

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/03/2022.



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



Gabriela Mariana Castro Núñez

**Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais
em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico**

Araraquara

2020



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



Gabriela Mariana Castro Núñez

**Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais
em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
para obtenção do Título de Doutor em Odontologia,
na área de Endodontia

Orientadora:

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

Araraquara

2020

Castro Núñez, Gabriela Mariana

Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico / Gabriela Mariana Castro Núñez-- Araraquara: [s.n.], 2020

97 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Materiais biocompatíveis 2. Propriedades físicas e Químicas 3. Óleos voláteis 4. Biofilmes 5. Candida albicans 6. Enterococcus faecalis 7. Endodontia

I. Título

Gabriela Mariana Castro Núñez

**Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais
em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico**

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

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

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Daniela Leal Zandim-Barcelos

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Denise Madalena Palomari Spolidorio

4º Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan

5º Examinador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

Araraquara, 23 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Gabriela Mariana Castro Núñez

NASCIMENTO	04/12/1989 – Tacna – Tacna – Perú
FILIAÇÃO	José Santos Castro Pavez Jesús Esperanza Núñez de Castro
2008-2012	Graduação em Odontologia Universidad Católica de Santa María - UCSM Arequipa – Peru
2014-2016	Especialização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014-2016	Mestrado em Odontologia – Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2018	Mobilidade de Doutorado Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (UCH)
2016-2020	Doutorado em Odontologia – Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

A Deus,

Por minha vida cheia de amor, pela família, amigos e boas pessoas que colocou no meu caminho para me guiar e acompanhar. Por ter feito que o universo conspire a fim de poder realizar meus sonhos e por me colocar no lugar e momento certos; pela sua presença e fortaleza constante para nunca desistir e dar sempre o melhor de mim.

Aos meus pais José e Esperanza,

Meus primeiros e melhores mestres, guias e exemplos de vida, de pessoa e de profissional, por todos os ensinamentos, teóricos (papi) e práticos (mami); por ter dedicado suas vidas a encher minha vida e a dos meus irmãos de amor e coisas boas, por ter criado 4 pessoas do bem para este mundo, hoje em dia tão difícil. Pela oportunidade e apoio incondicional para conseguir meus objetivos, tanto moral como económico, e porque apesar da distância nunca senti a sua ausência; sem vocês nada disto poderia ser realidade. Por ter-me ensinado que se há que fazer alguma coisa devemos fazê-la o melhor possível, se não é melhor nem fazê-la. E principalmente que “vimos a este mundo para servir e não para ser servidos”. No tengo como agradecerles, ¡los amo!

A Wilo,

Meu amor, amigo, namorado e companheiro mais próximo neste caminho, por teu apoio incondicional, por tua compreensão e palavras para me acalmar e continuar nos momentos mais difíceis, por tua boa disposição sempre para me ajudar, por tua paciência, alegria e companhia; porque foi por você e sua perseverança que viemos em busca de nossos objetivos. Só me resta te agradecer por sempre estar em busca de minha tranquilidade, felicidade e bem-estar, por tua preocupação e dedicação para cuidar de mim. Te amo gordito!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

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

AGRADECIMENTOS

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

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

A todos os Professores da FOAr, em especial aos do programa da Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração: Endodontia, aos Professores Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof.^a Dr.^a Gisele Farias, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, pelos ensinamentos compartilhados e pela boa disposição para ajudar-me e esclarecer dúvidas. Este tempo foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha banca de qualificação de Mestrado, Prof.^a Dr.^a Daniela Leal Zandim-Barcelos e Dr.^a Elissandra Rodrigues, pela análise criteriosa e importantes sugestões atribuídas a este trabalho.

À CNPq, pelo apoio para a realização deste trabalho. Aos funcionários da Seção da Pós-Graduação, Alexandre e Cristiano, que foram muito prestativos sempre.

Ao Consejo Nacional de Ciencia , Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec) a través de sua unidade ejecutora el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt), pelo apoio para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários da FOAr, especialmente a Creusa, pelo carinho e disposição para nos apoiar no necessário, por sempre ser prestativa e ajudar a resolver quaisquer problemas e estar sempre com um sorriso para me atender.

Aos Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Prof. Dr. Edson Alves de Campos, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga e Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi, pela grande amizade que me ofereceram, a confiança e ensinamentos, pelas múltiplas conversas de diversos temas com alguns em espanhol, pelos ensinamentos profissionais e de vida que compartilharam comigo.

Aos colegas da Pós-Endo da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, pelo convívio diário, sorrisos nos corredores e conversas na copa e inspiração por cada uma das suas histórias de vida. A Elisandra Rodrigues, pelo ensinamento e ajuda nos experimentos de célula. A Gisselle Moraima Chávez Andrade, por estar sempre prestes a me ajudar no que precisei, na pesquisa, ensinando desde o começo o funcionamento das coisas e pela boa convivência, por todo o companheirismo especialmente no laboratório de micro e com os experimentos, e por sua ajuda e tempo para corrigir a escrita dos artigos.

A minhas amigas sobreviventes do Mestrado, Kennia, Lauriê e Fernanda, pela convivência e amizade, os momentos de estresse, de alegria, de lazer e principalmente a companhia nos congressos. A Kennia por nossa amizade mais próxima nos atendimentos, nos finais de semana e nas visitas a Jales. A Fer por todo o suporte sempre nos experimentos, sua amizade sincera, e especialmente todo o apoio principalmente no final, ao compartilhar seu conhecimento na escrita dos artigos, pelo seu tempo e carinho para corrigir minhas coisas, e aos seus pais e família pelo apoio e carinho com que sempre nos receberam na sua casa.

Realmente cada um de vocês marcou minha vida e estarão no meu coração sempre!

E a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desta história e contribuíram ao meu desenvolvimento nestes quatro anos de doutorado e seis anos no Brasil.

“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

Castro Núñez GM. Potencial antimicrobiano e biocompatibilidade de óleos essenciais em associação a biomateriais à base de silicato tricálcico [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Os cimentos reparadores endodônticos à base de silicato de cálcio apresentam biocompatibilidade e bioatividade. Porém, sua ação antimicrobiana é limitada. O acréscimo de óleos essenciais pode favorecer as propriedades antimicrobianas de materiais. Os óleos essenciais são substâncias de origem vegetal com propriedades antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antitoxigênica, antiparasitária e inseticida. Este estudo teve como objetivo avaliar a associação de diferentes óleos essenciais nas propriedades físico-químicas, citocompatibilidade, potencial bioativo e atividade antibiofilme dos cimentos reparadores à base de silicato de cálcio, MTA Repair HP (MTA HP) e Biodentine (BIO). **Publicação 1:** avaliou a associação de 1,5% de Farnesol (FAR). **Publicação 2:** analisou o acréscimo de 1% de *Thyme Essential Oil* (TEO). **Publicação 3:** associou 1% de *lemongrass oil* (LEO). As propriedades físico-químicas de tempo de presa, solubilidade após 7 dias de imersão em água destilada e pH em 1, 3, 7, 14 e 21 dias foram avaliadas. A citocompatibilidade foi avaliada por meio dos testes de methyltetrazolium (MTT) e Vermelho Neutro (VN) após exposição das células Saos-2 às diferentes diluições dos eluídos dos materiais por 24h. A bioatividade foi avaliada pela atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Nódulos de mineralização foram também quantificados após 21 dias pela coloração com vermelho de Alizarina (ARS). A capacidade de inibição de Metaloproteinase de Matriz (MMP) 2 e 9 foi mensurada por fluorescência. A capacidade antibiofilme foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (TCDM) sobre biofilme mono- e dual-espécies de *Enterococcus faecalis* e/ou *Candida albicans*, formados em dentina bovina. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey ou Bonferroni, com nível de significância de 5%. Todos os materiais tiveram tempo de presa semelhante e mostraram capacidade de alcalinização do meio em todos os períodos avaliados. BIO mostrou perda de massa puro ou associado ao FAR, TEO e LEO, enquanto que MTAHP ganhou massa com ou sem as associações. Todos os materiais mostraram citocompatibilidade e aumento na atividade de ALP nos períodos avaliados. Os cimentos avaliados foram capazes de induzir a produção de nódulos de mineralização. Os materiais não mostraram atividade anti-MMP-9, no entanto, mostraram inibição de MMP-2. A adição de FAR, TEO e LEO aumentou a capacidade antibiofilme mono e dual-espécie sobre *E. faecalis* e/ou *C. albicans* dos materiais. Conclui-se que a adição de óleos essenciais aos cimentos MTAHP e BIO melhora a atividade antibiofilme, sem alterar significativamente suas propriedades físico-químicas, mantendo a citocompatibilidade e potencial bioativo dos cimentos, e mostrando potencial para maiores estudos para uma futura aplicação clínica.

Palavras chave: Materiais Biocompatíveis. Propriedades Físicas e Químicas. Óleos Voláteis. Biofilmes. *Candida albicans*. *Enterococcus faecalis*. Endodontia.

Castro Núñez GM. Antimicrobial potential and biocompatibility of essential oils in association with biomaterials based on tricalcium silicate [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Calcium silicate-based endodontic repair cements have biocompatibility and bioactivity. However, its antimicrobial action is limited. The addition of essential oils can favor the antimicrobial properties of materials. Essential oils are substances of plant origin with antimicrobial, antiviral, antifungal, antitoxigenic, antiparasitic and insecticide properties. This study aimed to evaluate the association of different essential oils in the physico-chemical properties, cytocompatibility, bioactive potential and antibiofilm activity of calcium silicate-based cements, MTA Repair HP (MTAHP) and Biodentine (BIO). publication 1: evaluated the association of 1.5% of Farnesol (FAR). Publication 2: analyzed the increase of 1% of Thyme Essential Oil (TEO). Publication 3: associated 1% lemongrass oil (LEO). The physicochemical properties of setting time, solubility after 7 days of immersion in distilled water and pH at 1, 3, 7, 14 and 21 days were evaluated. Cytocompatibility was assessed using methyltetrazolium (MTT) and Neutral Red (NR) tests after exposure of Saos-2 cells to different dilutions of the extracts of the materials for 24h. Bioactivity was assessed by the enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP) in the periods of 1, 3 and 7 days. Mineralization nodules were also quantified after 21 days by staining with Alizarin red (ARS). The inhibition capacity of Matrix Metalloproteinase (MMP) 2 and 9 was measured by fluorescence. The antibiofilm activity was assessed by the modified direct contact test (MDCT) on biofilm mono- and dual-species of *Enterococcus faecalis* and/or *Candida albicans*, formed in bovine dentin. The data were submitted to Shapiro-Wilk, ANOVA and Tukey or Bonferroni statistical tests, with a significance level of 5%. All evaluated materials had a similar setting time and showed the ability to alkalize the medium in all periods. BIO showed mass loss when pure or associated with FAR, TEO and LEO, while MTAHP gained mass with or without the associations. All materials showed cytocompatibility and increased ALP activity in the evaluated periods. The evaluated cements were able to induce the production of mineralized nodules. The materials did not show anti-MMP-9 activity, however, they showed inhibition of MMP-2. The addition of FAR, TEO and LEO increased the mono and dual-species antibiofilm activity against *E. faecalis* and / or *C. albicans* of the materials. It is concluded that the addition of essential oils to repair cements, MTAHP and BIO, improves the antibiofilm activity, without significantly altering its physical-chemical properties, maintaining the cytocompatibility and bioactive potential of the cements, and showing potential for clinical application.

Keywords: Biocompatible Materials. Physical and Chemical Properties. Oils, Volatile. Biofilms. *Candida albicans*. *Enterococcus faecalis*. Endodontics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 PUBLICAÇÕES	16
3.1 Publicação 1	16
3.2 Publicação 2	35
3.3 Publicação 3	55
4 DISCUSSÃO	74
5 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A	88

1 INTRODUÇÃO

Biomateriais reparadores estimulam a resposta do tecido pulpar e/ou periodontal^{1,2} e devem apresentar propriedades como capacidade de selamento, resistência à penetração bacteriana, biocompatibilidade e bioatividade^{1,3}. Cimentos reparadores são indicados para selamento de perfurações radiculares, capeamento pulpar, pulpotomias, apexificação, apicigênese e retrobturações³.

Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um cimento à base de silicato de cálcio^{4,5} que apresenta bioatividade, capacidade regenerativa e alto potencial para estimular regeneração óssea⁶. Cimentos de silicato de cálcio imersos em soluções à base de fosfato induzem formação de precipitados de apatita⁷. Biomateriais reparadores podem promover diferenciação osteogênica, formação de nódulos de mineralização de células tronco mesenquimais humanas⁸, células da polpa dentária humana⁹, e células humanas do ligamento periodontal¹⁰.

Óxido de bismuto (Bi_2O_3) usado como radiopacificador no MTA promove redução da liberação de íons cálcio, aumento do tempo de presa e solubilidade, diminuição da estabilidade dimensional e da resistência à compressão¹¹⁻¹⁴. O colágeno presente na matriz orgânica da dentina, reage com o Bi_2O_3 , resultando na alteração da coloração dentária. Desta forma, o uso de radiopacificadores alternativos é indicado para substituir o Bi_2O_3 no MTA¹⁵. Tungstato de cálcio e óxido de zircônio são radiopacificadores que podem ser utilizados com cimentos à base de silicato de cálcio sem alterar as propriedades físico-químicas como pH, liberação de íons cálcio, tempo de presa e solubilidade¹⁶.

O MTA foi modificado para desenvolver um novo cimento, lançado com o nome de MTA Repair HP (MTAHP) (Angelus Industria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil). As alterações ocorreram na composição do pó e do líquido a fim de melhorar características de manuseio e inserção. Assim, o radiopacificador Óxido de Bismuto foi substituído por Tungstato de Cálcio. O líquido apresenta além da água destilada, um agente plastificante, que determina o nome do cimento HP – “*High Plasticity*”. As propriedades físico-químicas e biológicas do MTAHP são consideradas adequadas e semelhantes ao MTA (Angelus)¹⁷⁻¹⁹.

O óxido de zircônio (ZrO_2) tem sido um material de escolha como radiopacificador, por mostrar ser inerte e lixiviado em quantidades mínimas^{4,20-23}. A associação do silicato tricálcico com ZrO_2 libera íons cálcio, formando hidróxido de cálcio quando hidratado com água destilada²⁰. A associação de 30% de ZrO_2 ao cimento Portland proporciona radiopacidade,

resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade semelhantes ao ProRoot MTA²¹. O potencial bioativo do ZrO₂ associado a uma formulação endodôntica de cimento de silicato de cálcio demonstra deposição de cristais de hidroxiapatita²³. Gomes Cornelio et al.²⁴ observaram por meio de teste de apoptose/necrose que células após exposição ao Cimento Portland associado ao ZrO₂ não apresentaram alterações morfológicas.

Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fossés, France) é um biomaterial à base de silicato de cálcio com propriedades mecânicas semelhantes à dentina, que apresenta indicações similares ao MTA²⁵⁻²⁹. Biodentine consiste de um pó e um líquido. O pó contém silicato tricálcico e dicálcico (3CaO SiO₂ e 2CaO SiO₂), carbonato de cálcio e ZrO₂ como radiopacificador. O líquido é constituído por cloreto de cálcio, utilizado como um acelerador de presa e agente redutor de água, em solução aquosa com uma mistura de policarboxilato (agente superplastificante)^{26,28}.

É desejável que os materiais reparadores endodônticos apresentem propriedade antimicrobiana. No entanto, cimentos à base de silicato de cálcio apresentam atividade antimicrobiana limitada³⁰. A fim de melhorar as propriedades antimicrobianas, Biodentine foi associado a substâncias sintéticas como a clorexidina (CLX) e a doxiciclina. Nikhil et al. observaram que a associação do Biodentine à CLX potencializa suas propriedades antimicrobianas contra *C. albicans* e *E. faecalis*, porém a doxiciclina diminuiu seu potencial³¹. O MTA associado à clorexidina potencializou suas propriedades antibacterianas contra as bactérias normalmente encontradas na cavidade bucal, incluindo *E. faecalis*³²⁻³⁴. As associações de MTA a zeólito de prata a 0,2 e 2%, mostraram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *C. Albicans*. No entanto, não foram eficazes contra *P. intermedia* e *A. israelii*³⁵. Embora a adição de CLX a MTA melhore a sua atividade antimicrobiana, esta influenciou negativamente em suas propriedades físico-químicas e biológicas, sendo que a adição de 2% de CLX impediu a presa do MTA³⁶, a substituição de água destilada por CLX 0.12% para a manipulação do MTA provocou maior resposta inflamatória em subcutâneo de rato em 7, 15, 30, 60 e 90 dias³⁷; e MTA com 0.2% de CLX prejudicou a formação da barreira mineralizada quando usada em capeamento pulpar direto em dente de cães³⁸.

Na área da saúde, e especificamente na Odontologia, diversas substâncias antimicrobianas sintéticas e naturais são estudadas, com o intuito de reduzir o uso de antibióticos que promovem aumento da resistência bacteriana. Dentre estas substâncias naturais destacam-se os óleos essenciais (OEs) e seus componentes, que são substâncias voláteis que

protegem as plantas de doenças e ataques de insetos^{39,40}. Os OEs são estudados por sua eficácia e segurança⁴¹.

Farnesol (FAR) é um álcool sesquiterpeno hidrofóbico comumente encontrado em própolis e OEs de frutas cítricas; apresenta ação antibacteriana e antifúngica e não gera resistência bacteriana⁴²⁻⁴⁵. Fernandes et al. concluíram que FAR é capaz de inibir a formação de biofilme simples ou misto de *C. albicans* e/ou *S. mutans*⁴⁶. Possui propriedades antitumoral, antifúngica, antimicrobiana e antibiofilme e não gera resistência bacteriana^{42-45,47}. FAR atua sobre as membranas celulares das bactérias, comprometendo sua integridade e levando à liberação do conteúdo intracelular⁴⁴. Os biofilmes formados na presença de FAR contêm menos biomassa, e mudanças notáveis ocorrem na composição da matriz, além de afetar a estrutura do biofilme, reduzindo a biomassa, matando bactérias nos biofilmes, sem reduzir sua suscetibilidade ao longo das gerações celulares⁴⁴.

O óleo essencial de Tomilho, mais conhecido na literatura por sua sigla TEO - *Thyme Essential Oil*, é composto principalmente por Timol (20%) e Carvacrol (40%). Timol é um monoterpeno^{48,49}. Possui propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas de amplo espectro^{50,51}, assim como ação antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*⁵². Carvacrol é um fenol monoterpênico, que possui propriedades antibacteriana e antiviral⁵³, mostrou efetividade *in-vitro* na prevenção e tratamento de doença periodontal e capacidade de reduzir o crescimento bacteriano na superfície de implantes dentários⁵⁴. Em 2018, TEO foi usado como substituto de eugenol no preparo de pasta endodôntica para obturação de dentes decíduos, e se mostrou mais eficaz contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*⁵⁵.

Lemongrass Essential Oil (LEO) é conhecido no Brasil como óleo de capim-limão, sendo seu nome científico *Cymbopogon citratus*. O principal componente de LEO é Citral, em suas formas cis e trans, mais de 80% da composição do óleo⁵⁶. LEO tem potencial para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de infecções fúngicas e inflamação da pele, por mostrar efeito antifúngico eficaz sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *A. niger*⁵⁷. *C. citratus* mostrou capacidade de inibir o crescimento de *P. gingivalis* e *B. megaterim* (periodontopatógenos), assim como de várias cepas de *Helicobacter pylori*⁵⁸. *C. citratus* também apresentou atividade antimicrobiana contra várias espécies cariogênicas, incluindo *S. mutans* e *L. acidophilus*^{56,58,59}.

Os micro-organismos mais associados aos insucessos endodônticos são *E. faecalis* e *C. albicans*⁶⁰. *E. faecalis* é um patógeno encontrado com maior frequência em casos de infecção secundária ou persistente e em periodontite apical⁶¹⁻⁶⁵. Apresenta a capacidade de invadir

túbulos dentinários mesmo em condições adversas⁶⁶, além de mostrar resistência ao NaOCl, especialmente em baixas concentrações⁶⁷ e ao ambiente altamente alcalino promovido pelo HC. *C. albicans* é encontrada na microbiota do sistema de canais radiculares em dentes com necrose pulpar com ou sem periodontite apical e contribui para sua persistência⁶⁸. Além disso, sua capacidade de invadir túbulos dentinários e a sua resistência à medicação intracanal explica sua associação nos casos de infecções persistentes do canal radicular^{69,70}.

Diante do exposto, este estudo visa avaliar as propriedades físico-químicas e biocompatibilidade, além da atividade antimicrobiana de cimentos reparadores endodônticos à base de silicato de cálcio, em associação às substâncias antimicrobianas naturais.

5 CONCLUSÃO

A adição de OEs, Farnesol, *Thyme Essencial Oil* e *Lemongrass Essencial Oil*, aos cimentos reparadores endodônticos, MTA Repair HP e Biodentine, potencializou a atividade antibiofilme e não prejudicou as propriedades físico-químicas de tempo de presa, solubilidade e pH destes materiais. Além disso, os materiais mantiveram-se citocompatíveis e mostraram potencial bioativo.

REFERÊNCIAS*

1. Garcia L da F, Huck C, Scardueli CR, de Souza Costa CA. Repair of bone defects filled with new calcium aluminate cement (EndoBinder). *J Endod.* 2015; 41(6): 864-70.
2. Yassen GH, Eckert GJ, Platt JA. Effect of intracanal medicaments used in endodontic regeneration procedures on microhardness and chemical structure of dentin. *Restor Dent Endod.* 2015; 40(2): 104-12.
3. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010; 36(2): 190-202.
4. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater.* 2011; 27(8): 836-44.
5. Wu BC, Wei CK, Hsueh NS, Ding SJ. Comparative cell attachment, cytotoxicity and antibacterial activity of radiopaque dicalcium silicate cement and white-coloured mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2015; 48(3): 268-76.
6. Tu MG, Chen YW, Shie MY. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(12): 276.
7. Lai WY, Chen YW, Kao CT, Hsu TT, Huang TH, Shie MY. Human dental pulp cells responses to apatite precipitation from dicalcium silicates. *Materials (Basel).* 2015; 8(7): 4491-504.
8. Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes MH. Osteogenic and angiogenic response to calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2016; 42(1): 113-9.
9. Chang SW, Bae WJ, Yi JK, Lee S, Lee DW, Kum KY et al. Odontoblastic differentiation, inflammatory response, and angiogenic potential of 4 calcium silicate-based cements: Micromega MTA, ProRoot MTA, RetroMTA, and Experimental Calcium Silicate cement. *J Endod.* 2015; 41(9): 1524-9.
10. Chen YW, Hsu TT, Wang K, Shie MY. Preparation of the fast setting and degrading Ca-Si-Mg cement with both odontogenesis and angiogenesis differentiation of human periodontal ligament cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 60: 374-83.
11. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.* 2008; 11(4): 141-3.
12. Camilleri J. Modification of mineral trioxide aggregate. Physical and mechanical properties. *Int Endod J.* 2008; 41(10): 843-9.
13. Camilleri J, Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Dynamic sealing ability of MTA root canal sealer. *Int Endod J.* 2011; 44(1): 9-20.
14. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod.* 2007; 33(3): 295-8.

* 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>

15. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimaraes BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod.* 2014; 40(8): 1235-40.
16. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(3): 394-7.
17. Galarca AD, Da Rosa WLO, Da Silva TM, da Silveira Lima G, Carreno NLV, Pereira TM et al. Physical and biological properties of a High-Plasticity Tricalcium Silicate cement. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 8063262.
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; 26: e2017115.
19. 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.
20. Camilleri J. Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod.* 2014; 40(12): 2030-5.
21. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater.* 2011; 27(9): 879-91.
22. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J.* 2014; 47(5): 437-48.
23. Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM, Hungaro-Duarte MA, Tanomaru-Filho M, Camilleri J. Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dent Mater.* 2014; 30(9): 1005-20.
24. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011; 37(2): 203-10.
25. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(1): 243-9.
26. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012; 45(5): 439-48.
27. Raskin A, Eschrich G, Dejou J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent.* 2012; 14(6): 535-42.
28. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 2012; 91(12): 1166-71.

29. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod.* 2012; 38(9): 1220-6.
30. Poggio C, Beltrami R, Colombo M, Ceci M, Dagna A, Chiesa M. In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. *J Clin Exp Dent.* 2015; 7(5): e584-8.
31. Nikhil V, Madan M, Agarwal C, Suri N. Effect of addition of 2% chlorhexidine or 10% doxycycline on antimicrobial activity of biodentine. *J Conserv Dent.* 2014; 17(3): 271-5.
32. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2004; 30(6): 429-31.
33. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod.* 2007; 33(7): 844-7.
34. Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B et al. The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dent Res J (Isfahan).* 2012; 9(4): 466-71.
35. Odabas ME, Cinar C, Akca G, Araz I, Ulusu T, Yucel H. Short-term antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate with incorporated silver-zeolite. *Dent Traumatol.* 2011; 27(3): 189-94.
36. Jacinto RC, Linhares-Farina G, Sposito Oda S, Zanchi CH, Cenci MS. Influence of 2% chlorhexidine on pH, calcium release and setting time of a resinous MTA-based root-end filling material. *Braz Oral Res.* 2015; 29 doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.
37. Yavari HR, Shahi S, Rahimi S, Shakouie S, Roshangar L, Mesgari Abassi M et al. Connective tissue reaction to white and gray MTA Mixed with distilled water or chlorhexidine in rats. *Iran Endod J.* 2009; 4(1): 25-30.
38. Manochehrifar H, Parirokh M, Kakooei S, Oloomi MM, Asgary S, Eghbal MJ et al. The effect of Mineral Trioxide Aggregate mixed with chlorhexidine as direct pulp capping agent in dogs teeth: a histologic study. *Iran Endod J.* 2016; 11(4): 320-4.
39. Hassan ST, Majerova M, Sudomova M, Berchova K. Antibacterial activity of natural compounds - essential oils. *Ceska Slov Farm.* 2015; 64(6): 243-53.
40. Knezevic P, Aleksic V, Simin N, Svircev E, Petrovic A, Mimica-Dukic N. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Ethnopharmacol.* 2016; 178: 125-36.
41. Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS, Baroudi K. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015; 5(5): 335-40.
42. Brilhante RS, de Lima RA, Marques FJ, Silva NF, Caetano EP, Castelo-Branco Dde S et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol.* 2015; 64(Pt 4): 394-9.

43. Gomes F, Leite B, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol as antibiotics adjuvant in *Staphylococcus epidermidis* control in vitro. *Am J Med Sci*. 2011; 341(3): 191-5.
44. Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Curr Microbiol*. 2011; 63(4): 354-9.
45. Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol*. 2009; 59(2): 118-22.
46. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*. 2016; 32(3): 329-38.
47. Alves FR, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res*. 2013; 27(1): 20-5.
48. Mota ML, Lobo LT, Costa JM, Costa LS, Rocha HA, Rocha e Silva LF et al. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta Med*. 2012; 78(7): 658-64.
49. Sanchez ME, Turina AV, Garcia DA, Nolan MV, Perillo MA. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004; 34(2): 77-86.
50. Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40(3): 349-56.
51. Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol*. 2003; 140(8): 1363-72.
52. de Castro RD, de Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Costa EM, Cavalcanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15: 417.
53. Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(11): 3309-12.
54. Ciandrini E, Campana R, Federici S, Manti A, Battistelli M, Falcieri E et al. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(8): 2001-13.
55. Thosar NR, Chandak M, Bhat M, Basak S. Evaluation of antimicrobial activity of two endodontic sealers: Zinc Oxide with Thyme Oil and Zinc Oxide Eugenol against root canal microorganisms - an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018; 11(2): 79-82.
56. Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res*. 2017; 31: e89.

57. Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med*. 2014; 9(1): 25431.
58. Ocheng F, Bwanga F, Joloba M, Softrata A, Azeem M, Putsep K et al. Essential Oils from Ugandan aromatic medicinal plants: chemical composition and growth inhibitory effects on oral pathogens. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 2015: 230832.
59. Tofino-Rivera A, Ortega-Cuadros M, Galvis-Pareja D, Jimenez-Rios H, Merini LJ, Martinez-Pabon MC. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *J Ethnopharmacol*. 2016; 194: 749-54.
60. Kovac J, Kovac D, Slobodnikova L, Kotulova D. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the dental root canal and periapical infections. *Bratisl Lek Listy*. 2013; 114(12): 716-20.
61. Antunes HS, Rocas IN, Alves FR, Siqueira JF, Jr. Total and specific bacterial levels in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod*. 2015; 41(7): 1037-42.
62. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Lopes WS, Vieira AR, Rocas IN. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod*. 2015; 41(2): 265-73.
63. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spangberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112(6): 825-42.
64. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod*. 2013; 39(5): 712-8.
65. Vera J, Siqueira JF, Jr., Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod*. 2012; 38(8): 1040-52.
66. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J Endod*. 2016; 42(7): 1022-8.
67. Fidalgo TK, Barcelos R, Portela MB, Soares RM, Gleiser R, Silva-Filho FC. Inhibitory activity of root canal irrigants against *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Braz Oral Res*. 2010; 24(4): 406-12.
68. Miranda TT, Vianna CR, Rodrigues L, Rosa CA, Correa A, Jr. Differential proteinase patterns among *Candida albicans* strains isolated from root canal and lingual dorsum: possible roles in periapical disease. *J Endod*. 2015; 41(6): 841-5.
69. Mohammadi Z, Shalavi S. The effect of heat-killed *Candida albicans* and dentin powder on the antibacterial activity of chlorhexidine solution. *Iran Endod J*. 2012; 7(2): 63-7.
70. Turk BT, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(3): 457-62.
71. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater*. 2015; 31(4): 351-70.

72. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin -- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol*. 2006; 101(2): 487-95.
73. Karadaglioglu OI, Ulusoy N, Baser KHC, Hanoglu A, Sik I. Antibacterial activities of herbal toothpastes combined with Essential Oils against *Streptococcus mutans*. *Pathogens*. 2019; 8(1) doi: 10.3390/pathogens8010020.
74. Bunte K, Hensel A, Beikler T. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: a systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia*. 2019; 132: 30-9.
75. Li Y, Jiang X, Hao J, Zhang Y, Huang R. Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Arch Oral Biol*. 2019; 102: 74-82.
76. Shakya VK, Luqman S, Tikku AP, Chandra A, Singh DK. A relative assessment of essential oil of *Chrysopogon zizanioides* and *Matricaria chamomilla* along with calcium hydroxide and chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis* in ex vivo root canal models. *J Conserv Dent*. 2019; 22(1): 34-9.
77. Guandalini Cunha B, Duque C, Sampaio Caiaffa K, Massunari L, Arague Catanoze I, Dos Santos DM et al. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Arch Oral Biol*. 2019; 109: 104577.
78. Alves FR, Neves MA, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2013; 24(3): 224-9.
79. Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Basso Bernardi MI, de Toledo Leonardo R, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Arch Oral Biol*. 2019; 107: 104481.
80. Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Gomes-Cornelio AL, Faria G, Bernardi MIB et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Arch Oral Biol*. 2017; 84: 89-93.
81. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(1): 83-90.
82. 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.
83. Kaup M, Schafer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med*. 2015; 11: 16.
84. 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.
85. International Organization for Standardization Dentistry (ISO). ISO 6876. Root canal sealing materials. London: British Standards Institution; 2012.

86. Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *J Appl Oral Sci.* 2017; 25(4): 374-80.
87. Ochoa-Rodriguez VM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Faria G. Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. *J Appl Oral Sci.* 2019; 27: e20180429.
88. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod.* 2013; 39(10): 1281-6.
89. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set intermediate restorative material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J.* 2013; 46(7): 632-41.
90. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013; 29(5): 580-93.
91. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J.* 2017; 50 Suppl 2: e31-e9.
92. Gomes-Cornelio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2017; 50(1): 39-47.
93. International Organization for Standardization Dentistry. Biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro Cytotoxicity. Geneva: ISO; 2005.
94. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010; 77(1): 4-12.
95. Rodrigues EM, Cornelio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J.* 2017; 50(8): 780-9.
96. Paiva KBS, Granjeiro JM. Matrix Metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 148: 203-303.
97. Boelen GJ, Boute L, d'Hoop J, EzEldeen M, Lambrichts I, Opdenakker G. Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(7): 2823-35.
98. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(1): 86-93.
99. Siqueira Jr. JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34(1): 1-10.
100. Rocas IN, Siqueira Jr. JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.
101. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36(8): 1277-88.

102. Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Cassar G, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ordinola-Zapata R et al. The effect of benzalkonium chloride additions to AH Plus sealer. Antimicrobial, physical and chemical properties. *J Dent.* 2015; 43(7): 846-54.