio de nylon impermeável foi colocado no interior do material e armazenado em estufa a 37°C. A massa inicial foi mensurada em balança de precisão (Adventurer - Ohaus, Modelo AR2140 - Indústria de balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). 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 mantidos a 37°C por 7 dias. Após este período, foram secos e armazenados em dessecador até obtenção da massa final. A variação de massa foi expressa em porcentagem da massa original.

Análise por Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) – alteração volumétrica e porosidade

A partir de dentes bovinos extraídos, foram confeccionados tubos de dentina padronizados (n = 5) com 4 mm de comprimento, diâmetro interno de 1,5 mm e espessura das paredes de aproximadamente 1,5 mm. Os canais foram inundados com solução de NaOCl a 1%. A irrigação final foi realizada com 5 mL de NaOCl 2,5% e 5 mL de EDTA 17% por 3 minutos, seguido de água destilada. Após o preparo, os espécimes foram imersos em água destilada a 37°C por 24 horas, e as cavidades preenchidas com os materiais. Após 24 horas, escaneamento em microtomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica) foi realizado com os seguintes parâmetros: resolução de 9 µm, frame 4, filtro de cobre e alumínio, rotação 180°, 80 kV e 300 uA. Em seguida, os espécimes foram imersos em PBS (n = 5) por 7 dias e mantidos em estufa a 37°C. Novos escaneamentos foram realizados após o período de imersão.

As reconstruções das imagens foram realizadas no programa NRecon (V1.6.4.7; SkyScan, Bélgica), após definição dos parâmetros individuais para o material. As imagens reconstruídas em 3D foram registradas nos diferentes períodos utilizando o programa Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica). As imagens registradas foram analisadas quantitativamente no programa CTAn (V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica). Cada espécime foi dividido em duas partes de 2 mm cada para análise da alteração volumétrica e porosidade. A avaliação da alteração volumétrica dos materiais foi realizada pela análise quantitativa das amostras, permitindo o cálculo da diferença no volume total dos materiais, em mm³, antes e após a imersão. A porosidade dos materiais após a presa e a influência da imersão em PBS foi quantificada por avaliação dos poros abertos, fechados e da porosidade total do material. Modelos 3D das cavidades foram obtidos por meio do programa CTVol (V2.3.1.0).

Análise da atividade antimicrobiana

A atividade antibiofilme, foi avaliada pelo teste de contato direto modificado com biofilme (TCDM). Foram utilizados como substrato para a formação do biofilme discos

de hidroxiapatita (Instituto de Física- USP-São Carlos). Biofilme *E. faecalis* foi cultivado durante 7 dias em meio Triplic Soy broth em placas de 24 poços, com trocas do meio a cada 24 horas. O teste de contato direto sobre biofilme foi realizado com eluído do cimento fresco (50 mg/mL). O número de amostras foi de 6 para cada eluído. Foi preparado eluído em água destilada esterilizada de 50 mg/mL de concentração em tubos falcon de 15 mL, agitados e mantidos em repouso em estufa a 37°C por 48 horas. Os discos de hidroxiapatita foram imersos em tubos tipo eppendorf (500 µL), contendo 300 µL de cada eluído e o grupo controle foi a solução salina. Os discos permaneceram em contato por 15 horas, em estufa a 37°C. Decorrido o tempo de contato, os discos de hidroxiapatita que estavam em contato com o eluído foram removidos e individualmente inseridos em tubos de polietileno tipo eppendorf contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro, que foram agitados em vórtex por 1 minuto, com o propósito de permitir a suspensão dos microrganismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e três alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições, foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura *Tryptic Soy agar* (TSA). As placas permaneceram incubadas por 48 horas a 37°C, e após este período foi realizada a contagem de UFC/mL e os dados submetidos à transformação logarítmica (log10).

Resultados

Propriedades Físico-químicas

A Tabela 2 demonstra que NeoPutty apresentou maior TP quando comparado ao MTA Repair HP ($P < ,05$). Em todos os períodos, os dois cimentos apresentaram pH alcalino. No entanto, MTA Repair HP mostrou maior valor ($P < ,05$). Os materiais apresentaram diferença estatística em relação a solubilidade ($P < ,05$). com aumento de massa para MTA Repair HP e perda de massa para NeoPUTTY.

A alteração volumétrica e porosidade total dos materiais apresentaram valores menores que 1%, não apresentando diferença significativa entre si ($P < ,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão do tempo de presa (TP), pH, solubilidade, análise de alteração volumétrica e porosidade dos materiais avaliados

Análise / Grupos		NeoPUTTY	MTA Repair HP	Controle (H ₂ O)
TP (minutos)		138,3 ($\pm 7,84$) ^a	26,5 ($\pm 4,13$) ^b	-----
pH (dias)	1	9,57 ($\pm 0,29$) ^a	10,28 ($\pm 0,46$) ^b	7,71 ($\pm 0,10$) ^c
	3	10,11 ($\pm 0,34$) ^a	10,13 ($\pm 0,51$) ^a	7,57 ($\pm 0,08$) ^b
	7	9,66 ($\pm 0,47$) ^a	10,32 ($\pm 0,31$) ^b	7,46 ($\pm 0,24$) ^c
	14	9,39 ($\pm 0,24$) ^a	10,07 ($\pm 0,74$) ^b	7,37 ($\pm 0,29$) ^c
	21	9,10 ($\pm 0,21$) ^a	9,75 ($\pm 0,73$) ^b	6,46 ($\pm 0,28$) ^c
Solubilidade (% perda de massa)*		1,767 ($\pm 0,255$) ^a	-0,143 ($\pm 0,272$) ^b	-----
Alteração volumétrica (%)		0,395 ($\pm 0,382$) ^a	0,414 ($\pm 0,284$) ^a	-----
Porosidade Total (%)		0,648 ($\pm 0,144$) ^a	0,610 ($\pm 0,249$) ^a	-----

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

*Para solubilidade, valores negativos indicam aumento de massa.

Controle: água deionizada.

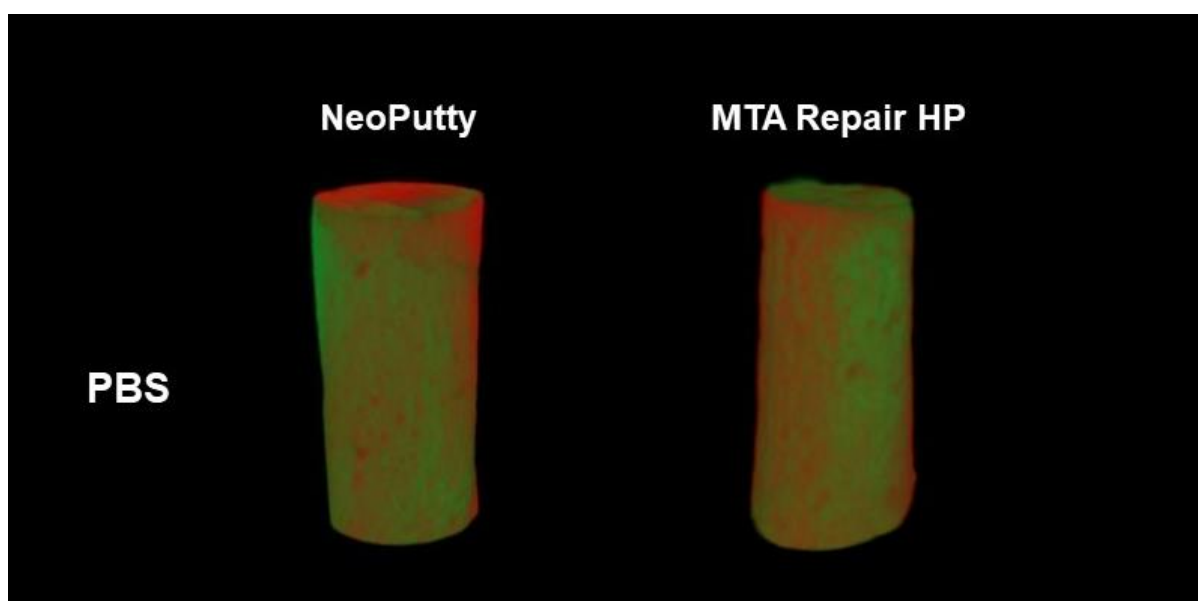


Figura 1 - Reconstruções tridimensionais de micro-CT mostrando sobreposição do volume dos cimentos NeoPutty e MTA Repair HP antes (vermelho) e após (verde) imersão em PBS por 7 dias. Áreas densas em verde indicam ganho de volume, enquanto áreas em vermelho indicam perda de volume.

Teste de Contato Direto (TCDM)

Os resultados do TCDM estão representados na Tabela 3. Maior atividade antibiofilme foi observada para os cimentos NeoPutty e MTA Repair HP, em comparação ao controle positivo/C+ ($P < ,05$). NeoPutty e MTA Repair HP não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) em relação a atividade antibiofilme.

Tabela 3. Contagem de UFC mL⁻¹ log₁₀

Grupos	NeoPutty	MTA Repair HP	C+
UFC mL ⁻¹	3,64 (±0,59) ^a	3,77 (±0,40) ^a	7,91 (±0,19) ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < ,05$).

Controle Positivo - C+: disco de Teflon.

Discussão

Propriedades físico-químicas adequadas e ação antibiofilme são desejáveis para materiais reparadores. A hipótese nula foi parcialmente aceita uma vez que o cimento NeoPutty apresentou propriedades físico-químicas e antibiofilme, similares ao MTA Repair HP. NeoPutty apresentou menor pH e maior solubilidade, porém dentro de parâmetros adequados para materiais reparadores.

As propriedades físico-químicas de cimentos reparadores de silicato de cálcio, como liberação de íons, solubilidade e tempo de presa, são importantes para a sua indicação clínica (16). O tempo de presa (TP) de materiais de silicatos de cálcio depende do tamanho das partículas de seus componentes, da temperatura e umidade relativa do ambiente (17). Cimentos de silicatos de cálcio necessitam da umidade para que ocorra seu processo de hidratação e presa (18). Sendo assim, foram confeccionados anéis de gesso mantidos em água antes do teste ISO-6876;2012 (14). No caso de cimentos reparadores, um tempo de presa prolongado pode permitir deslocamento ou desintegração (19). NeoPutty, demonstrou maior TP em comparação ao MTA Repair HP. Cimentos prontos para uso apresentam partículas menores, o que pode acarretar um TP mais elevado (20). Além disso, Loushine et al (21) demonstraram que quanto maior a presença de água, era observado uma diminuição do TP de cimentos biocerâmicos, evidenciando uma relação direta entre os níveis de umidade e o processo de endurecimento dos cimentos.

Baixos valores de solubilidade são desejáveis para cimentos reparadores, promovendo selamento a longo prazo, evitando infiltrações e insucesso do tratamento

(22). As normas ISO 6876 indicam que o cimento obturador de canais radiculares não deve apresentar perda de massa maior que 3%. Estas normas também podem ser aplicadas para materiais reparadores. No presente estudo, a solubilidade foi avaliada por meio do teste convencional e NeoPutty demonstrou baixa perda de massa, menor que 3%. Já MTA Repair HP, apresentou ganho de massa, como observado em estudos prévios (5). Os valores de solubilidade apresentados pelos materiais à base de SC poderiam ser associados com o processo de hidratação (23), visto que esses materiais são considerados hidrofílicos (24). Quando imersos, captam a água no processo de hidratação, gerando um aumento de massa à medida que a água é incorporada na estrutura. Desta forma, o aumento da massa após 7 dias em água destilada do MTA Repair HP, provavelmente ocorreu em função da captação da água que participa do processo de hidratação (25).

Além da solubilidade esses cimentos podem sofrer degradação ou absorção de água com o tempo (26) e considerando que a solubilidade dos materiais pode não representar a estabilidade volumétrica (27), novas metodologias utilizando a Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) são aplicadas para complementar a avaliação de materiais biocerâmicos (22, 28). Desse modo, a metodologia utilizada em Micro-CT permite uma análise tridimensional (em mm³), possibilitando que as propriedades de alteração volumétrica e porosidade complementando os valores de solubilidade e aproximando da situação clínica (28). Como pode ser visto, os resultados demonstraram baixa alteração volumétrica e porosidade dos cimentos testados (< 1%), além de baixa solubilidade (< 3%), indicando que os materiais apresentam estabilidade dimensional, propriedade importante para indicação clínica (6).

Os materiais apresentaram pH alcalino, com maiores valores no período de 1 dia para MTA Repair HP e no período de 3 dias para NeoPutty. A diminuição da alcalinização apresentada pelo material com o tempo, observada em nossos resultados, também foi demonstrada por Guimarães et al (16). Mesmo com a diminuição, no período de 21 dias, o pH dos materiais se manteve alcalino. Estes resultados sugerem que MTAHP e NeoPutty, promovem pH alcalino que pode contribuir com suas propriedades antimicrobianas (29), como por exemplo contra *E. faecalis* (30). Outra vantagem de um pH elevado por longo período está relacionado à sua bioatividade contribuindo com processo de indução de mineralização (29).

O TCD pode ser realizado sobre células plantônicas ou biofilmes. O TCDM é realizado sobre biofilme e simula a situação clínica, uma vez que as bactérias organizadas em biofilmes são mais resistentes aos efeitos de agentes antibacterianos usados no tratamento endodôntico (31). A atividade antimicrobiana dos cimentos de SC sobre *E. faecalis* está associada a formação de hidróxido de cálcio, que é capaz de gerar danos na membrana e DNA, e levar a desnaturação das proteínas de bactérias gram-negativas (5, 32, 33) demonstrou que a atividade antibacteriana contra *E. faecalis* está presente no cimento MTA Repair HP. No presente estudo, o novo material NeoPutty demonstrou atividade antibiofilme semelhante ao MTA Repair HP, uma propriedade importante do material que pode evitar a recontaminação após procedimentos reparadores em Endodontia.

Conclusões

O novo cimento pronto para uso NeoPutty demonstra propriedades físico-químicas favoráveis como adequado tempo de presa, pH alcalino, baixa solubilidade, estabilidade dimensional, baixa porosidade e atividade antibiofilme. Contudo, mais estudos devem ser realizados para avaliação de outras propriedades físico-químicas e biológicas desse novo cimento biocerâmico reparador pronto para uso.

Referências

1. Borges AH, Bandeca MC, Tonetto MR, et al. Portland cement use in dental root perforations: a long term followup. Case Rep Dent 2014;2014:637693.
2. Khan S, Kaleem M, Fareed MA, et al. Chemical and morphological characteristics of mineral trioxide aggregate and Portland cements. Dent Mater J 2016;35:112-7.
3. Sun Q, Meng M, Steed JN, et al. Manoeuvrability and biocompatibility of endodontic tricalcium silicate-based putties. J Dent 2021;104:103530.
4. Ferreira CMA, Sassone LM, Goncalves AS, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. Sci Rep 2019;9:3933.
5. Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, et al. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. Dent Mater 2021;37:311-20.

6. Amoroso-Silva PA, Guimaraes BM, Marciano MA, et al. Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Fillapex. *Microsc Res Tech* 2014;77:1031-6.
7. Williamson AE, Dawson DV, Drake DR, et al. Effect of root canal filling/sealer systems on apical endotoxin penetration: a coronal leakage evaluation. *J Endod* 2005;31:599-604.
8. De Souza ET, Nunes Tameirao MD, Roter JM, et al. Tridimensional quantitative porosity characterization of three set calcium silicate-based repair cements for endodontic use. *Microsc Res Tech* 2013;76:1093-8.
9. Akinci L, Simsek N, Aydinbelge HA. Physical properties of MTA, BioAggregate and Biodentine in simulated conditions: A micro-CT analysis. *Dent Mater J* 2020;39:601-7.
10. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J* 2020;53:385-91.
11. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, et al. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J* 2013;46:253-63.
12. Maria Ferrer-Luque C, Teresa Arias-Moliz M, Ruiz-Linares M, et al. Residual activity of cetrime and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Int J Oral Sci* 2014;6:46-9.
13. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-8.
14. International Organization for Standardization Dentistry. Root canal sealing materials. British Standards Institution ISO 6876. London, UK. 2012.
15. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, et al. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod* 2007;33:1110-6.
16. Guimaraes BM, Prati C, Duarte MAH, et al. Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitalcem. *J Appl Oral Sci* 2018;26:e2017115.
17. Ruiz-Linares M, Bailon-Sanchez ME, Baca P, et al. Physical properties of AH Plus with chlorhexidine and cetrime. *J Endod* 2013;39:1611-4.

18. 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.
19. Singh S, Podar R, Dadu S, et al. Solubility of a new calcium silicate-based root-end filling material. *J Conserv Dent* 2015;18:149-53.
20. Aberg J, Engstrand J, Engqvist H. Influence of particle size on hardening and handling of a premixed calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 2013;24:829-35.
21. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod* 2011;37:673-7.
22. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J* 2017;50:407-14.
23. Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR, et al. Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clin Oral Investig* 2019;23:1359-66.
24. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Calcium silicate-based sealers: Assessment of physicochemical properties, porosity and hydration. *Dent Mater* 2016;32:e30-40.
25. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod* 2003;29:814-7.
26. Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, et al. Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *J Appl Oral Sci* 2017;25:374-80.
27. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. *J Endod* 2019;45:1248-52.
28. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, et al. Solubility, Porosity, Dimensional and Volumetric Change of Endodontic Sealers. *Braz Dent J* 2019;30:368-73.
29. 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.
30. Razmi H, Aminsobhani M, Bolhari B, et al. Calcium Enriched Mixture and Mineral Trioxide Aggregate Activities against *Enterococcus Faecalis* in Presence of Dentin. *Iran Endod J* 2013;8:191-6.

31. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Junior NB, et al. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrимide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J* 2014;47:1058-63.
32. Alsubait S, Albader S, Alajlan N, et al. Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate- and epoxy resin-based endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. *Odontology* 2019;107:513-20.
33. Shin JH, Lee DY, Lee SH. Comparison of antimicrobial activity of traditional and new developed root sealers against pathogens related root canal. *J Dent Sci* 2018;13:54-9.

3.2 Publicação 2*

Propriedades físico-químicas e antibiofilme de materiais endodônticos biocerâmicos e associações com cetramida

Resumo: O objetivo do presente estudo foi avaliar pH, tempo de presa, alteração volumétrica, porosidade e atividade antibiofilme do novo cimento endodôntico Neo-MTA 2 (Nusmile, EUA) (NMTA2) e BioRoot RCS (Septodont, França) (BR) associados ou não a cetramida (CTR) 1%. Os materiais NMTA2, NMTA2/CTR, BR, BR/CTR foram avaliados. Tempo de presa (TP) foi avaliado segundo norma ISO-6876 empregando agulha Gilmore. Tubos de polietileno preenchidos com os cimentos foram utilizados para avaliação do pH nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias da imersão em água deionizada. Tubos de dentina bovina preenchidos com cimentos foram utilizados para avaliar alteração volumétrica por meio de microtomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176) 24h após manipulação e depois de 7 e 28 dias de imersão em PBS. A atividade antibiofilme, foi avaliada pelo teste de contato direto modificado com biofilme de *Enterococcus faecalis* formado em discos de hidroxiapatita. Os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos adequados para cada etapa dos experimentos. O nível de significância adotado foi de 5%. BR e BR+CTR apresentaram menor TP quando que NMTA2 e NMTA2+CTR ($p<0,05$). Os cimentos avaliados e associações apresentaram pH alcalino até 21 dias. Não houve diferença significativa na alteração volumétrica entre a extremidade e a parte interna dos espécimes ($p>0,05$). Os grupos que apresentaram diferença estatística entre os períodos de 7 e 28 dias ($p<0,05$) são NEO MTA2 na análise da extremidade e NEO+CTR na análise da parte interna do espécime, sendo que após 28 dias os materiais apresentam diminuição do volume. Materiais com associação a CTR demonstraram maior atividade antibiofilme ($p<0,5$) quando comparados com os cimentos sem associação. Os materiais apresentaram adequados tempo de presa e pH, baixa alteração volumétrica e atividade antibiofilme. A associação com CTR não prejudicou as propriedades físico-químicas dos cimentos Neo-MTA 2 e BioRoot RCS, e aumentou a atividade antibiofilme dos materiais.

* Artigo redigido segundo as normas do periódico *Brazilian Oral Research* para o qual será submetido.

Palavras-chave: Análise físico-química; Biofilme; Endodontia; *Enterococcus faecalis*; Silicato de cálcio.

Introdução

BioRoot RCS (Septodont, França) é um cimento obturador biocerâmico na apresentação pó-líquido que demonstra biocompatibilidade e bioatividade,¹ além de apresentar adequadas propriedades físico-químicas adequadas² e alguma atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*.^{3,4} Porém, maior solubilidade² e porosidade são relatadas quando comparado a um cimento de resina epóxi AH-Plus.^{5,6} Neo-MTA 2 é um novo cimento na apresentação pó-líquido e segundo o fabricante (Nusmile, Houston, TX USA) é composto por um pó inorgânico extremamente fino de silicato tricálcico e dicálcico. O pó é manipulado com um gel à base de água para ser utilizado como material reparador (selamento de perfurações, retrobturação, pulpotomia) ou obturador em função da proporção de gel incorporada. Ainda não há estudos sobre as propriedades desse novo cimento endodôntico.

Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) pode ser utilizada para avaliação da alteração volumétrica de cimentos endodônticos.⁷

A persistência de micro-organismos no sistema de canais radiculares (SCR) favorece o desenvolvimento e manutenção de patologias perirradiculares, e contribui com o fracasso do tratamento endodôntico convencional ou cirúrgico.⁸ *E. faecalis* é um micro-organismo anaeróbico facultativo, capaz de sobreviver em mínimas condições de oxigênio e nutrientes,⁹ mesmo em ambiente alcalino e apresenta capacidade de organização em biofilme.¹⁰ A cetramida (CTR) apresenta efetividade antimicrobiana e antibiofilme sobre *E. faecalis*¹¹ e tem sido associado às soluções irrigadoras como clorexidina (CHX),¹² soluções quelantes (EDTA)^{13,14} e a cimentos obturadores.^{9,15} Desta maneira, a incorporação de agentes amônio quaternários aos materiais endodônticos apresenta potencial para melhorar a ação antimicrobiana.

Não existem estudos na literatura que avaliem a adição de CTR aos cimentos BioRoot RCS e Neo-MTA2. Assim, o objetivo deste estudo será avaliar tempo de presa, pH e a alteração volumétrica por Micro-CT, além da atividade antibacteriana dos cimentos NeoMTA2 e BioRoot RCS e de suas associações com CTR a 1%. A hipótese nula foi a de que Cetramida não interfere nas propriedades físico-químicas e na atividade antibiofilme dos cimentos biocerâmicos NeoMTA2 e BioRoot RCS.

Metodologia

Tabela 1. Materiais com seus respectivos fabricantes, composição e proporção

Grupos	Materiais	Fabricante	Composição	Proporção
NMT2	Neo-MTA 2	Avalon Biomed, Houston, TX USA	Powder: Tricalcium silicate, Dicalcium silicate, Tantalum Oxide, Calcium sulfate, Tricalcium Aluminate Water-based liquid	1 porção de pó: 1 gota gel
NMT2/CTR	Neo-MTA 2 + Cetramida 1%	Avalon Biomed, Houston, TX USA	Powder: Tricalcium silicate, Dicalcium silicate, Tantalum Oxide, Calcium sulfate, Tricalcium Aluminate Water-based liquid	1 porção de pó: 1 gota gel
BR	BioRoot RCS	Septodont, Saint Maur des Fossés, França	Powder: tricalcium silicate, zirconium oxide, excipients Liquid: aqueous solution of calcium chloride, excipients	1 porção de pó: 6 gotas líquido
BR/CTR	BioRoot RCS + Cetramida 1%	Septodont, Saint Maur des Fossés, França	Powder: tricalcium silicate, zirconium oxide, excipients Liquid: aqueous solution of calcium chloride, excipients	1 porção de pó: 6 gotas líquido

Tempo de presa (TP)

A avaliação do tempo de presa (TP) foi realizada de acordo com norma ISO-6876;2012¹⁶. Foram confeccionados anéis em gesso especial com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura (n = 6) e utilizadas as agulhas de Gilmore. Os anéis de gesso foram armazenados a 37°C e a mais de 95% de umidade relativa por 24 h antes do teste. TP (em minutos) foi determinado como o período entre a manipulação e o momento em que a agulha não produziu marcas nos cimentos.

pH

Para avaliação do pH, foram utilizados tubos de polietileno de 10 x 1,6 mm (comprimento x diâmetro) (n = 10), os quais foram preenchidos com cada material. Os tubos foram imersos em frascos plásticos contendo 10 mL de água deionizada e mantidos em estufa a 37°C. As mensurações de pH foram realizadas após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias da manipulação dos materiais, usando pHmetro digital (Digimed, SP, Brasil), a temperatura ambiente de 25°C. Após cada mensuração em triplicata, foi calculada a média para cada grupo e período experimental.

Microtomografia Computadorizada (Micro-CT): alteração volumétrica

Tubos de dentina bovina padronizados (n = 5) foram confeccionados com 4 mm de comprimento, diâmetro interno de 1,5 mm e espessura das paredes de aproximadamente 1,5 mm. Durante todo o preparo, os espécimes foram inundados com solução de NaOCl a 1%. A irrigação final foi realizada com 5 mL de NaOCl 2,5% e 5 mL de EDTA 17%, por 3 minutos, seguido de água destilada. Após o preparo, os espécimes foram imersos em água destilada e armazenados em estufa a 37°C por 24 h. Decorridas as 24 h, as cavidades foram preenchidas com os materiais e mantidas em estufa a 37°C e umidade relativa por 3 vezes a duração do tempo de presa. Após esse período, os espécimes foram submetidos a escaneamento em microtomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: resolução de 9 µm, frame 4, filtro de cobre e alumínio, rotação 180°, 80 kV e 300 uA. Em seguida, os espécimes foram imersos em PBS (n = 5) mantidos em estufa a 37°C. Novos escaneamentos foram realizados após 7 e 28 dias de imersão.

As reconstruções das imagens foram realizadas no programa NRecon (V1.6.4.7; SkyScan, Bélgica), após definição dos parâmetros individuais para o material. As imagens reconstruídas em 3D foram registradas nos diferentes períodos utilizando o programa Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica). As imagens registradas foram analisadas quantitativamente no programa CTAn (V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica). Cada espécime foi dividido em duas partes de 2 mm cada para análise da alteração volumétrica. Além da análise das duas partes de 2 mm englobando as extremidades do espécime, foi realizada a análise de 2 mm na parte interna, descartando as extremidades. A avaliação da alteração volumétrica dos materiais foi realizada pela análise quantitativa das amostras, permitindo o cálculo da diferença no volume total dos materiais, em mm³, antes e após a imersão. Modelos 3D das cavidades foram obtidos por meio do programa CTVol (V2.3.1.0) com objetivo de ilustração.

Atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme, foi avaliada pelo teste de contato direto modificado com biofilme (TCDM). Foram utilizados como substrato para a formação do biofilme discos de hidroxiapatita (Instituto de Física- USP-São Carlos). Biofilme de *E. faecalis* foi cultivado durante 7 dias em meio Triplic Soy broth em placas de 24 poços, com trocas do meio a cada 24 h. O teste de contato direto sobre biofilme foi realizado com eluído

do cimento fresco (50 mg/mL). O número de amostras foi de 6 para cada eluído. Foi preparado eluído em água destilada esterilizada de 50 mg/mL de concentração em tubos falcon de 15 mL, agitados e mantidos em repouso em estufa a 37°C por 48 h. Os discos de hidroxiapatita foram imersos em tubos tipo eppendorf (500 µL), contendo 300 µL de cada eluído e o grupo controle foi a solução salina. Os discos permaneceram em contato por 15 h, em estufa a 37°C. Decorrido o tempo de contato, os discos de hidroxiapatita que estavam em contato com o eluído foram removidos e individualmente inseridos em tubos de polietileno tipo eppendorf contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro, que foram agitados em vórtex por 1 min, com o propósito de permitir a suspensão dos microrganismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e três alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições, foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura *Tryptic Soy agar* (TSa). As placas permaneceram incubadas por 48 h a 37°C, e após este período foi realizada a contagem de UFC mL⁻¹ e os dados submetidos à transformação logarítmica (log10).

Resultados

Os resultados da avaliação das propriedades físico-químicas estão representados na Tabela 2. BR e BR+CTR apresentaram menor TP quando comparado aos grupos de NMTA2 e NMTA2 + CTR ($p < 0,05$). Em todos os períodos, os cimentos avaliados e associações apresentaram pH alcalino, que se manteve até o último período avaliado - 21 dias. No entanto, no período de 1 dia, o maior pH foi demonstrado por NMTA2+CTR, seguido pelos grupos BR+CTR, NMTA2 e BR, com diferença estatística significativa entre todos os grupos ($p < 0,05$).

A análise de alteração volumétrica das extremidades e da parte interna dos materiais apresentaram valores menores que 1%. Não houve diferença significativa entre a extremidade e a parte interna dos espécimes ($p > 0.05$). Os grupos que apresentaram diferença estatística entre os períodos de 7 e 28 dias ($p < 0.05$) são NEOMTA2 na análise da extremidade e NEO+CTR na análise da parte interna do espécime, sendo que após 28 dias os materiais apresentam diminuição do volume. O restante não apresentou diferença significativa entre os períodos ($p > 0.05$).

Tabela 2 - Média e desvio padrão do tempo de presa (TP) e pH dos materiais avaliados

Análise / Grupos	BR	BR + CTR	NMTA2	NMTA2 + CTR	Controle (H ₂ O)
TP (minutos)	205,8 (±3.76) ^a	205,8 (±3.76) ^a	441,7 (±18.35) ^b	431,7 (±17.22) ^b	-----
1	10,12 (±0,45) ^a	11,15 (±0,23) ^b	10,50 (±0,34) ^c	11,20 (±0,13) ^{bd}	7,59 (±0,20) ^e
3	10,36 (±0,28) ^a	10,53 (±0,23) ^a	10,08 (±0,30) ^a	10,10 (±0,75) ^a	7,57 (±0,26) ^b
pH (dias)					
7	10,31 (±0,42) ^a	10,56 (±0,26) ^a	10,31 (±0,33) ^a	10,40 (±0,32) ^a	7,42 (±0,21) ^b
14	10,64 (±0,39) ^a	10,63 (±0,47) ^a	10,22 (±0,39) ^a	10,22 (±0,36) ^a	7,37 (±0,29) ^b
21	10,61 (±0,18) ^a	10,64 (±0,51) ^a	10,16 (±0,42) ^a	10,24 (±0,40) ^a	6,46 (±0,28) ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Controle: água deionizada.

Tabela 3 - Mediana, mínima e máxima do percentual de alteração volumétrica dos materiais reparadores Bio-Root e NeoMTA 2 após os períodos de 7 e 28 dias

Análise	Tempo	Bio-Root	Bio + CTR	Neo MTA 2	Neo + CTR
Extremidade	7 dias	0,798 (-0,39-1,29) ^{aA}	0,473 (-0,57-1,59) ^{abA}	-0,756 (-2,72-1,31) ^{bA}	-0,407 (-1,21-1,09) ^{bA}
	28 dias	0,688 (-0,44-1,17) ^{aA}	0,531 (-0,93-1,84) ^{abA}	-0,963 (-2,85-1,49) ^{bbB}	-0,590 (-1,29-1,03) ^{bbA}
Interior	7 dias	0,753 (-0,17-1,02) ^{aA}	0,562 (-0,49-1,27) ^{aA}	-0,739 (-2,71-1,29) ^{aA}	-0,111 (-0,92-1,39) ^{aA}
	28 dias	0,633 (-0,11-1,29) ^{aA}	0,690 (-0,87-1,95) ^{abA}	-0,851 (-2,80-1,95) ^{bA}	-0,299 (-1,10-0,90) ^{abB}

Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística entre os períodos ($p < 0,05$).

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, e apresentaram distribuição não normal. Os testes Kruskal-Wallis e Dunn foram utilizados para comparações entre os grupos. O teste Mann-Whitney foi usado para comparações entre a extremidade e a parte interna dos espécimes. Para comparação entre os períodos foi usado o teste de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5%.

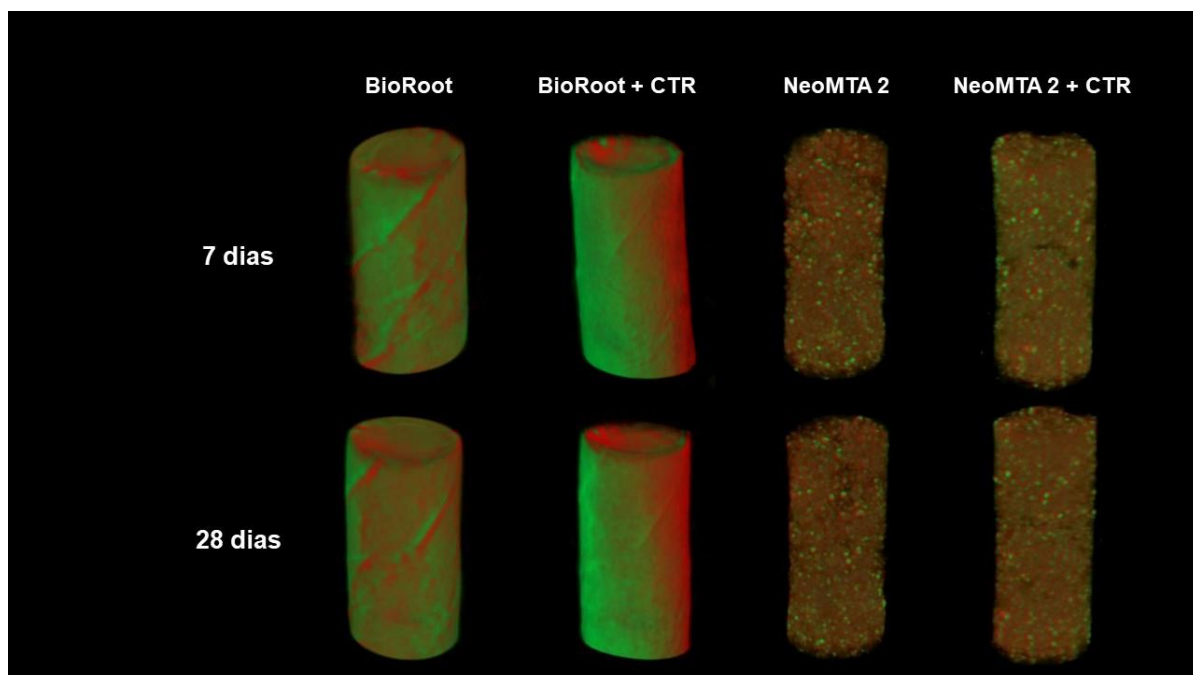


Figura 1 - Reconstruções tridimensionais de micro-CT mostrando sobreposição do volume dos cimentos BioRoot, NeoMTA 2 e associações, antes (vermelho) e após (verde) imersão em PBS por 7 e 28 dias. Áreas densas em verde indicam ganho de volume, enquanto áreas em vermelho indicam perda de volume.

Os resultados do TCDM estão representados na Tabela 3. Maior atividade antibiofilme foi observada para todos os grupos, em comparação ao controle positivo/C+ ($p < 0,05$). BR apresentou maior atividade antibiofilme em comparação ao NMTA2 ($p < 0,5$), porém os grupos em associação com a CTR demonstraram maior atividade ($p < 0,5$) quando comparados com os cimentos sem associação.

Tabela 4 - Contagem de UFC mL⁻¹ log₁₀

Grupos	BR	BR + CTR	NMTA2	NMTA2 + CTR	C+
UFC mL ⁻¹	2,68(±0.49) ^a	0.0 (±0.0) ^b	3,67(±0.49) ^c	0.0 (±0.0) ^b	7,92(±0.19) ^d

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Controle Positivo - C+: disco de Teflon.

Discussão

A hipótese nula foi rejeitada parcialmente, pois a adição de cetramida (CTR) aos cimentos NeoPutty e BioRoot não alterou suas propriedades físico-químicas, porém aumentou a atividade antibiofilme dos cimentos. O objetivo de adicionar

agentes antimicrobianos aos materiais é aumentar sua atividade antimicrobiana.⁹ Outras substâncias têm sido misturadas ou associadas aos materiais endodônticos para melhorar a consistência e a atividade antimicrobiana.^{9,15}

As indicações clínicas dos cimentos endodônticos são relacionadas as propriedades físico-químicas como o tempo de presa, liberação de íons e solubilidade.¹⁷ O tempo de presa de um material obturador é uma propriedade importante, uma vez que um tempo de presa muito longo favorece a dissolução do material.¹⁸ A adição de CTR a 1% não influenciou no tempo de presa do NMTA2 e BioRoot ($p>0,05$).

Após 1 dia, NMTA2+CTR e BIO+CTR apresentaram maior alcalinização. Porém, o pH permaneceu elevado para todos os materiais até 21 dias, mostrando que a associação com a CTR não interferiu na liberação dos íons hidroxila. O pH alcalino desses materiais está relacionado com a liberação dos íons hidroxila e cálcio e formação de hidróxido de cálcio.¹⁸ Essa característica está diretamente relacionada a capacidade antimicrobiana desses materiais^{3,17}. A liberação de íons cálcio também está diretamente relacionada a capacidade regenerativa dos tecidos endodônticos e periodontais.¹⁷

Ruiz-Linares et al.¹⁹ (2013) avaliaram o tempo de presa (TP), escoamento, solubilidade e radiopacidade do cimento obturador AH-Plus e da sua associação à CHX (1 e 2%), CTR (0,1 - 0,5%) e combinações de ambas. Todos os materiais avaliados mostraram valores que estão dentro dos padrões exigidos para um cimento obturador de canais radiculares, porém CTR aumentou o TP e diminuiu a solubilidade do AH-Plus. Os autores concluíram que a adição de CHX, CTR e combinações de ambos não alteraram as propriedades físicas do material obturador. Em semelhança a este estudo, a adição de CTR 1% aos cimentos não alterou as propriedades testadas.

Materiais a base de silicato de cálcio apresentam reação de hidratação, absorvendo água do meio para seu processo de endurecimento. Nos testes de solubilidade convencionais baseados nas normas ISO-6876;2012, os cimentos permanecem em dessecador para estabilização e obtenção da massa final, o que pode resultar em uma maior % de perda de massa para cimentos biocerâmicos que dependem da reação de hidratação.²⁰ Sendo assim, visando uma avaliação tridimensional do comportamento do cimento (em relação à seu volume) no interior do canal, foram propostas avaliações utilizando imagens de Micro-CT, em que o volume

do material pode ser analisado antes e a após a imersão em solução (PBS), revelando seu real comportamento em relação à alteração de volume.^{21,22} Os resultados demonstraram baixa alteração volumétrica dos cimentos (<1%), indicando que os materiais apresentam estabilidade dimensional. Zordan-Bronzel et al.²⁰ (2019) avaliaram cimentos endodônticos a base de silicato de cálcio e apesar de obter como resultado uma solubilidade maior que 10%, a alteração volumétrica foi abaixo de 2%, o que mostra estabilidade dimensional desses materiais.

O TCDM foi realizado sobre biofilme, uma vez que simula uma situação clínica, onde as bactérias, devido a sua organização, podem ser mais resistentes à ação de materiais antimicrobianos endodônticos.¹¹ O TCDM mostrou que a adição de CTR 1% melhorou a atividade antibiofilme dos cimentos NMTA2 e BioRoot, promovendo a erradicação total do biofilme induzido nos discos de hidroxiapatita. Em semelhança à este estudo, Deveci et al.²³ (2019) associaram a CTR a 2,5% ao cimento Biodentine, verificando maior ação antimicrobiana dessa associação contra os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, em comparação ao cimento sem a associação, sem prejudicar a propriedade física testada: resistência à compressão.

A CTR é um surfactante catiônico capaz de promover a ruptura da matriz extracelular de polissacarídeos e sua associação à cimentos endodônticos, como AH Plus, tem aumentado a atividade antibiofilme, promovendo a inibição do biofilme de *E. faecalis*.¹⁹ Na literatura, existe uma variação na concentração da CTR em associação aos cimentos ou soluções irrigadoras, desde 0,2%¹³ até 2,5%,²³, sendo que a partir de 0,5% foi observada uma ação antimicrobiana mais significativa.²⁴ Neste estudo foi utilizada a concentração de CTR a 1%, semelhante a Carbajal Mejia et al.²⁵, em que demonstraram a eficácia antibiofilme da CTR contra *E. faecalis* na mesma concentração.

Conclusão

Os materiais apresentaram adequados tempo de presa e pH, baixa alteração volumétrica e atividade antibiofilme. A associação com CTR não prejudicou as propriedades físico-químicas dos cimentos Neo-MTA 2 e BioRoot RCS, e aumentou a atividade antibiofilme dos materiais.

Referências

1. Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1469-73. 10.1016/j.joen.2015.04.011
2. Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F, Pietrocola G. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2018 Feb;10(2):e120-e6. 10.4317/jced.54548
3. Alsubait S, Albader S, Alajlan N, Alkhunaini N, Niazy A, Almahdy A. Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate- and epoxy resin-based endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. *Odontology.* 2019 Mar 29;107(4):513-20. 10.1007/s10266-019-00425-7
4. Kharouf N, Arntz Y, Eid A, Zghal J, Sauro S, Haikel Y, Mancino D. Physicochemical and Antibacterial Properties of Novel, Premixed Calcium Silicate-Based Sealer Compared to Powder-Liquid Bioceramic Sealer. *J Clin Med.* 2020 Sep 25;9(10):10.3390/jcm9103096
5. Milanovic I, Milovanovic P, Antonijevic D, Dzeletovic B, Djuric M, Miletic V. Immediate and Long-Term Porosity of Calcium Silicate-Based Sealers. *J Endod.* 2020 Apr;46(4):515-23. 10.1016/j.joen.2020.01.007
6. Viapiana R, Moizadeh 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 Aug;49(8):774-82. 10.1111/iej.12513
7. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chavez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2020 Mar;53(3):385-91. 10.1111/iej.13225
8. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Sep;94(3):281-93. 10.1067/moe.2002.126163

9. Bailon-Sanchez ME, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antibacterial and anti-biofilm activity of AH plus with chlorhexidine and cetrimide. *J Endod*. 2014 Jul;40(7):977-81. 10.1016/j.joen.2013.11.020
10. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002 Oct;28(10):689-93. 10.1097/00004770-200210000-00003
11. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Junior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J*. 2014 Nov;47(11):1058-63. 10.1111/iej.12248
12. Maria Ferrer-Luque C, Teresa Arias-Moliz M, Ruiz-Linares M, Elena Martinez Garcia M, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Int J Oral Sci*. 2014 Mar;6(1):46-9. 10.1038/ijos.2013.95
13. Giardino L, Bidossi A, Del Fabbro M, Savadori P, Maddalone M, Ferrari L, Ballal NV, Das S, Rao BSS. Antimicrobial activity, toxicity and accumulated hard-tissue debris (AHTD) removal efficacy of several chelating agents. *Int Endod J*. 2020 Aug;53(8):1093-110. 10.1111/iej.13314
14. Liu Y, Guo L, Li Y, Guo X, Wang B, Wu L. In vitro comparison of antimicrobial effectiveness of QMix and other final irrigants in human root canals. *Sci Rep*. 2015 5(17823). 10.1038/srep17823.
15. Gjorgievska E, Apostolska S, Dimkov A, Nicholson JW, Kaftandzieva A. Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontic sealers. *Dent Mater*. 2013 Mar;29(3):e29-34. 10.1016/j.dental.2012.10.002
16. International Organization for Standardization Dentistry. Root canal sealing materials. British Standards Institution ISO 6876. London, UK. 2012.
17. Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J*. 2017 Apr 28;50(Suppl 2):e83-e94. 10.1111/iej.12787
18. Guimaraes BM, Prati C, Duarte MAH, Bramante CM, Gandolfi MG. Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitalcem. *J Appl Oral Sci*. 2018 Apr 5;26:e2017115. 10.1590/1678-7757-2017-0115

19. Ruiz-Linares M, Bailon-Sanchez ME, Baca P, Valderrama M, Ferrer-Luque CM. Physical properties of AH Plus with chlorhexidine and cetrimide. *J Endod*. 2013 Dec;39(12):1611-4. 10.1016/j.joen.2013.08.002
20. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, Chavez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. *J Endod*. 2019 Oct;45(10):1248-52. 10.1016/j.joen.2019.07.006
21. 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 Jul 22;30(4):368-73. 10.1590/0103-6440201902607
22. Silva EJ, Perez R, Valentim RM, Belladonna FG, De-Deus GA, Lima IC, Neves AA. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *Int Endod J*. 2017 Apr;50(4):407-14. 10.1111/iej.12636
23. Deveci C, Tuzuner T, Cinar C, Odabas ME, Buruk CK. Short-term antibacterial activity and compressive strength of biodentine containing chlorhexidine/cetiramide mixtures. *Niger J Clin Pract*. 2019 Feb;22(2):227-31. 10.4103/njcp.njcp_436_18
24. Ravinanthanan M, Hegde MN, Shetty VA, Kumari S. Antimicrobial assay of combination surfactant irrigant regimen on vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. An in vitro direct contact test. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018 Nov-Dec;15(6):397-403.
25. Carbajal Mejia JB, Aguilar Arrieta A. Reduction of viable *Enterococcus faecalis* in human radicular dentin treated with 1% cetrimide and conventional intracanal medicaments. *Dent Traumatol*. 2016 Aug;32(4):321-7. 10.1111/edt.12250.

4 DISCUSSÃO

Propriedades físico-químicas adequadas e ação antimicrobiana são desejáveis para materiais endodônticos. Assim, para avaliar algumas propriedades de novos cimentos biocerâmicos reparadores e obturadores com ou sem associação a CTR 1%, no presente estudo foi utilizada metodologia baseada em normas já conhecidas como a ISO-6876;2012 e testes realizados em microtomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176) para avaliação da alteração volumétrica e porosidade. Ainda, para avaliar a atividade antibiofilme, foi realizado o TCDM.

Cimentos à base de silicatos de cálcio (SC) necessitam de umidade para que ocorra seu processo de endurecimento³¹. Sendo assim, foram confeccionados anéis de gesso para que a umidade fosse mantida durante a presa do material (ISO-6876;2012). Loushine et al.³² demonstraram que quanto maior a presença de água, era observado uma diminuição do Tempo de Presa (TP) de cimentos biocerâmicos, evidenciando uma relação direta entre os níveis de umidade e o processo de endurecimento dos cimentos. NeoPutty apresentou maior TP quando comparado ao MTA Repair HP ($p < 0,05$), o que pode ser explicado com a sua composição pronta para uso. BR e BR+CTR apresentaram menor TP quando comparado aos grupos de NMTA2 e NMTA2 + CTR ($p < 0,05$).

Após 1 dia, NMTA2+CTR e BIO+CTR apresentaram maior alcalinização. Porém, o pH permaneceu elevado para todos os materiais até 21 dias, mostrando que a associação com a CTR não interferiu na liberação dos íons hidroxila. Os materiais reparadores estudados também apresentaram pH alcalino, com maiores valores no período de 1 dia para MTA Repair HP e no período de 3 dias para NeoPutty. O pH alcalino desses materiais está relacionado com a liberação dos íons hidroxila e cálcio e formação de hidróxido de cálcio³³. Estes resultados sugerem que materiais a base de SC, promovem pH alcalino que pode contribuir com suas propriedades antimicrobianas²³, como por exemplo contra *E. faecalis*³⁴.

A solubilidade dos materiais foi avaliada pois pode haver uma relação direta entre a perda de massa de um material endodôntico e a possibilidade de reinfecção, contribuindo para o insucesso do tratamento endodôntico realizado³¹. Neste caso, NeoPutty demonstrou solubilidade $<3\%$ e MTA Repair HP ainda apresentou ganho de massa, o que pode evitar a recontaminação do SCR. Em um estudo com materiais obturadores a base de SC, apesar de se obter como resultado uma solubilidade maior

que 10%, a alteração volumétrica foi abaixo de 2%, o que mostra estabilidade dimensional desses materiais e uma possível limitação da avaliação convencional dos testes de solubilidade³⁵. Para uma análise mais semelhante ao que ocorre clinicamente, nova metodologia com imagens de microtomografia computadorizada (Micro-CT) pode ser utilizada para avaliação da alteração volumétrica e porosidade de cimentos endodônticos após imersão em PBS⁴, possibilitando o relacionamento dessas propriedades com o valor de solubilidade obtido no teste convencional. Como visto no estudo, a alteração volumétrica e porosidade total dos materiais reparadores NeoPutty e MTAHP apresentaram valores menores que 1%, não apresentando diferença.

O TCDM é um método quantitativo, confiável e reprodutível que permite a quantificação do número de micro-organismos viáveis após diferentes períodos de contato com agentes antimicrobianos e pode ser realizado sobre células plantônicas ou em biofilmes. O teste em biofilme reflete a situação clínica na Endodontia, uma vez que as bactérias organizadas em biofilme resistem muito mais aos efeitos de agentes antibacterianos usados no tratamento endodôntico³⁶.

A atividade antimicrobiana do material pode evitar a recontaminação após procedimentos reparadores em Endodontia. Os cimentos NeoPutty e MTA Repair HP apresentaram uma diminuição na contagem de UFC/ml no TCDM, demonstrando atividade antibiofilme. Visando um aumento da capacidade antimicrobiana contra microrganismos resistentes (como de *Enterococcus faecalis*), a associação com CTR 1% foi realizada, não demonstrando prejuízo das propriedades físico-químicas analisadas. A CTR, é um surfactante catiônico, substância capaz de agir sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*³⁷ e tem sido associada a diversos materiais endodônticos²⁷⁻³⁰. Gjorgievska et al.³⁰ demonstraram grande potencial em melhora da capacidade antimicrobiana, assim como os resultados deste estudo, em que os grupos NMTA2 e BIO associados a CTR erradicaram totalmente o biofilme induzido nos discos de hidroxiapatita.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir:

O novo cimento pronto para uso NeoPutty demonstra propriedades físico-químicas favoráveis como adequado tempo de presa, pH alcalino, baixa solubilidade, estabilidade dimensional, baixa porosidade e atividade antibiofilme;

Novo cimento obturador NeoMTA 2, BioRoot e associações apresentaram adequados tempo de presa, pH alcalino, baixa alteração volumétrica e atividade antibiofilme, sendo que a associação com a CTR não prejudicou as propriedades físico-químicas testadas e aumentou a atividade antibiofilme.

REFERÊNCIAS*

1. International Organization for Standardization Dentistry. Root canal sealing materials. London: British Standards Institution ISO 6876; 2012.
2. American National Standards Institute/American Dental Association. Specification no. 57 ADA. Laboratory testing methods: endodontic filling and sealing materials: endodontic sealing materials. Chicago: ANSI/ADA.; 2000;
3. Akinci L, Simsek N, Aydinbelge HA. Physical properties of MTA, BioAggregate and Biodentine in simulated conditions: a micro-CT analysis. *Dent Mater J*. 2020; 39(4): 601-7.
4. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chavez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2020; 53(3): 385-91.
5. Amoroso-Silva PA, Guimaraes BM, Marciano MA, Duarte MA, Cavenago BC, Ordinola-Zapata R, et al. Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Fillapex. *Microsc Res Tech*. 2014; 77(12): 1031-6.
6. Williamson AE, Dawson DV, Drake DR, Walton RE, Rivera EM. Effect of root canal filling/sealer systems on apical endotoxin penetration: a coronal leakage evaluation. *J Endod*. 2005; 31(8): 599-604.
7. Urban K, Neuhaus J, Donnermeyer D, Schafer E, Dammaschke T. Solubility and pH value of 3 different root canal sealers: A long-term investigation. *J Endod*. 2018; 44(11): 1736-40.
8. Donnermeyer D, Burklein S, Dammaschke T, Schafer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology*. 2019; 107(4): 421-36.
9. De Souza ET, Nunes Tameirao MD, Roter JM, De Assis JT, De Almeida Neves A, De-Deus GA. Tridimensional quantitative porosity characterization of three set calcium silicate-based repair cements for endodontic use. *Microsc Res Tech*. 2013; 76(10): 1093-8.
10. Bianco E, Calvelli C, Citterio CL, Pellegatta A, Venino PM, Maddalone M. Evaluation with micro-ct of the canal seal made with two different bioceramic cements: GuttaFlow Bioseal and BioRoot RCS. *J Contemp Dent Pract*. 2020; 21(4): 359-66.

* 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>

11. 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.
12. Soares AP, Bitter K, Lagrange A, Rack A, Shemesh H, Zaslansky P. Gaps at the interface between dentine and self-adhesive resin cement in post-endodontic restorations quantified in 3D by phase contrast-enhanced micro-CT. *Int Endod J.* 2020; 53(3): 392-402.
13. Ferreira CMA, Sassone LM, Goncalves AS, de Carvalho JJ, Tomas-Catala CJ, Garcia-Bernal D, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 3933.
14. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz IO, de Araujo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araujo G, et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod.* 2017; 43(5): 774-8.
15. 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.
16. Silva EJ, Carvalho NK, Zanon M, Senna PM, G DE-D, Zuolo ML et al. Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1): 1-5.
17. Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a calcium silicate-based endodontic cement (BioRoot RCS): Interactions with human periodontal ligament cells in vitro. *J Endod.* 2015; 41(9): 1469-73.
18. Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F, et al. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2018; 10(2): e120-e6.
19. Alsubait S, Albader S, Alajlan N, Alkhunaini N, Niazy A, Almahdy A. Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate- and epoxy resin-based endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. *Odontology.* 2019; 107(4): 513-20.
20. 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.
21. Milanovic I, Milovanovic P, Antonijevic D, Dzeletovic B, Djuric M, Miletic V. Immediate and long-term porosity of calcium silicate-based sealers. *J Endod.* 2020; 46(4): 515-23.

22. 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.
23. 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).
24. Lucas CP, Viapiana R, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties and dentin bond strength of a tricalcium silicate-based retrograde material. *Braz Dent J*. 2017; 28(1): 51-6.
25. Retana-Lobo C, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Mendes de Souza BD, Reyes-Carmona J. Non-Collagenous dentin protein binding sites control mineral formation during the biomineralisation process in radicular dentin. *Materials (Basel)*. 2020; 13(5):1053.
26. Bailon-Sanchez ME, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antibacterial and anti-biofilm activity of AH plus with chlorhexidine and cetrimide. *J Endod*. 2014; 40(7): 977-81.
27. Liu Y, Guo L, Li Y, Guo X, Wang B, Wu L. In vitro comparison of antimicrobial effectiveness of QMix and other final irrigants in human root canals. *Sci Rep*. 2015; 5(17823).
28. Maria Ferrer-Luque C, Teresa Arias-Moliz M, Ruiz-Linares M, Elena Martinez Garcia M, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Int J Oral Sci*. 2014; 6(1): 46-9.
29. Giardino L, Bidossi A, Del Fabbro M, Savadori P, Maddalone M, Ferrari L, et al. Antimicrobial activity, toxicity and accumulated hard-tissue debris (AHTD) removal efficacy of several chelating agents. *Int Endod J*. 2020; 53(8): 1093-110.
30. Gjorgievska E, Apostolska S, Dimkov A, Nicholson JW, Kaftandzieva A. Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontic sealers. *Dent Mater*. 2013; 29(3): e29-34.
31. 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.
32. 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.
33. Guimaraes BM, Prati C, Duarte MAH, Bramante CM, Gandolfi MG. Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitalcem. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26(e2017115).

34. Razmi H, Aminsobhani M, Bolhari B, Shamshirgar F, Shahsavan S, Shamshiri AR. Calcium enriched mixture and mineral trioxide aggregate activities against *Enterococcus faecalis* in presence of dentin. *Iran Endod J.* 2013; 8(4): 191-6.
35. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, Chavez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate-based sealer, Bio-C Sealer. *J Endod.* 2019; 45(10): 1248-52.
36. Faria-Junior 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.
37. Guerreiro Tanomaru JM, Storto I, Da Silva GF, Bosso R, Costa BC, Bernardi MI, et al. Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dent Mater J.* 2014; 33(4): 466-70.

APÊNDICE A - METODOLOGIA EXPANDIDA

ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Tempo de presa (TP)

A avaliação do tempo de presa (TP) foi realizada de acordo com norma ISO-6876;2012. Foram confeccionados anéis em gesso especial com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura ($n = 6$) e utilizadas as agulhas de Gilmore (massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm). Os anéis de gesso foram armazenados a 37°C e a mais de 95% de umidade relativa por 24h antes do teste. TP (em minutos) foi determinado como o período entre a manipulação e o momento em que a agulha não produziu marcas nos cimentos.

pH

Para avaliação do pH, foram utilizados tubos de polietileno de 10 x 1,6 mm (comprimento x diâmetro) ($n = 10$), os quais foram preenchidos com cada material. Os tubos foram imersos em frascos plásticos contendo 10 mL de água deionizada e mantidos em estufa a 37°C . As mensurações de pH foram realizadas após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias da manipulação dos materiais, usando pHmetro digital (Digimed, SP, Brasil), a temperatura ambiente de 25°C . Após cada mensuração em triplicata, foi calculada a média para cada grupo e período experimental.

Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado segundo (Carvalho-Junior *et al.*, 2007). Foram confeccionados corpos-de-prova medindo 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura ($n=7$). Cada molde foi preenchido com o cimento a ser avaliado e posicionado sobre lamínula de vidro recoberta por uma película de papel celofane. Um fio de nylon impermeável foi colocado no interior do material 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 toquem a superfície do molde uniformemente. O conjunto foi armazenado em estufa com temperatura de 37°C e 95% de umidade até a completa presa do material, um período correspondente a três vezes o tempo de presa. Os corpos-de-prova foram removidos dos moldes, colocados em dessecador a vácuo, e a massa foi mensurada em balança de precisão até obter

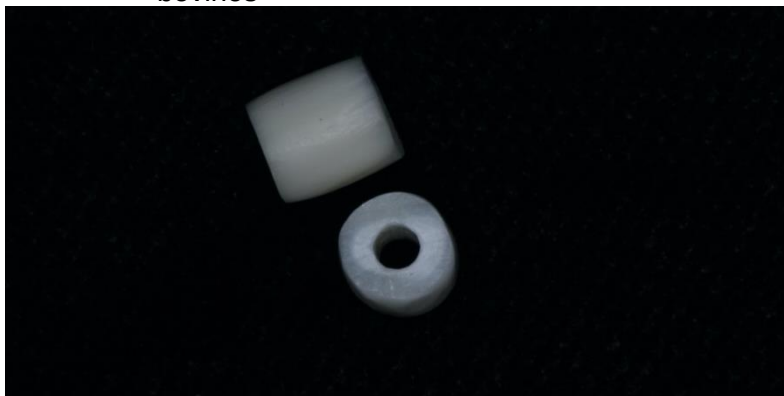
estabilidade da massa inicial (aproximadamente 7 dias) e foram suspensos por meio da fixação dos fios de nylon no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 7,5 ml de água destilada ou PBS, tendo o cuidado de evitar qualquer contato entre o material e a superfície interna do recipiente. Os recipientes permaneceram em estufa a 37°C pelos períodos experimentais, quando os corpos-de-prova foram removidos da água destilada, lavados com água destilada e deionizada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final (aproximadamente 7-14 dias). O teste foi realizado mantendo os corpos-de-prova em água destilada pelo período de 7 dias. A variação de massa foi expressa em porcentagem da massa original.

Análise por Microtomografia Computadorizada (Micro-CT): Alteração volumétrica e porosidade

Preparo e preenchimento dos espécimes (tubos de dentina)

Dentes bovinos extraídos foram empregados no estudo (n=5 no subprojeto 1 e n=7 no subprojeto 2). Exames radiográficos foram realizados para confirmar a ausência de anomalias. As raízes foram seccionadas transversalmente com um disco diamantado (Microdont), obtendo espécimes com 4 mm. Posteriormente, um único operador previamente calibrado realizou o preparo dos canais radiculares utilizando brocas Gates-Glidden número 6 para confecção de tubos cilíndricos com diâmetro interno 1,5 mm e espessura das paredes de aproximadamente 1,5 mm.

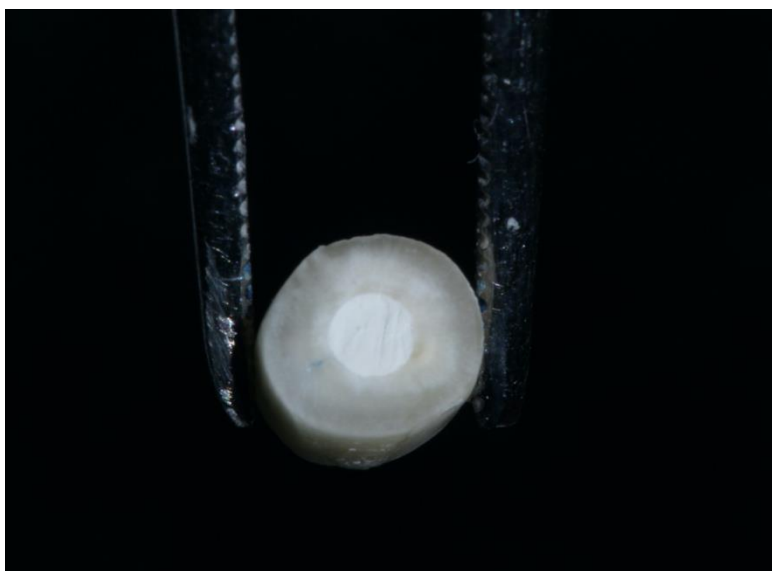
Figura 1 - Tubos cilíndricos de dentina padronizados, confeccionados a partir de dentes bovinos



Fonte: Imagem cedida por Luana Raphael da Silva.

Durante todo o preparo, os canais foram inundados com solução de NaOCl a 1%. A irrigação final foi realizada com 5 mL de NaOCl 2,5% e 5 mL de EDTA 17%, por 3 minutos, seguido de água destilada. Após o preparo, os espécimes foram imersos em água destilada e armazenados em estufa a 37°C por 24 horas. Decorridas as 24 horas, as cavidades foram preenchidas com o material em estudo (n=7) utilizando um kit de condensadores (Ref.: 324501, nºs 2, 3 e 4; Golgran; São Caetano do Sul, SP, Brasil). As amostras foram mantidas em estufa a 37°C e umidade relativa por 3 vezes a duração do tempo de presa.

Figura 2 - Tubo cilíndrico de dentina preenchido com o material

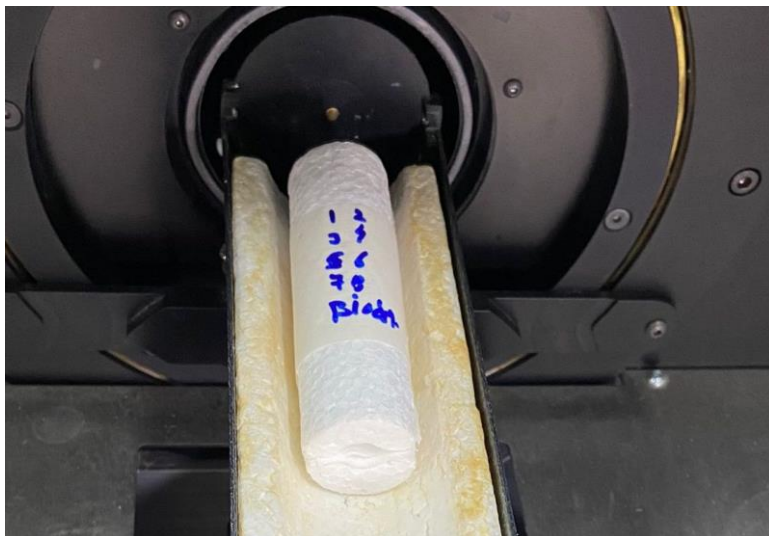


Fonte: Imagem cedida por Luana Raphael da Silva.

Escaneamento dos espécimes, avaliação da alteração volumétrica e porosidade

Após esse período, os espécimes foram submetidos a escaneamento em micro tomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: resolução de 9 µm, frame 4, filtro de cobre e alumínio, rotação 180°, 80 kV e 300 uA.

Figura 3 - Escaneamento em micro tomografia computadorizada (Micro-CT SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica)



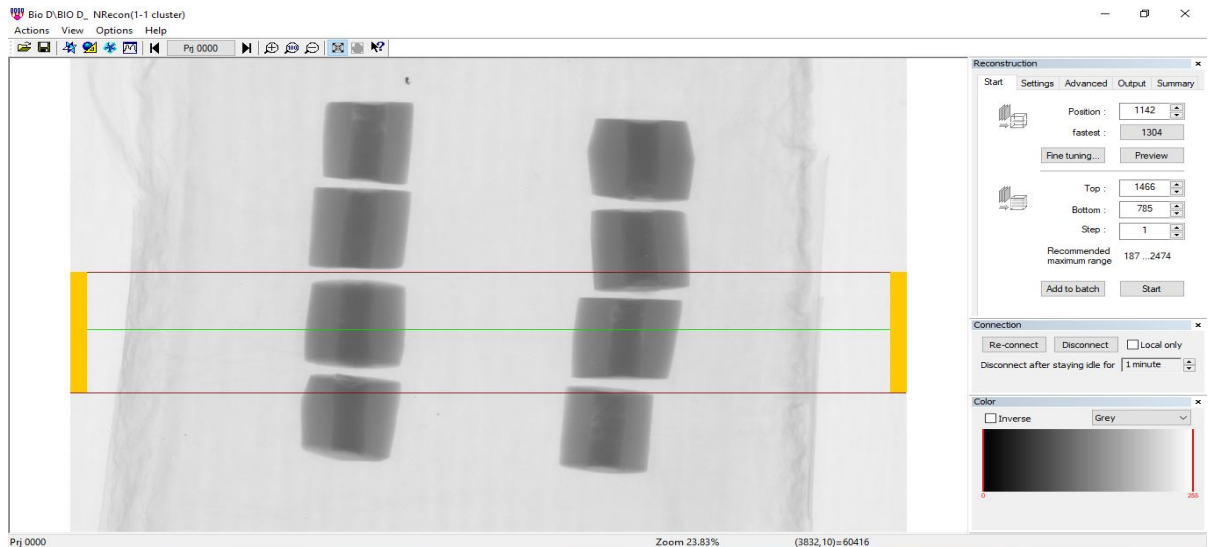
Fonte: Imagem cedida por Luana Raphael da Silva.

Após o escaneamento das cavidades preenchidas pelos materiais, os espécimes foram imersos em PBS (n=7) por 7 e no caso do subprojeto 2, 28 dias e mantidos em estufa a 37°C. Novos escaneamentos foram realizados após o período de imersão. A avaliação da alteração volumétrica dos materiais será realizada pela análise quantitativa das amostras, permitindo o cálculo da diferença no volume total dos materiais, em mm³, antes e após a imersão. A porosidade dos materiais após a presa e a influência da imersão em PBS será quantificada por avaliação dos poros abertos, fechados e da porosidade total do material.

Processamento e análise das imagens

As reconstruções das imagens foram realizadas no programa NRecon (V1.6.4,7; SkyScan, Bélgica), após definição dos parâmetros individuais para o material. Para cada amostra, foram definidos valores de correção de artefatos como regularização de radiação, nitidez e histograma (Figura 1).

Figura 4 - Reconstrução das imagens no software NRecon

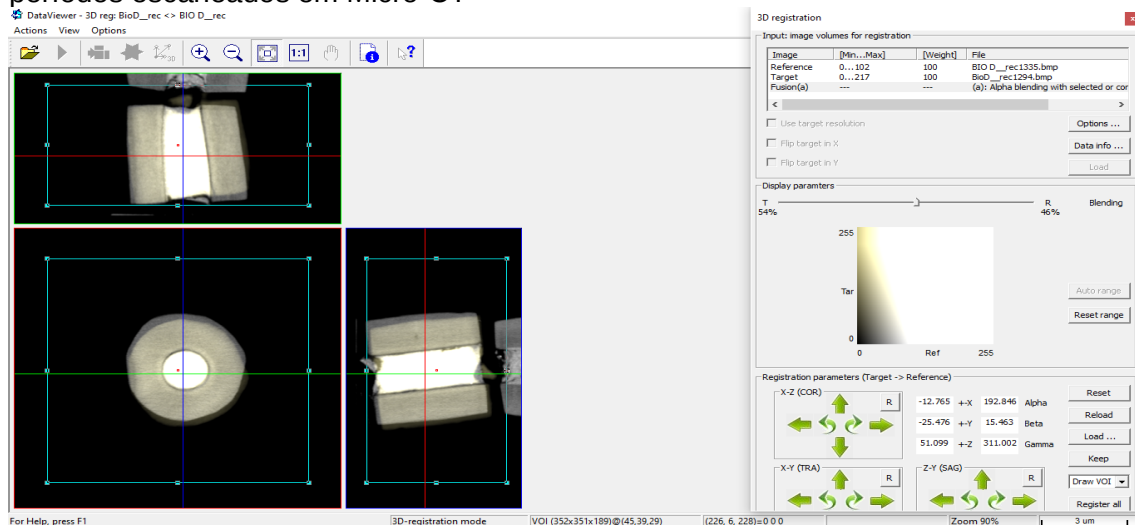


A opção “fine-tuning” para selecionar as ferramentas “beam-hardening artifacts” e “ring-artifacts reduction” para redução de artefatos “smoothing” para melhorar a definição de margens mal definidas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida, o *software* Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica) foi utilizado, a fim de se obter a sobreposição das imagens. Através desses registros, os datasets obtidos puderam ser analisados na mesma posição, permitindo que a mesma região fosse analisada nas diferentes etapas experimentais (Figura 2).

Figura 5 - Sobreposição das imagens no programa Data Viewer, registrando os diferentes períodos escaneados em Micro-CT

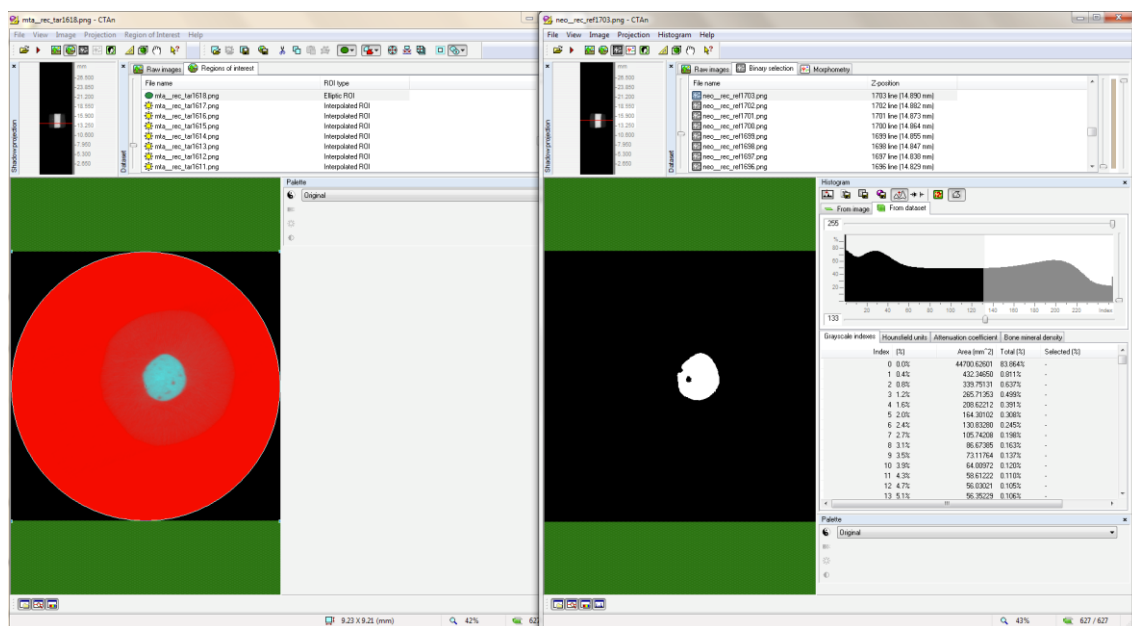


Fonte: Arquivo pessoal.

As imagens registradas foram analisadas quantitativamente no programa CTAn (V1.15.4.0; SkyScan, Bélgica) (Figura 3). Cada espécime foi dividido em duas partes de 2 mm cada para análise da alteração volumétrica e porosidade. No artigo 2, além da análise das duas partes de 2mm englobando as extremidades do espécime, foi realizada a análise de 2mm na parte interna, descartando as extremidades. Assim foi possível avaliar a influência do contato do material com o meio externo (solução de PBS) e o quanto esse contato interfere na alteração de volume do cimento. Para a obtenção do percentual de aumento volumétrico, foi utilizada a seguinte fórmula:

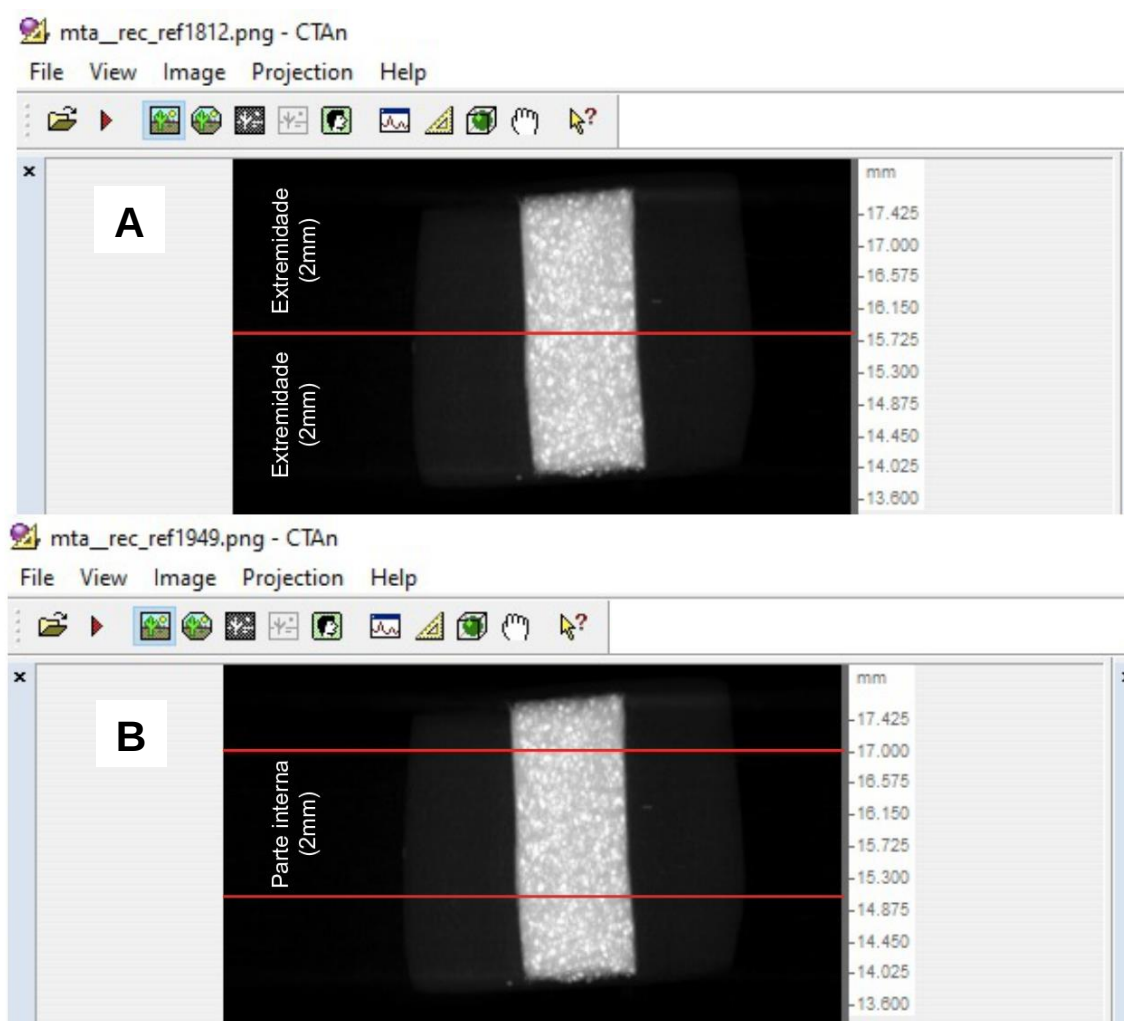
$$\% \text{ aumento volumétrico} = \left[\frac{\text{volume final} \times 100}{\text{volume inicial}} \right] - 100$$

Figura 6 - Imagem representativa das análises de alteração volumétrica e porosidade no software CTAn



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7 - Imagem representativa da divisão da amostra no software CTAn para análise da alteração volumétrica

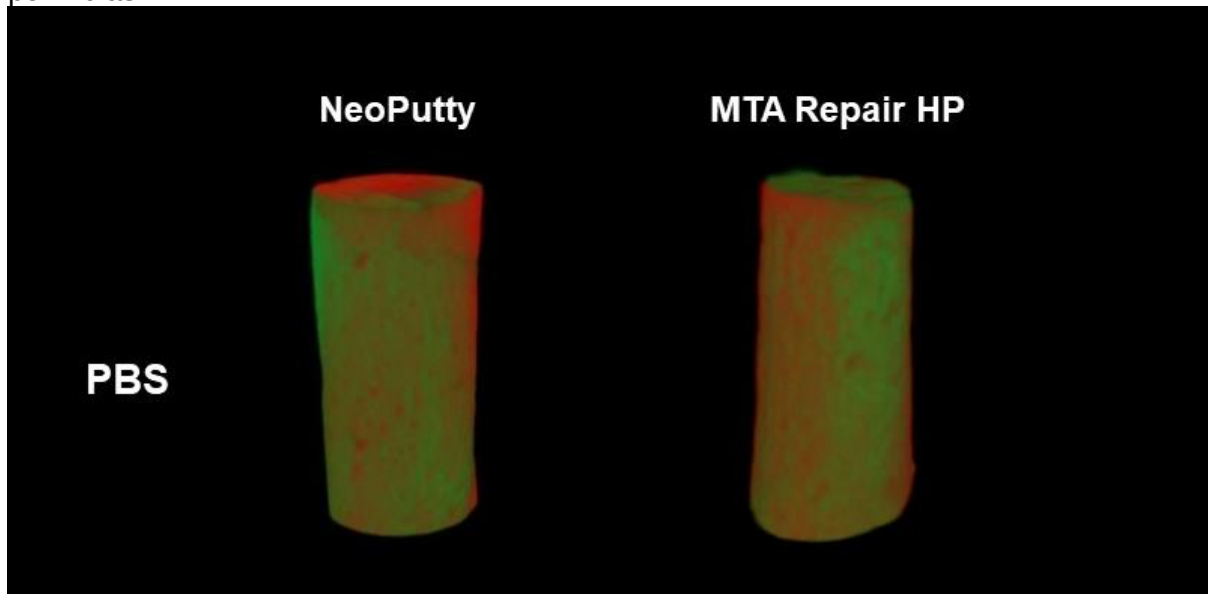


A, Extremidade e B, Parte interna.

Fonte: Arquivo pessoal.

Modelos 3D das cavidades foram obtidos por meio do programa CTVox (V2.3.1.0) com a finalidade de ilustração. Para todas as propriedades a serem avaliadas, foram considerados os valores obtidos após a presa, que foram comparados com o período de 7 dias de imersão em PBS no caso da publicação 1, e 7 e 28 dias no caso da publicação 2.

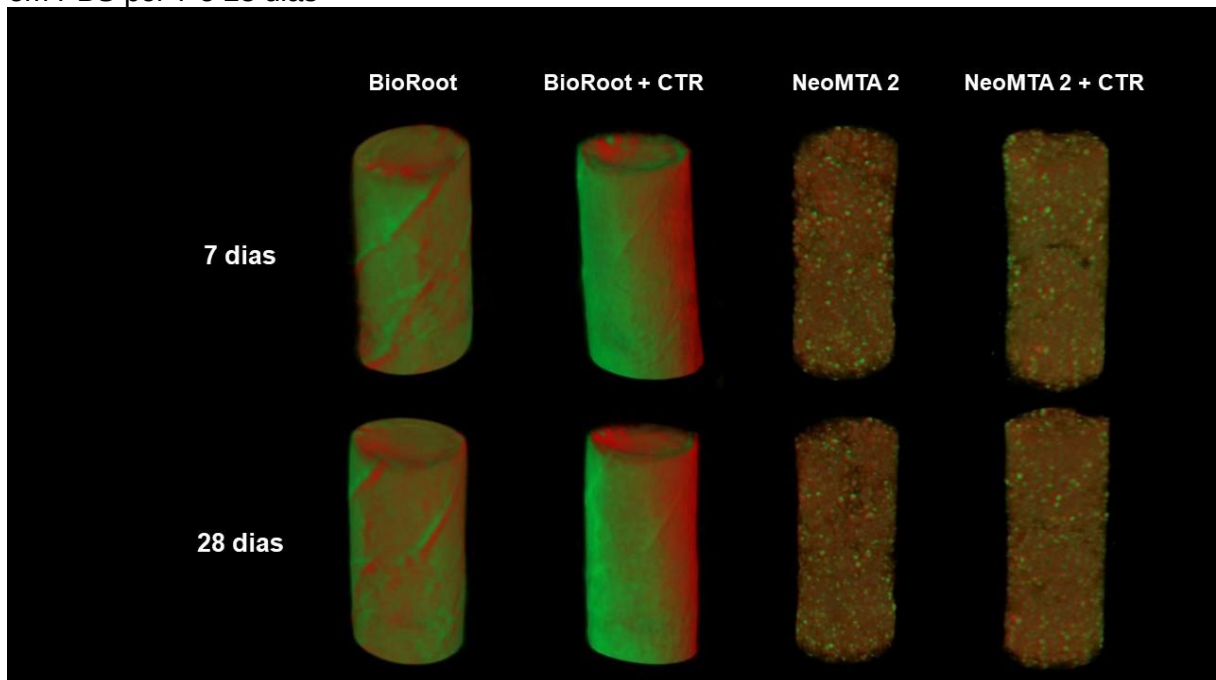
Figura 8 - Reconstruções tridimensionais de micro-CT mostrando sobreposição do volume dos cimentos NeoPutty e MTA Repair HP antes (vermelho) e após (verde) imersão em PBS por 7 dias



Áreas densas em verde indicam ganho de volume, enquanto áreas em vermelho indicam perda de volume.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 9 - Reconstruções tridimensionais de micro-CT mostrando sobreposição do volume dos cimentos BioRoot, NeoMTA 2 e associações, antes (vermelho) e após (verde) imersão em PBS por 7 e 28 dias



Áreas densas em verde indicam ganho de volume, enquanto áreas em vermelho indicam perda de volume.

Fonte: Arquivo pessoal.

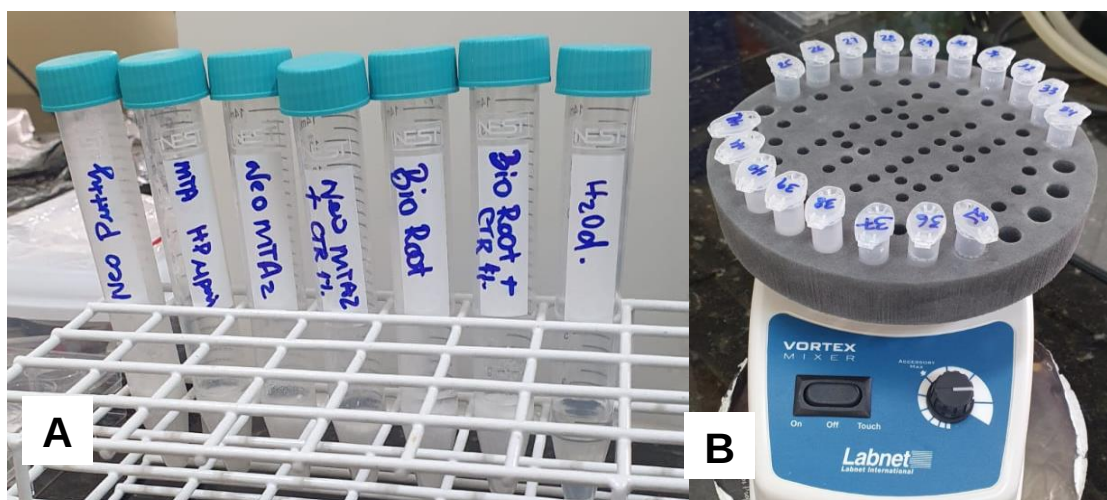
ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Teste de contato direto modificado (TCDM)

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

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

Figura 10 - Imagens do experimento de teste de contato direto modificado



A: Frascos com eluído do cimento fresco (50 mg/mL). B: Tubos de polietileno tipo eppendorf contendo 1mL de solução salina estéril e pérolas de vidro em vórtex.

Fonte: Arquivo pessoal.

Decorrido o tempo de contato, os discos de hidroxiapatita que estavam em contato com o eluído foram removidos e individualmente inseridos em tubos de polietileno tipo eppendorf contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro, que foram agitados em vórtex por 1 minuto, com o propósito de permitir a suspensão dos microrganismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e três alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições, foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura Tryptic Soy agar (TSa). As placas permaneceram incubadas por 48 horas a 37°C, e após este período foi realizada a contagem de UFC/mL e os dados submetidos à transformação logarítmica ($\log_{10}$).

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

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



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

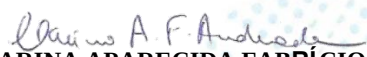


FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *"Efeito do pH, da associação a antimicrobianos e do tratamento de dentina nas propriedades de cimentos endodônticos biocerâmicos reparadores e obturadores"* registrada com o nº **01/2021**, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Juliane Maria Guerreiro Tanomaru** – que envolve a utilização de dentes/ossos bovinos para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 24/02/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril/2022
Espécie/linhagem/raça	Dentes bovinos
Nº de animais	110
Peso/Idade	-
Sexo	-
Origem	Zanchetta Indústria de Alimentos Ltda


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

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

Não autorizo a reprodução deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data da defesa.

Direitos de publicação reservado ao autor

Araraquara, 29 de março de 2022

Giulia Bueno Rodrigues