

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

**Propriedades físico-químicas e antimicrobiana de cimentos endodônticos
experimentais contendo metacrilatos metálicos**

Victoria Burmann da Silva Guimarães

Pelotas, 2019

Victoria Burmann da Silva Guimarães

**Propriedades físico-químicas e antimicrobiana de cimentos endodônticos
experimentais contendo metacrilatos metálicos**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica com ênfase em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Geraldo Pappen

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G963p Guimarães, Victoria Burmann da Silva

Propriedades físico-químicas e antimicrobiana de cimentos endodônticos experimentais contendo metacrilatos metálicos / Victoria Burmann da Silva Guimarães ; Rafael Guerra Lund, orientador ; Fernanda Geraldo Pappen, coorientadora. — Pelotas, 2019.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica - ênfase em Endodontia, Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Endodontia. 2. Obturação do canal radicular. 3. Metacrilatos. 4. Anti-infecciosos. 5. AH plus. I. Lund, Rafael Guerra, orient. II. Pappen, Fernanda Geraldo, coorient. III. Título.

Black : D24

Victoria Burmann da Silva Guimarães

**Propriedades físico-químicas e antimicrobiana de cimentos endodônticos
experimentais contendo metacrilatos metálicos**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica com ênfase em Endodontia..

Data da Defesa: 27 de fevereiro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Orientador), doutor em Odontologia (Área de concentração Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Evandro Piva, doutor em Materiais Dentários pela Universidade Federal de Campinas.

Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo, doutor em Endodontia pela Universidade Federal de São Paulo.

Profa. Dra. Luciane Geanini Pena dos Santos (suplente), doutora em Endodontia pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dra. Katerine Jahnecke Pilownic (suplente), doutora em Odontopediatria pela Universidade Feresal de Pelotas.

Ao meu esposo, Igor, pessoa com quem amo compartilhar meus dias. Contigo tenho me sentido mais viva de verdade. Obrigada pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia. Aos meus pais, por sua capacidade de acreditar em mim e investir em mim.

Agradecimentos

Agradecimento especial ao meu esposo Igor, por ser meu melhor amigo e companheiro. Obrigada por tua dedicação, amor e alegria contagiante. Sem você meus dias seriam tristes. Agradeço por me apoiares e acreditares em todos os momentos em mim, principalmente quando eu mesma estava desistindo. Não existem palavras para descrever o quanto te amo.

Quero agradecer em especial a meus pais Liane e Victor, que me proporcionaram a melhor escola da vida: educação moral, espiritual e lições de vida. Obrigada pelo apoio e ajuda para eu seguir estudando. Não tenho palavras para dizer o quanto me orgulho de vocês. Por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim, muito obrigada. Obrigada, Fernanda, minha irmã querida, por ser tão companheira, por me ajudar em momentos difíceis e até por contribuir neste trabalho.

Agradeço às amigas e colegas Andressa Barboza e Carolina Vieira. Agradeço a todas pela amizade, pelos conselhos e por terem me ajudado tanto neste trabalho, principalmente em momentos que eu não estava presente. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos. Agradeço à bolsista de Iniciação Tecnológica, Larissa Nunes, por toda a ajuda no percorrer deste trabalho.

Agradeço a PPGO pela oportunidade de realizar o mestrado em uma ótima instituição com conceito 6. Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo. Agradeço também a todos os professores, colegas e demais colaboradores do PPGO pela convivência e aprendizado e, principalmente aos amigos que conheci e convivi nesses 2 anos.

Agradeço aos funcionários Lizangela, Josiane, Tatiana e Junior por tudo que fizeram por mim, pela paciência, pela preocupação e pelas palavras carinhosas que me motivavam em muitos dias. A equipe CDC-Bio e Laboratório de Microbiologia.

Agradeço a meu orientador Rafael Lund por me fazerem me sentir uma pessoa de valor, pela confiança e pelas oportunidades. Agradeço pelas inúmeras conversas e conselhos. Agradeço pela paciência, pelos ensinamentos. Vocês me ensinaram muito mais do que teorias. Vocês são exemplos para mim de caráter, honestidade, profissionalismo e de ser humano.

Agradeço à minha co-orientadora Fernanda pelo exemplo de professora e profissional. Agradeço por todos os ensinamentos, oportunidades, disponibilidade e atenção. Agradeço por todas às vezes que me chamavas a atenção, sempre

buscando o meu melhor. O teu incentivo, os teus conselhos, a tua amizade, a tua parceria e a tua confiança em acreditar no meu potencial.

Agradeço aos professores Evandro Piva, Carlos Cuevas, Josué Martos, Adriana Silva, Luciane Geanini, Nadia Ferreira, Anderson Ribeiro, Tiago Collares, Thais Larré, Wellington Rosa e Simone Duarte, também a pós-doutoranda Meibel Lisboa pela ajuda em neste trabalho e em trabalhos paralelos. Vocês também são exemplos de educadores e pesquisadores, e serão sempre minha referência.

Por fim, agradeço ao meu Pai Celeste, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada, pela vida, pela sabedoria e por todas vezes que pedi a Ele tranquilidade e força para seguir em frente.

*“Um dos maiores dons que Deus nos deu é a alegria de
tentar novamente, pois nenhum fracasso precisa ser o último.”*

Thomas Spencer Monson

Resumo

GUIMARÃES, Victoria Burmann da Silva. **Propriedades físico-químicas e antimicrobiana de cimentos endodônticos experimentais contendo metacrilatos metálicos**. 2019. 71 p. Dissertação de Mestrado em Clínica Odontológica com Ênfase em Endodontia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As propriedades dos cimentos endodônticos são importantes na qualidade do preenchimento dos canais radiculares e, posteriormente, no resultado endodôntico. No entanto, nenhum material possui todas as propriedades de um cimento endodôntico ideal, assim novos materiais estão sendo criados para melhorar suas características físico-químicas e biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físicas, químicas, atividade antimicrobiana, e *shelf-life* de um cimento experimental de fotoativação dual após a incorporação de metacrilato de dibutilestanho (Sn^{4+}) (ETs) ou metacrilato de cálcio (Ca^{2+}) (ECs), em concentração de 2%. O AH Plus foi usado como referência comercial. O pH e a liberação de íons foram medidos usando um pHmetro e um espectrômetro de emissão óptica de plasma induzido por microondas. Foi avaliado a estabilidade dimensional após 30 dias de acordo com a ISO 6876. A inibição do crescimento do biofilme foi avaliada por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). A análise da viabilidade do biofilme foi realizada com a técnica SYTO 9. O *shelf-life* foi avaliado através dos testes de grau de conversão e espessura de película nos tempos: imediato, 1 mês e 2 meses. Para a análise estatística, utilizou-se ANOVA e teste post hoc de Tukey, e um nível de significância de 5 %. Todos os cimentos testados apresentaram redução gradual de pH ao longo de 30 dias. O cimento ECs apresentou a maior liberação de cálcio e ETs apresentou a maior liberação de estanho em 30 dias. O cimento ETs demonstrou melhor estabilidade dimensional ao longo do tempo, comparado com outros cimentos endodônticos. ETs revelou melhor potencial antibiofilme após 15 dias em comparação com os controles. O grau de conversão foi reduzido após o final do *shelf-life*. Quanto à espessura de película, todos os materiais estavam de acordo com as especificações da norma ISO 6876, exceto ECs imediato (100 μm) e ETs no primeiro mês de envelhecimento (170 μm). Conclui-se que as propriedades físico-químicas do cimento endodôntico experimental contendo metacrilato de cálcio e dibutilestanho não foram drasticamente alteradas e melhoraram o efeito antibiofilme dos cimentos.

Palavras-chave: endodontia, obturação do canal radicular, metacrilatos, anti-infecciosos, AH plus.

Abstract

GUIMARÃES, Victoria Burmann da Silva. **Novel endodontic sealer based in metals cross-linking methacrylate**. 2019. 71 p. Master's Dissertation in Dental Clinic with Emphasis in Endodontics - Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas.

The properties of endodontic sealers are important for the quality of filling of the root canals and, later, in the endodontic prognosis. However, no material has all the properties of an ideal endodontic sealer, so new materials are being created to improve its physicochemical and biological characteristics. The objective of this study was to evaluate the physical, chemical and antimicrobial properties, and shelf-life of a dual-reactive experimental sealer after the incorporation of dibutyltin methacrylate (Sn^{4+}) (ETs) or calcium methacrylate (Ca^{2+}) (ETs), in a concentration of 2%. AH Plus was used as a commercial reference. The pH and ion release were measured using a pH meter and a microwave induced plasma optical emission spectrometer. The dimensional stability was evaluated after 30 days in accordance with ISO 6876. Inhibition of biofilm growth was evaluated by laser scanning confocal microscopy (CLSM). The biofilm viability analysis was performed using the SYTO 9 technique. The shelf-life was evaluated through tests of degree of conversion and film thickness at the times: immediate, 1 month and 2 months. For statistical analysis, ANOVA and Tukey post hoc test were used, and a significance level of 5%. All sealers tested showed a gradual reduction of pH over 30 days. The ECs sealer showed the highest release of calcium and ETs presented the highest release of tin in 30 days. The ETs sealer showed better dimensional stability over time compared to other endodontic sealers. ETs revealed better antibiofilm potential after 15 days compared to controls. The degree of conversion was reduced after the shelf-life. Regarding film thickness, all materials were in accordance with ISO 6876 specifications, except ECs immediate (100 μm) and ETs in the first month of aging (170 μm). It was concluded that the physicochemical properties of the experimental endodontic sealers containing calcium and dibutyltin methacrylate were not drastically altered and the antibiofilm effect of the cements was improved.

Key-words: endodontics, root canal obturation, methacrylates, antimicrobial agents, AH plus.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de Variância de uma Via
ANSI/ADA	American National Standards Institute/ American Dental Association
Ar	Argônio
BHI	Infusão coração-cérebro
BHT	Hidroxibutil tolueno
Bis-EMA 30	Bisfenol A-glicil Dimetacrilato
C	Carbono
Ca ²⁺	Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior
CEEA	Cômite de Ética em Experimentação Animal
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DHEPT	Dihidroxietil-para-toluidino
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
HCl	Ácido clorídrico
IUPUI	Indiana University – Purdue University Indianapolis
ISO	International Organization for Standardization
L	Comprimento inicial da amostra
L ₃₀	Comprimento após 30 dias
MTA	Agregado trióxido mineral
MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas
MSIS	Nebulização multimodal
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PEG 400	Polietilenoglicol 400
Q10	Constante de coeficiente de reação
r	Envelhecimento acelerado
RT	Temperatura aumentada
Sn ⁴⁺	Estanho
TA	Temperatura ambiente

TEGDMA	Trietilen glicol dimetacrilato
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1	Introdução	15
2	Projeto de Pesquisa	18
2.1	Justificativa	18
2.2	Objetivos	19
2.2.1	Objetivo Geral	19
2.2.2	Objetivos Específicos	19
2.3	Metodologia	19
2.3.1	Formulação e Grupos do Cimento Endodôntico Experimental	19
2.3.2	Avaliação do pH, liberação de Cálcio e Estanho	20
2.3.3	Estabilidade Dimensional	22
2.3.4	Ensaio de Inibição da Formação de Biofilme	23
2.3.5	Processo de Envelhecimento Acelerado Dentro de Câmara Climática	24
2.3.5.1	Grau de Conversão	25
2.3.5.2	Espessura de Película	25
2.3.6	Análise Estatística	26
2.4	Hipótese	26
2.5	Orçamento	27
2.6	Cronograma	28
2.7	Referências	29
3	Relatório do Trabalho de Campo	31
4	Artigo	33
5	Considerações Finais	62
6	Referências	63

1. Introdução

Na terapia endodôntica, a obturação é responsável pelo selamento do sistema de canais radiculares, proporcionando o preenchimento de irregularidades anatômicas e o sepultamento de bactérias que tenham sobrevivido às demais etapas do tratamento (ØRSTAVIK, 2005). Até o momento, no entanto, não foi desenvolvido um material único que preencha todos os requisitos desejáveis para obturação do espaço endodôntico. Idealmente, este material deveria ser radiopaco, bactericida, promover adequado preenchimento e aderência às paredes dos canais radiculares, ser facilmente removido quando necessário, biocompatível, possuir suficiente tempo de trabalho e tempo de presa curto, além de não causar alteração na coloração das estruturas dentárias (GROSSMAN, 1981).

Dentre os cimentos obturadores de canais radiculares mais utilizados na prática clínica, podemos citar os cimentos obturadores à base de resina, cujo uso é amplamente consolidado. Tais materiais apresentam excelentes propriedades como estabilidade dimensional, solubilidade reduzida, selamento apical e potencial de adesão à dentina intracanal (ØRSTAVIK, 2005; VERSIANI et al., 2006; RESENDE et al., 2009; GARRIDO et al., 2010). No entanto, os materiais resinosos não são bioativos e não apresentam propriedades indutoras (BORGES et al., 2012).

Recentemente, um cimento obturador à base de salicilato contendo agregado trióxido mineral (MTA) foi introduzido no mercado e estudos relacionados às propriedades deste material, tem demonstrado que este cimento apresentou atividade antibacteriana (MORGENTAL et al., 2011), além de biocompatibilidade aceitável e capacidade de estimular mineralização de tecidos duros (GOMES-FILHO et al., 2012). No entanto, em outros estudos tal cimento demonstrou severos efeitos citotóxicos (GUVEN et al., 2013), sendo sua capacidade de selamento e adesão às paredes dentinárias bastante variável (GANDOLFI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Estas propriedades biológicas não tão satisfatórias provavelmente se devem à adição de resinas na formulação do material (GUVEN et al., 2013; TASDEMIR et al., 2014).

Ainda, atualmente tem se dado amplo destaque aos materiais biocerâmicos. Na endodontia, cimentos endodônticos produzidos a partir de materiais biocerâmicos estão sendo comercializados, incluindo o iRoot SP (Innovative Bioceramix Inc, Vancouver, BC, Canadá) e o EndoSequence BC (Brasseler USA, Savannah, GA,

EUA). Os mesmos têm como base: silicato de cálcio, óxido de zircônia, fosfato de cálcio monofásico, hidróxido de cálcio e agentes espessantes. Estes cimentos são normalmente descritos como cimentos injetáveis, pré-misturados, prontos para uso, livres de alumínio, radiopacos e insolúveis (ZHANG, LI, PENG 2009), também apresentando atividade antibacteriana e citocompatibilidade (ZHANG et al., 2009; ZHANG, LI, PENG 2010). Estudos têm demonstrado ainda, que os materiais biocerâmicos apresentam boa capacidade de selamento (ZHANG, LI, PENG 2009) e boa adesão às paredes de dentina do canal radicular (ERSAHAN, AYDIN 2000; NAGAS et al., 2012).

A contínua investigação de novas formulações com o intuito de se obter um cimento que reúna propriedades físico-químicas e biológicas adequadas a um material obturador se faz necessária. Os acrilatos e metacrilatos são compostos produzidos em grandes quantidades, em diversos tipos de indústrias, como as de colas e adesivos, produtos medicinais e odontológicos (ATTRAMADAL & SVATUN, 1984; SVATUN, 1978; SVATUN & ATTRAMADAL, 1978). Estudos preliminares mostraram boa adesividade com a dentina e com a guta-percha, além de resultados favoráveis quanto à citotoxicidade (GRUBBS et al., 2000; HASCHKE, 2004; SHIPPER et al., 2004; TAY et al., 2005). Os metacrilatos metálicos, quando adicionados a elastômeros, aumentam suas propriedades mecânicas, se comportando como redes poliméricas interpenetrantes (SAMUI et al., 2005). Os metacrilatos apresentam diversas composições, dentre elas temos o metacrilato de cálcio e o metacrilato de dibutilestanho.

Também partículas de metais nobres têm chamado à atenção devido às suas propriedades físico-químicas, óticas e antibacterianas. Metacrilatos metálicos como prata, zinco e estanho têm sido estudados. Estudos *in vivo* (ATTRAMADAL e SVATUN, 1984) e *in vitro* (SVATUN, 1978; SVATUN e ATTRAMADAL, 1978) mostram que soluções e dentifrícios contendo estanho inibem a formação da placa dental e reduzem a produção de ácidos, provavelmente produzidos por *Streptococcus mutans*. Os íons metálicos, em geral, têm como mecanismo de ação perturbar o sistema respiratório e de transporte de elétrons em células bacterianas. Além disso, são considerados seguros por que não serem absorvidos pelo corpo (BARRY, TROGOLO e PASTECKL, 2001).

A incorporação de íons metálicos em polímeros não só afeta suas características físicas, como resistência, mas também suas ligações químicas.

Cloreto de estanho e fluoreto de estanho são referidos como tendo efeito bacteriostático sobre microrganismos orais (YOST, 1978). Já os íons cálcio são necessários para a diferenciação e mineralização de células pulpares (TAKITA et al., 2006).

É imperativo que os materiais endodônticos tenham boa biocompatibilidade para mostrar potencial bioativo. O mecanismo de estimulação do reparo por deposição de tecido mineralizado depende do pH do meio e da capacidade de liberação de Ca^{2+} . Os metacrilatos de cálcio podem liberar íons cálcio, os quais tem papel importante no reparo, além de serem um polímero estável, desta forma ajudando no reparo periapical somente pelo contato (REZENDE et al., 2016). Além disto, o reparo endodôntico é melhorado quando se tem boa vedação biológica e a redução ou eliminação dos microrganismos e seus produtos do sistema radicular (ZHANG, LI & PENG, 2009; ALSHWAIMI et al., 2016).

Recentemente, Rossato et al. (2017), desenvolveram um cimento endodôntico experimental com adição de metacrilato de cálcio e metacrilato de estanho, constatando o aumento da atividade da ação antimicrobiana desse cimento sobre uma cepa de *E. faecalis*, e citotoxicidade moderada quando comparada a um controle comercial (Resilon/RealSeal® (RS – SybronEndo, CA, EUA).

Neste contexto, a partir dos resultados obtidos por Rossato et al. (2017), o presente estudo avaliou o pH, a liberação de íons estanho e cálcio, e a ação antimicrobiana, através de ensaios *in vitro* de biofilme de um cimento endodôntico experimental, com a incorporação de diferentes concentrações de monômeros metacrilatos metálicos de cálcio ou de dibutilestanho. Ainda, se procurou validar um protocolo de envelhecimento acelerado com o intuito de determinar o *shelf-life* e o prazo de validade destes cimentos, monitorando a estabilidade de suas propriedades ao longo do tempo.

2 Projeto de Pesquisa

2.1 Justificativa

Estudos preliminares mostraram boa adesividade dos metacrilatos com a dentina e com a guta-percha, além de resultados favoráveis quanto à citotoxicidade (TAY *et al.*, 2005; HIRAISHI *et al.*, 2006). Os metacrilatos metálicos, quando adicionados a elastômeros, aumentam suas propriedades mecânicas, se comportando como redes poliméricas interpenetrantes (SAMUI *et al.*, 2006). Os metacrilatos apresentam diversas composições, dentre elas o metacrilato de cálcio e o metacrilato de dibutilestanho. A incorporação de íons metálicos em polímeros não só afeta suas características físicas, como resistência, mas também suas ligações químicas.

É imperativo que os materiais endodônticos tenham boa biocompatibilidade para mostrar potencial bioativo. O mecanismo de estimulação do reparo por deposição de tecido mineralizado depende do pH do meio e da capacidade de liberação de Ca^{2+} . Os metacrilatos de cálcio podem liberar íons cálcio, os quais tem papel importante no reparo, além de serem um polímero estável, desta forma ajudando no reparo periapical somente pelo contato (REZENDE *et al.*, 2016).

Recentemente, Rossato et al. (2017) desenvolveram um cimento endodôntico experimental com adição de metacrilato de cálcio e metacrilato de estanho, constatando o aumento da atividade da ação antimicrobiana desse cimento sobre uma cepa de *E. faecalis*, e citocompatibilidade moderada quando comparada a um controle comercial (Resilon/RealSeal® (RS – SybronEndo, CA, EUA).

Neste contexto, a partir dos resultados obtidos por Rossato et al. (2017), o presente estudo avaliou o pH, a liberação de íons estanho e cálcio, e a ação antimicrobiana, através de ensaios *in vitro* de biofilme de um cimento endodôntico experimental, com a incorporação de diferentes concentrações de monômeros metacrilatos metálicos de cálcio ou de dibutilestanho. Ainda, se procurou validar um protocolo de envelhecimento acelerado com o intuito de determinar o *shelf-life* e o prazo de validade destes cimentos, monitorando a estabilidade de suas propriedades ao longo do tempo.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar a atividade antimicrobiana e a liberação de íons de cimentos endodônticos experimentais contendo monômeros metacrilatos metálicos (Ca^{2+} e Sn^{4+}), e realizar um processo de envelhecimento acelerado com fim de determinar o shelf-life e o prazo de validade destes materiais, monitorando a estabilidade de diversas propriedades deles ao longo do tempo.

2.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a liberação de íons cálcio e estanho e o pH do meio dos cimentos nas horas iniciais e dias subsequentes;
- 2) Avaliar a distribuição de bactérias vivas e mortas através de ensaios *in vitro* de inibição da formação de biofilme de cimentos experimentais contendo metacrilato de cálcio e dibutilestanho;
- 3) Execução de protocolo de envelhecimento acelerado dentro de estufa com temperatura controlada, com a realização de teste de grau de conversão e espessura de película nos tempos experimentais (imediato, 1 mês e 2 meses);
- 4) Avaliação da alteração dimensional dos cimentos endodônticos após 30 dias armazenados.

2.3 Metodologia

2.3.1 Formulação e delineamento dos grupos do cimento endodôntico experimental

As composições das pastas base e catalisadora dos materiais experimentais estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos cimentos avaliados

Cimento Endodôntico	Composição	
	Pasta Base	Pasta Catalisadora
Cimento Endodôntico Experimental (E)	Bis-EMA30, Exotano 8, dimetacrilato PEG 400 $\alpha=25$, TEGDMA, canforoquinona, DHEPT, sílica não silanizada e itérbio	Bis-EMA 30, Exotano 8, TEGDMA, sulfínico, peróxido de benzoila, BHT, sílica não silanizada e itérbio
E + Metacrilato de Cálcio	Experimental + metacrilato de cálcio em 2%	
E + Metacrilato de Dibutilestanho	Experimental + metacrilato de dibutilestanho em 2%	
	Pasta A	Pasta B
AHPlus	Resina Epóxi de Bisfenol-A; Resina Epóxi de Bisfenol-F; Tungstato de cálcio; Óxido de zircônio; Sílica e Óxido de ferro.	Amina Adamantada; N, N" -Dibenzil-5-oxanonane-diamina-1,9; TCD -Diamina; Tungstato de cálcio; Óxido de zircônio; Sílica e Óleo desilicone.

Em todos os ensaios se utilizará como controle comercial o padrão-ouro, um cimento à base de resina epóxica, comercialmente chamado AHPlus.

2.3.2 Avaliação do pH, Liberação de Cálcio e Estanho

Os cimentos serão preparados e inseridos em tubos de polietileno oriundos de um catéter (1 mm de diâmetro interno, 10 mm de comprimento) com apenas uma extremidade aberta com o auxílio de um instrumento Lentulo tamanho #25 (Dentsply Maillefer, Petrópolis, RJ, Brasil), com movimentos de entrada e saída da mesma. O fechamento de uma extremidade será realizado com a ajuda de um condensador de

Paiva. Após o preenchimento, os tubos serão pesados para verificar a padronização da quantidade em cada tubo. Cinco espécimes de cada material serão preparados. Cada espécime será imediatamente imerso em um Falcon contendo 10 mL de água deionizada e incubado a 37°C durante todo o estudo. Antes da imersão dos espécimes, serão verificadas as concentrações de pH e íons da água deionizada (atestando um pH=6,99). As leituras de pH e íons serão realizadas novamente após 3h, 24h, 7, 15 e 30 dias de armazenamento. Após cada medição, os espécimes serão cuidadosamente movidos para novos tubos com água deionizada fresca. As leituras de pH do eluato serão realizadas com um pHmêtro calibrado (Q400A; Quimis, Diadema, SP, Brasil).

A liberação de íons Ca^{2+} e Sn^{4+} nas amostras serão medidas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES) modelo MP AES 4200 da Agilent Technologies (Melbourne, Austrália), equipado com o sistema de nebulização convencional para introdução da amostra no plasma para determinação de Ca^{2+} , e nebulização multimodal (MSIS) com geração química de vapor utilizando $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ para a determinação de Sn^{4+} . O nebulizador será do tipo OneNeb inerte. Os gases utilizados para a geração do plasma serão o nitrogênio obtido a partir do ar atmosférico comprimido, gerado a partir de um gerador de nitrogênio da Agilent 4107 (Melbourne, Austrália), operando numa vazão de gás de 20 L min⁻¹ e vazão de gás para nebulização de 1,5 L min⁻¹. Para proteção pré-óptica será utilizado um fluxo de ar comprimido de 25 L min⁻¹. Ainda para a ignição do plasma será utilizado um pequeno fluxo de gás Argônio (Ar) com pureza de 99,996% (Linde, Barueri, SP). Os sinais de fundo serão corrigidos de forma automática por meio de subtração entre espectros do branco e das amostras. As condições operacionais utilizadas para a determinação dos analitos estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Condições gerais de funcionamento durante as análises por MIP OES

Parâmetros do Instrumento	Condições de operação
Tempo de leitura (s)	3
Quantidade de replicatas	3
Tempo de estabilização (s)	15
Correção de sinal de fundo	Automático

Tabela 3. Condições operacionais para determinação dos analitos por MIP OES

Analito	Comprimento de onda (nm)	Posição de visualização (nm)	Vazão do nebulizador (L min ⁻¹)
Nebulização convencional			
Ca ²⁺	393,366	10	0,6
Nebulização multimodal (MSIS)			
Sn ⁴⁺	317,505	0	0,8

As soluções padrão das curvas de calibração serão preparadas a partir de uma solução monoelementar de cada analito (10.000 mg L⁻¹ de Ca²⁺) e (1001 mg L⁻¹ de Sn⁴⁺). As curvas analíticas serão obtidas numa faixa linear de 0,5 à 5,0 mg L⁻¹ de Ca²⁺ no sistema de nebulização convencional, e para o Sn⁴⁺ de 10 à 250 µg L⁻¹ no sistema de nebulização multimodal por geração química de vapor, utilizando NaBH₄ como agente redutor (0,5% NaBH₄ e 0,5% NaOH (m/v)), e 2% de HCl (v/v).

2.3.3 Estabilidade Dimensional

A estabilidade dimensional dos cimentos endodônticos será avaliada de acordo com o método descrito por Carvalho-Junior *et al.* (2007). Seis amostras cilíndricas (6 mm de altura x 4 mm de diâmetro) serão fabricadas usando uma matriz metálica. Depois de retirar as amostras do molde, as superfícies planas de cada amostra serão polidas com uma lixa úmida de granulação 600 e seu comprimento e diâmetro inicial será medido com um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda., Santo Amaro, São Paulo, Brasil). Depois os cilindros serão armazenados em frascos contendo água destilada a 37°C por 30 dias. Após o tempo de armazenamento, os espécimes serão retirados dos frascos, secos, e seus

comprimentos e diâmetros finais serão medidos. A porcentagem de mudança dimensional será calculada da seguinte forma:

$$[(L_{30} - L)/L] \times 100$$

onde L é o comprimento inicial da amostra e L₃₀, o comprimento após 30 dias.

2.3.4 Ensaio de inibição da Formação de Biofilme

Para o ensaio antimicrobiano, os cimentos serão manipulados e colocados em moldes de plástico com 10 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura e os espécimes armazenados à temperatura ambiente durante 48h. Os discos serão esterilizados por luz ultravioleta em uma camada de fluxo laminar (Bio Seg 12, Grupo Veco, Barão Geraldo Campinas, SP - Brasil) durante 30min em cada face dos espécimes (GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2013). Serão utilizados discos de hidroxiapatita estéril com as mesmas dimensões como substrato para crescimento de biofilme no grupo de controle positivo. (SHEN *et al.* 2009).

Uma amostra de biofilme subgengival será colhida de um voluntário adulto saudável e suspensa em caldo de infusão coração-cérebro (BHI, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA). Os discos serão incubados em suspensões de placas de cultura de BHI-24 poços sob condições anaeróbicas utilizando saco anaeróbico e indicador anaeróbio (AnaeroGen, OXOID, Hampshire, UK) a 37°C. Cada poço deve conter 1,5 mL de caldo BHI estéril e 0,5 mL de inóculo, em que os espécimes serão mantidos submersos. A densidade celular será ajustada em um espectrofotômetro a 405nm (Sp22-325 a 1000nm, Biospectro, Curitiba, PR, Brasil) até uma densidade de aproximadamente $7,5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias por mililitro em caldo BHI. O meio BHI será substituído uma vez por semana sem adição de novos microorganismos (SHEN *et al.* 2009). Após os períodos de crescimento de 3, 15 e 30 dias, serão analisados 45 discos (n=3 por grupo e por período de incubação) para biofilme e proporção de bactérias vivas e mortas por coloração de viabilidade e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).

A análise da viabilidade do biofilme será realizada utilizando a técnica SYTO 9 - iodeto de propídio (Live/Dead BacLight Kit, Invitrogen, Eugene, OR, EUA). SYTO 9 é uma mancha fluorescente verde que rotula os microorganismos vivos e mortos. O iodeto de propídio é uma mancha de ácido nucleico fluorescente vermelha que só

penetra células com membranas danificadas (células mortas). Primeiramente, as amostras serão limpas com 2 mL de solução salina e, em seguida, 0,25 µL de corante será colocado sobre o biofilme. Será utilizado um CLSM (Leica Microsystems, Nussloch GmbH 2019, USA) para visualizar as amostras (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2012). Os respectivos comprimentos de onda de absorção e emissão serão 494/518nm para SYTO 9 e 536/617nm para iodeto de propídio. O biofilme será avaliado aleatoriamente em uma ampliação de 100x. Em seguida, serão obtidas cinco pilhas confocais de diferentes áreas aleatórias de cada amostra com lente de 10x e com formato de 512x512 pixels. Para cada grupo será obtido um total de 25 pilhas (5 campos operacionais×5 espécimes por grupo). O avaliador será cegado para os grupos experimentais. Todas as imagens serão analisadas usando o software LAS X 3D Analysis (Leica Microsystems, Nussloch GmbH 2019, USA) para o biovolume total (µm³), o número total de células vivas (verde) e o percentual de células vivas (DE PAZ, 2009).

2.3.5 Processo de Envelhecimento Acelerado Dentro de Câmara Climática

Os materiais serão submetidos a um protocolo de armazenamento acelerado para as metodologias de grau de conversão e cinética de polimerização e espessura de película, de acordo com o modelo de Arrhenius (CLARK, 1991):

$$r = Q10^{((RT-TA)/10)}$$

Onde: r é o envelhecimento acelerado, TA é a temperatura ambiente, RT é a temperatura aumentada, e Q10 é a constante de coeficiente de reação.

O modelo de envelhecimento será feito em uma estufa com temperatura controlada a 40°C por um período de 2 meses. O envelhecimento acelerado será dentro de câmara climática (MA 835/UR, Marconi, Piracicaba, Brasil) com temperatura controlada e umidade relativa de 75%. De acordo com o modelo de Arrhenius, estas condições, quando mantidas por 6 meses, equivalem a um período de armazenagem de 18 meses a temperatura ambiente.

Segundo este modelo, as propriedades químico-mecânicas do material, como grau de conversão e espessura de película serão monitoradas em 3 tempos diferentes: 0, 1, 2 meses, os quais serão equivalentes aos períodos previamente determinados para a avaliação em tempo real. Os produtos não serão armazenados

em dessecador com a finalidade de avaliar a influência da umidade nas propriedades químico-mecânicas do material.

2.3.5.1 Grau de Conversão

A cinética de polimerização será determinada utilizando espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier, com uma unidade de refletância total atenuada acoplada ao sistema (RT-FTIR Shimadzu Prestige 21 Spectrometer, Shimadzu, Japão). Quantidades padronizadas de cada material serão dispensadas sobre o cristal e prévio à fotoativação, um espectro será obtido. Posteriormente, a superfície do material será coberta com uma tira de matriz de poliéster através da qual será feita a fotoativação com unidade LED de irradiância $>1.000 \text{ mW/cm}^2$ (Radian® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Australia). As amostras serão fotoativadas por 40 s. A cinética de polimerização será determinada utilizando o software IRSolution, utilizando a apodização de Happ-Genzel, em uma faixa espectral entre 1690 e 1575 cm^{-1} . O grau de conversão, por segundo será determinado pela razão da intensidade da absorbância observadas do C=C alifático (altura do pico em 1638 cm^{-1}) contra a intensidade de absorbância da ligação carboxila (1710 cm^{-1}) utilizada como padrão interno. Cada teste será feito em triplicata.

2.3.5.2 Espessura de Película

Será necessário para realização do ensaio de espessura de película duas placas de vidro quadradas, com espessura de 5 mm e área de contato de aproximadamente $(200 \pm 10) \text{ mm}^2$; dispositivo de carga de $(150 \pm 3) \text{ N}$ e micrômetro com acurácia de $1 \text{ }\mu\text{m}$. Serão feitas três vezes para cada material ($n=3$). O cimento será manipulado e 5 mL serão dispensados no centro da placa de vidro. Após a colocação do cimento sobre a placa, este será recoberto com outra placa com as mesmas dimensões. Após $(180 \pm 10) \text{ s}$ do início da mistura do cimento, se aplicará uma carga de $(150 \pm 3) \text{ N}$ sobre a placa superior.

Verificando-se que o cimento recobriu toda a placa, após 10 minutos do início da manipulação, se medirá a espessura do conjunto formado pelas duas placas e o filme de cimento por meio de um micrômetro com acurácia de $1 \text{ }\mu\text{m}$. A espessura de cimento será definida pela diferença de espessura das placas com e sem o cimento.

Serão feitas três repetições. A ISO 6876 (2001) exige uma espessura de filme não superior a 50µm.

2.3.6 Análise Estatística

Os dados estatísticos serão analisados estatisticamente por Análise de Variância de uma via (ANOVA) e teste post hoc de Tukey utilizando SPSS software 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) para os dados de biofilme.

A análise estatística do restante dos dados será realizada utilizando o software Sigma Plot 12.0 Os dados serão analisados para verificar a distribuição normal e a homogeneidade da variância. Análise ANOVA de duas vias seguida por um teste complementar de Tukey será feita para avaliar cada uma das variáveis dependentes. O nível de significância para todos os testes será $p < 0,05$.

2.4 Hipótese

A incorporação de monômeros metacrilatos metálicos em um cimento endodôntico experimental não conferirá propriedades de liberação de íons cálcio e estanho, não conferirá atividade antimicrobiana contra biofilme de multiespécies, e que o processo de envelhecimento irá alterar suas propriedades físico-químicas.

2.5 Orçamento

Descrição	Custo unitário (R\$)	Quantidade	Custo total (R\$)
Bis-EMA	350,00	1	350,00
TEGDMA	210,00	1	210,00
PEG 400	180,00	1	180,00
Exotano 8	1.938,23	1	1.928,23
Metacrilato de Cálcio	280,00	1	280,00
Metacrilato de dibutilestanho	280,00	1	280,00
Canforoquinona	410,00	1	410,00
Placa de 24-poços	12,71	12	152,52
Tubos Falcon	0,36	100	36,00
Kit Live/Dead BacLight	2.340,00	1	2.340,00
Caldo BHI	283,57	2	567,14
AHPlus	300,00	2	600,00
Lixas para desgaste	1,00	4	4,00
Luvas para procedimento	18,00	2	36,00
Máscaras	10,00	1	10,00
Gorro	10,00	1	10,00
Papel alumínio	7,00	1	7,00
Despesas com impressão	400,00	-	400,00
Gastos com apresentação em congressos	2.800,00	-	2.800,00
TOTAL	9.830,87		10.230,89

2.7 Referências

CARVALHO-JUNIOR, J.R., CORRER-SOBRINHO, L., CORRER, A.B., SINHORETI, M.A., CONSANI, S.; SOUSA-NETO, M.D. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. **Journal of Endodontics**, v.33, n.9, p.1110-1116, 2007.

DE PAZ, L.E.C. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1734-1739, 2009.

GRUBBS, R.B.; BROZ, M.E.; DEAN, J.M.; BATES, F.S. Selectively epoxidized polyisoprene-polybutadiene block copolymers. **Macromolecules**. v.33, p.2308 –10, 2000.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M., DE FARIA-JÚNIOR, N.B., DUARTE, M.A.H., ORDINOLA-ZAPATA, R., GRAEFF, M.S.Z. AND TANOMARU-FILHO, M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. **Journal of Endodontics**, v.39, n.3, p.346-350, 2013.

HASCHKE, E. Adhesive endodontic cones and related methods. United States Patent Application 20040202986. **US Patent & Trademark Office**, October 14, 2004.

HIRAISHI, N., LOUSHINE, R.J., VANO, M., CHIEFFI, N., WELLER, R.N., FERRARI, M., PASHLEY, D.H. AND TAY, F.R. Is an oxygen inhibited layer required for bonding of resin-coated gutta-percha to a methacrylate-based root canal sealer? **Journal of Endodontics**, v.32, n.5, p.429-433, 2006.

OLIVEIRA, A.C.; TANOMARU, J.M.; FARIA-JUNIOR, N.; TANOMARU-FILHO, M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 4, p. 370-375, 2011.

ORDINOLA-ZAPATA, R., BRAMANTE, C.M., CAVENAGO, B., GRAEFF, M.S.Z., DE MORAES, I.G., MARCIANO, M. AND DUARTE, M.A.H. Antimicrobial effect of

endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **International Endodontic Journal**, v.45, n.2, p.162-168, 2012.

REZENDE, G.C.; MASSUNARI, L.; QUEIROZ, I.O.; GOMES FILHO, J. E.; JACINTO, R. C.; LODI, C. S., DEZAN JUNIOR, E. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. **Brazilian Oral Research**, v.30, p.e38, 2016.

ROSSATO, T.C.A.; GALLAS, J.A.; ROSA W.L.O.; DA SILVA, A.F.; PIVA, E; PERALTA, S.L; LUND, R.G. Experimental Sealers Containing Metal Methacrylates: Physical and Biological Properties. **Journal of Endodontics**, v.43, n.9, 2017.

SAMUI, A.B.; DALVI, V.G.; CHANDRASEKHAR, L.; PATRI, M.; CHAKRABORTY, B.C. Interpenetrating polymer networks based on nitrile rubber and metal methacrylates. **Journal of Applied Polymer Science**, v.99, n.5, p.2542-2548, 2006.

SHEN, Y.; ZHANG, H.; RUSE, N.D.; HAAPASALO, M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v.35, n.7, p.1051–1055, 2009.

SHIPPER, G.; ØRSTAVIK, D.; TEIXEIRA, F.B.; TROPE, M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon). **Journal of Endodontics**. v.30, n.5, p. 342–7, 2004.

TAY, F.R., LOUSHINE, R.J., MONTICELLI, F., WELLER, R.N., BRESCHI, L., FERRARI, M. AND PASHLEY, D.H. Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals. **Journal of Endodontics**, v.31, n.9, p.659-664, 2005.

TAY, F.R.; LOUSHINE, R.J.; WELLER, R.N.; KIMBROUGH, W.F.; PASHLEY, D.H.; MAK, Y.F.; LAI, C.N.S.; RAINA, R.; WILLIAMS, M.C. Ultrastructural evaluation of the quality of apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material. **Journal of Endodontics**. v.31, n.7, p.514 –9, 2005.

3 Relatório do Trabalho de Campo

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as mudanças ocorridas no planejamento e execução dos experimentos desta pesquisa.

3.1 O projeto de qualificação de dissertação apresentado à banca, se intitulava: Atividade microbiana e resposta tecidual óssea de cimentos endodônticos experimentais contendo metacrilatos metálicos. No entanto, a resposta tecidual em animais não está sendo apresentada como parte desta dissertação devido à necessidade de complementação de testes físico-químicos e antimicrobianos anteriormente à realização do estudo *in vivo*. Para a realização de um estudo com animais, deve-se buscar o menor dano possível ao mesmo, desta forma, optamos por melhor conhecer as propriedades dos materiais estudados. Cabe salientar, no entanto, que o projeto inicial, contendo a metodologia em animais, já foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEEA) através do processo no. 23110.005211/2017-43 e será executado durante o meu doutoramento.

3.2 No mês de Fevereiro de 2018 realizei uma visita científica na Indiana Purdue University (IUPUI), sob a orientação da Dra. Simone Duarte. Esta visita ocorreu para a realização da metodologia de biofilme através de o microscopia confocal. Devido à falta de recursos humanos e tempo, somente foi possível realizar o teste em parte das amostras. Era necessário que se participasse de muitas capacitações antes de poder utilizar o laboratório de microbiologia, não havendo tempo hábil para a confecção do biofilme de 30 dias. Adicionalmente, a pesquisa original se baseava em uma coleta de microorganismos multiespécies, porém devido ao tempo e a questões éticas da universidade, não foi possível realizar, sendo feito somente o biofilme com cepas de *Enterococcus faecalis*. Os resultados não ficaram condizentes com o esperado, sendo necessária a realização dos testes com biofilme novamente em Pelotas, no Departamento de Biotecnologia da UFPel.

Em relação à metodologia de biofilme realizada na Universidade Federal de Pelotas, houve perdas nas amostras do biofilme do período experimental de 30 dias. Suspeita-se de que o meio de cultura utilizado para as trocas não estava em condições de ser utilizado, ou houve alguma falha no gerador de anaerobiose. Este

fato gerou uma falha na apresentação dos resultados desta dissertação, pois não foi possível contabilizar os resultados deste período de 30 dias. Estas amostras serão repetidas a tempo de serem incluídas no artigo final, anteriormente à submissão. Não foi possível repetirmos estas amostras para inclusão na dissertação devido ao período de recesso da UFPel em Dezembro e Janeiro.

3.3 Os testes de liberação de íons e pH foram sugeridos pela banca de defesa de qualificação da dissertação em Outubro de 2017. Foram então incrementados no estudo para melhor avaliação do cimento endodôntico antes do manuseio com animais. Os testes foram realizados logo após a chegada dos materiais.

3.4 O teste de alteração dimensional foi realizado após a metodologia de biofilme, porque se percebeu que os materiais eram muito porosos ao corante, absorvendo a maior parte dele, dificultando a visualização no microscópio. Desta forma, esta foi a última metodologia a ser feita.

3.5 Os ensaios de envelhecimento também foram incluídos após sugestão da banca no momento de qualificação de mestrado em Outubro de 2017. Um estudo em andamento no CDC-Bio, realizado pelo Prof Dr. Carlos Enrique Cuevas-Suárez e Prof Dr. Evandro Piva, estava pesquisando o tempo de prateleira de materiais comerciais. Houve o interesse de saber se os respectivos materiais durariam o tempo de validade após situações adversas. Deste modo, o cimento endodôntico experimental fez parte dos testes. A metodologia se baseia no fato de que a cada 1 mês de armazenamento, leva-se em conta o período de meia-vida do material.

4 Artigo

O artigo presente nesse trabalho está formatado segundo as normas do periódico Dental Materials, disponível online em <https://www.elsevier.com/journals/dental-materials/01095641/guide-for-authors>, acesso em 11 de fevereiro de 2019.

Novel endodontic sealer based in metals cross-linking methacrylate

Victoria Burmann da Silva Guimarães^a, Andressa da Silva Barboza^a, Carlos Enrique Cuevas-Suárez^b, Tiago Collares^c, Thais Larré Oliveira^c, Anderson Schwingel Ribeiro^d, Meibel Teixeira Lisboa^d, Simone Duarte^e, Fernanda Geraldo Pappen^a, Rafael Guerra Lund^{a*}

^aGraduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^bDental Materials Laboratory, Academic Area of Dentistry, Autonomous University of Hidalgo State. Circuito Ex Hacienda La Concepción S/N. San Agustín Tlaxiaca, Hgo. Mexico.

^cCancer Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Federal University of Pelotas, Brazil.

^dGraduate Program in Chemistry, School of Chemistry, Chemical Metrology Laboratory (LabMeQui), Federal University of Pelotas, Brazil.

^eDepartment of Cariology, Operative Dentistry and Dental Public Health, School of Dentistry, Indiana University, Indianapolis, USA.

***Corresponding author:**

Rafael Guerra Lund, DDS, MSc, PhD

Post-Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas

Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas-RS 96015-560, Brazil

Phone: +55 53 3225-6741 / 134

E-mail: rafael.lund@gmail.com

Declarations of interest: The authors deny any conflict of interest

Acknowledgements

VBS Guimarães thanks the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for a Graduate Fellowship.

Funding sources

This study was supported in part by the Brazilian agencies: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; PRONEX #16.0471-4).

Abstract

The properties of endodontic sealers are important for the quality of filling of the root canals and, later, in the endodontic prognosis. However, no material has all the properties of an ideal endodontic sealer, so new materials are being created to improve its physicochemical and biological characteristics. The objective of this study was to evaluate the physical, chemical and antimicrobial properties, and shelf-life of a dual-reactive experimental sealer after the incorporation of dibutyltin methacrylate (Sn^{4+}) (ETs) or calcium methacrylate (Ca^{2+}) (ETs), in a concentration of 2%. AH Plus was used as a commercial reference. The pH and ion release were measured using a pH meter and a microwave induced plasma optical emission spectrometer. The dimensional stability was evaluated after 30 days in accordance with ISO 6876. Inhibition of biofilm growth was evaluated by laser scanning confocal microscopy (CLSM). The biofilm viability analysis was performed using the SYTO 9 technique. The shelf-life was evaluated through tests of degree of conversion and film thickness at the times: immediate, 1 month and 2 months. For statistical analysis, ANOVA and Tukey post hoc test were used, and a significance level of 5%. All sealers tested showed a gradual reduction of pH over 30 days. The ECs sealer showed the highest release of calcium and ETs presented the highest release of tin in 30 days. The ETs sealer showed better dimensional stability over time compared to other endodontic sealers. ETs revealed better antibiofilm potential after 15 days compared to controls. The degree of conversion was reduced after the shelf-life. Regarding film thickness, all materials were in accordance with ISO 6876 specifications, except ECs immediate (100 μm) and ETs in the first month of aging (170 μm). It was concluded that the physicochemical properties of the experimental endodontic sealers containing calcium and dibutyltin methacrylate were not drastically altered and the antibiofilm effect of the cements was improved.

Key-words: endodontics, root canal obturation, methacrylates, antimicrobial agents, AH plus.

Introduction

In the endodontic therapy, the obturation is responsible for the sealing of the root canal system, providing the filling of anatomical irregularities and the burial of bacteria that have survived the other stages of the treatment [1]. Sundqvist & Figdor [3] assigned three primary functions to the root filling: sealing against ingrowth of bacteria from the oral cavity; entombment of remaining microorganisms; and complete obturation at a microscopic level to prevent stagnant fluid from accumulating and serving as nutrients for bacteria from any source. Properties of root canal sealers are important on the quality of root canal filling and subsequently on the endodontic outcome [4]. Additionally, these materials should present adequate physicochemical properties, such as setting time, radiopacity, flow, water sorption and antimicrobial properties [2].

Many materials are currently used as root canal sealers, including zinc oxide–eugenol, calcium hydroxide, glass-ionomer, silicone and epoxy resin [1,5]. However, to date, no single established material meets all the desirable requirements for endodontic space obturation. Thus, new materials are constantly being created in order to improve its physicochemical and biological characteristics.

Recently, Rossato *et al.* [6], developed an experimental endodontic sealer with addition of calcium methacrylate and tin methacrylate, evidencing an increase in the antimicrobial action of this sealer on a strain of *E. faecalis*, and moderate cytotoxicity when compared to a commercial control (Resilon/RealSeal® (RS-SybronEndo, CA, USA). Calcium methacrylates may release calcium ions that play an important role in the repair process [7]. Additionally, dibutyltin methacrylate presents tin, which has been used for decades as a prophylactic agent in preventive dentistry; previous findings revealed the independent action on inhibiting bacterial biofilm formation, reducing the acid portion of this microbial polysaccharide matrix [8, 9].

In this context, from the results obtained by Rossato *et al.* [6], the present study evaluated the pH, the release of tin and calcium ions, and the antimicrobial action, through *in vitro* biofilm tests of experimental endodontic sealers, with the incorporation of monomers of calcium hydroxide methacrylate (ECs) and with dibutyltin methacrylates (ETs). Furthermore, it was attempted to validate an accelerated aging protocol with the purpose of determining the shelf-life and

expiration date of these sealers by monitoring the stability of their properties (degree of conversion and film thickness) over time.

The null hypothesis was as follows: the incorporation of metal methacrylate monomers into an experimental endodontic sealer will not confer calcium and tin ion release properties, confer antimicrobial activity against multispecies biofilms, and that the aging process will alter its physicochemical properties.

Material and Methods

Formulation and delineation of groups of experimental endodontic sealers

The composition of ECs and ETs is shown in Table 1 as well as in the commercial reference AH Plus. Two endodontic sealer pastes were mixed at the same proportion and photoactivated with a light-emitting diode for 20 seconds (Radii Curing Light; SDI, Bayswater, Victoria, Australia). AH Plus was mixed at the same proportion, according to the manufacturer instructions.

pH Assessment and Release of Ca^{2+} and Sn^{4+}

The sealers were prepared and inserted into polyethylene tubes from a catheter (1 mm internal diameter, 10 mm long) with only one open end with the aid of a Lentulo size #25 instrument (Dentsply Maillefer, Petropolis, RJ, Brazil) with movements of entrance and exit of the same. The closing of one end will be accomplished with the aid of a Paiva condenser. After filling, the tubes were weighed to verify the standardization of the quantity in each tube. Three specimens of each material were prepared. Each specimen was immediately immersed in a Falcon containing 10 mL of deionized water and incubated at 37°C throughout the experimental periods. Before the immersion of the specimens, the pH and ion concentrations of the deionized water were verified (attesting to pH = 6.01). The pH and ion readings were performed after 3h, 24h, 7, 15 and 30 days of storage. After each measurement, the specimens were carefully moved to fresh tubes with fresh deionized water. The pH readings of the eluates were performed with a calibrated pH meter (Q400A; Quimis, Diadema, SP, Brazil).

The release of Ca^{2+} and Sn^{4+} ions in the samples were measured by Agilent Technologies' MP AES 4200 Microwave Induced Spectrometer (MIP OES) model (Melbourne, Australia), equipped with the conventional misting system for introduction of the samples into the plasma for Ca^{2+} determination, and multimodal misting (MSIS) with chemical vapor generation using $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ for the determination of Sn^{4+} . The nebulizer was inert OneNeb type. The gases used to generate the plasma were the nitrogen obtained from compressed atmospheric air, generated from an Agilent 4107 nitrogen generator (Melbourne, Australia), operating at a gas flow of 20 L min^{-1} and flow rate of for nebulization of 1.5 L min^{-1} . For pre-optic protection a compressed air flow of 25 L min^{-1} was used. Also, for the ignition of the plasma was used a small gas flow Argon (Ar) with purity of 99.996% (Linde, Barueri, SP). The background signals were automatically corrected by subtraction between white and sample spectra. The operating conditions used for the determination of the analytes are presented in Tables 2 and 3.

The standard solutions of the calibration curves were prepared from a monoelement solution of each analyte ($10,000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$) and ($1001 \text{ mg L}^{-1} \text{ Sn}^{4+}$). The analytical curves were obtained in a linear range from 0.5 to 5.0 mg L^{-1} of Ca^{2+} in the conventional misting system, and for Sn^{4+} from 10 to $250 \mu\text{g L}^{-1}$ in the multimodal misting system by chemical vapor generation, using NaBH_4 as a reducing agent ($0.5\% \text{ NaBH}_4$ and $0.5\% \text{ NaOH (m / v)}$), and $2\% \text{ HCl (v / v)}$.

Dimensional Stability

The dimensional stability of the endodontic sealers was evaluated according to the method described by Carvalho-Junior *et al.* [10]. For each group, six cylindrical specimens (6 mm high x 4 mm diameter) were made using a metal matrix. After removing the samples from the mold, the flat surfaces of each sample were polished with a wet granulation sandpaper 600 and their initial length and diameter was measured with a digital caliper (Mitutoyo Sul Americana Ltda., Santo Amaro, Sao Paulo, Brazil). The cylinders were then stored in vials containing distilled water at 37°C for 30 days. After the storage time, the specimens were removed from the flasks, dried, and their final lengths and diameters were measured. The percentage of dimensional change was calculated as follows:

$$[(L_{30} - L)/L] \times 100$$

where L is the initial sample length and L₃₀ is the length after 30 days.

Biofilm Formation Inhibition Assay

For the antimicrobial assay, the sealers were prepared and placed in plastic molds 10 mm in diameter and 1.5 mm thick and the specimens stored at room temperature for 48 h. The discs were sterilized by ultraviolet light in a laminar flow layer (Bio Seg 12, Grupo Veco, Barão Geraldo Campinas, SP - Brasil) for 30 min per side [11]. Sterile hydroxyapatite disks with the same dimensions as substrate for biofilm growth were used in the positive control group [12].

A subgingival biofilm sample was collected from a healthy adult volunteer and suspended in a heart-brain infusion broth (BHI, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). The cell density was adjusted in a spectrophotometer at 405nm (Sp22-325 at 1000nm, Biospectro, Curitiba, PR, Brazil) to a density of approximately 7.5×10^7 colony forming units per milliliter in BHI broth.

The disks were incubated in this suspension in 24 well plates under anaerobic conditions using anaerobac and anaerobic indicator (PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda. São Paulo – SP, Brazil) at 37°C. Each well contained 1.5 mL of sterile BHI broth and 0.5 mL of inoculum, in which the specimens were kept submerged. The BHI medium was replaced once a week without addition of new microorganisms [12]. After the growth periods of 7 and 15 days, 30 discs (n = 3 per group and per incubation period) were analyzed for biofilm and proportion of live and dead bacteria by viability staining and laser scanning confocal microscopy (CLSM).

Biofilm viability analysis was performed using the SYTO 9 propidium iodide (Live/dead BacLight Kit, Invitrogen, Eugene, OR, USA) technique. SYTO 9 is a green fluorescent stain that labels living and dead microorganisms. Propidium iodide is a red fluorescent nucleic acid patch that penetrates only cells with damaged membranes (dead cells). First, the samples were cleaned with 2 mL of saline solution and then 0.25 µL of fluorescent stain was placed on the biofilm. A CLSM (Leica Microsystems, Nussloch GmbH 2019, USA) was used to visualize the samples. The biofilm was randomly evaluated at a 100x magnification. Then, five confocal piles of different random areas of each sample were obtained using x10 lens and with the format of 512x512 pixels. The evaluator was blinded to the experimental groups. All

images were analyzed using LAS X 3D Analysis (Leica Microsystems, Nussloch GmbH 2019, USA) software for total biovolume (μm^3), total number of live cells (green) and percentage of live cells.

Accelerated Aging Process within Climate Chamber

The materials were subjected to an accelerated storage protocol for the methodologies of degree of conversion and kinetics of polymerization and film thickness, according to the Arrhenius model [13]:

$$r = Q10^{((RT-TA) / 10)}$$

where 'r' is the accelerated aging, 'TA' is the ambient temperature, 'RT' is the increased temperature, and 'Q10' is the reaction coefficient constant.

The aging model was made in an oven with controlled temperature at 40°C for a period of 2 months. Accelerated aging occurred within a climatic chamber (MA 835 / UR, Marconi, Piracicaba, Brazil) with controlled temperature and relative humidity of 75%. According to the Arrhenius model, these conditions, when maintained for 6 months, amount to a storage period of 18 months at room temperature.

According to this model, the chemical-mechanical properties of the material, such as degree of conversion and film thickness were monitored at 3 different times: 0, 1, 2 months, which were equivalent to the periods previously determined for the real-time evaluation. The products were not stored in a desiccator in order to evaluate the influence of moisture on the chemical-mechanical properties of the material.

Degree of Conversion

Polymerization kinetics was determined using Fourier transform infrared spectroscopy, with an attenuated total reflectance unit coupled to the system (RT-FTIR Shimadzu Prestige 21 Spectrometer, Shimadzu, Japan). Standard amounts of each material were dispensed onto the crystal and prior to photoactivation, a spectrum was obtained. Subsequently, the surface of the material was covered with a polyester matrix strip through which the irradiation LED unit was irradiated $>1000 \text{ mW} / \text{cm}^2$ (Radii ® Curing Light, SDI, Bayswater, Victoria, Australia). The samples

were photoactivated for up to 40 s. Polymerization kinetics were determined using the IRRolution software, using the Happ-Genzel apodization, in a spectral range between 1690 and 1575 cm^{-1} . The degree of conversion per second was determined by the absorbance intensity ratio observed for aliphatic C = C (peak height at 1638 cm^{-1}) against the absorbance intensity of the carboxyl bond (1710 cm^{-1}) used as the internal standard. Each test was performed in triplicate.

Film Thickness

Two square glass plates with a thickness of 5 mm and a contact area of approximately $(200 \pm 10) \text{ mm}^2$ were required for the film thickness test; load device $(150 \pm 3) \text{ N}$ and micrometer with accuracy of 1 μm . The test was performed in triplicate ($n = 3$). The sealers were prepared, and 5 ml of each was dispensed into the center of the plate. After placing the material on the plate, it was covered with another plate of the same dimensions. After $(180 \pm 10) \text{ s}$ from the start of the mixture, a load of $(150 \pm 3) \text{ N}$ was applied to the top plate.

It was found that the sealer covered the whole plate, after 10 minutes of the beginning of the manipulation, the thickness of the set formed by the two plates and the cement film was measured by means of a micrometer with 1 μm accurate. The sealer thickness was defined by the thickness difference of the plates with and without the cement. ISO 6876 (2002) [14] requires a film thickness of not more than 50 μm .

Statistical analyses

Statistical analyses of obtained data were performed using Sigma Plot 12.0 software. The data was analysed to verify the normal distribution and the homogeneity of the variance. Two-way ANOVA analysis followed by a complementary Tukey test were made to evaluate each of the dependent variables. The level of significance for all the tests was set to $p < 0.05$.

Results

pH Assessment and Release of Ca^{2+} and Sn^{4+}

The highest pH values were obtained for AH Plus over the 30 day-period. In contrast, the other groups showed a decrease of pH values over the time. It was observed a higher decrease of pH after 7 days in EXP and ETs groups, while the ECs showed a lower pH variability (Figure 1).

The experimental endodontic sealers presented lower pH values in all times (Figure 1). ECs pH values remained ± 4.8 with no statistical difference between the experimental sealer and AH Plus. ETs presented the higher variation of pH within the experimental period, being statistically different from AH Plus ($P < 0.05$).

The merit parameters obtained for Ca^{2+} and Sn^{4+} in aqueous standard are described in Table 2. Figure 2 (A) shows the calcium release of the ECs, EXP and AH Plus sealers by the conventional method and Figure 2 (B) shows the cumulative effect of Ca^{2+} release in all times. It is possible to notice the decrease of Ca^{2+} release of all sealers over the time. ECs showed the highest calcium release within the experimental periods. The highest ion release occurred up to 3h, and it had decreased along the time.

Figure 3 (A) shows the Sn^{4+} release of ETs, Experimental sealer and AH Plus by multimodal system and Figure 3 (B) shows the cumulative effect of Sn^{4+} release in all times. AH Plus did not release appreciable Sn^{4+} levels. At 3 hours period, the experimental sealer showed the highest Sn^{4+} release, which had decreased along the experimental period. ETs demonstrated the highest Sn^{4+} release from 24 hours to 30 days period, in comparison to the other groups.

The ECs cements did not obtain detectable levels of tin ions for the multimodal method, whereas ETs cement did not find detectable levels of calcium in the conventional method.

Dimensional Stability

The dimensional stability results are shown in Table 3. All the experimental sealers showed positive values of dimensional stability, indicating expansion of the material. Oppositely, AH Plus demonstrated negative values within 30 days storage time ($P < 0.05$).

Biofilm Formation Inhibition Assay

Total biovolume analysis revealed that biofilm formation occurred in all groups at all incubation times. After 7 days, AH Plus and EXP demonstrated statistically lower biofilm volume in comparison to control group ($P < 0.05$). However, the total biovolume growth were similar among the tested sealers ($P > 0.05$) (Table 4).

After 15 days, in contrast, the ETs presented significantly lower biofilm biovolume than ECs, EXP and control group ($P < 0.05$), while ECs and EXP were similar to control ($P > 0.05$).

For viable bacteria biovolume (Table 4), all the evaluated sealers were similar within the 7 days period ($P > 0.05$). In relation to the 15 days period, the experimental sealers (EXP, ETs and ECs) presented lower viable bacteria volume in comparison to AH Plus and Control group ($P < 0.05$). The positive effect of the methacrylates in the antimicrobial properties of sealers was visible after 15 days.

Figure 4 shows examples of CSLM images of biofilm growth on the different materials within the experimental periods tested. In the images, it is possible to notice the higher biovolume of biofilm within the control group; and the lower viable biovolume growth on the ETs specimens, in 15 days.

Accelerated Aging Process Within Climate Chamber

Degree of Conversion

The degree of conversion stability is shown in Table 5. The degree of conversion values is shown in Table 6. The degree of conversion changed after the end of shelf-life period of shelf-life simulation only for the specimens of ETs group ($P < 0.05$). Immediately, ETs showed the higher degree of conversion ($P < 0.05$), however, in the other tested periods, the sealers were similar ($P > 0.05$).

Film Thickness

Table 5 and 6 show the values of film thickness and film stability respectively. The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference among the groups ($P =$

0.378). All materials were in accordance with the specifications provided by ISO 6876 [14], except for ECs immediate (100 μm) and ETs (170 μm) in the first month of aging, which were higher than the value indicated (50 μm).

Discussion

The hypothesis evaluated was partially accepted; 2% of calcium or dibutyltin methacrylates incorporated into experimental endodontic sealers improved the antimicrobial properties but affected physical and chemical properties.

The incorporation of calcium methacrylates particles to the experimental sealer increased the levels of Ca^{2+} release, reaching higher levels compared with AH Plus and the EXP sealer. Additionally, the incorporation of dibutyltin methacrylate particles to the experimental sealer increased the levels of Sn^{4+} release, reaching higher levels compared with AH Plus and the experimental without methacrylate sealer. In the present study, it was not possible to determine the concentrations of Ca^{2+} and Sn^{4+} by the same method. Sn^{4+} is a relatively scarce element, so its determination is indicated by the multifocal method [15, 16]. On the other hand, Ca^{2+} is an element found in more abundance in materials and must be determined by the conventional method [16]. Moreover, the difficulty of determining Ca^{2+} by the multifocal method can be due to the fact that it binds with hydrochloric acid, a solution used to acidify the eluate in the multifocal method [17, 18, 19].

Clinically, a sustained ion release is desirable for a long-term biofilm inhibition effect as shown in Figures 2 and 3. Therefore, it becomes important to know the kinetics of ion release over time. However, the available literature shows different release profiles, depending on the particle characteristics and content, pH of the immersion medium and hydrophilicity of the resin matrix [20, 21, 22].

Alkalinisation capacity (increase in pH) may be considered an important chemical property, because it may induce repair by stimulating the mineralization process [23]. Moreover, the release of ions from monomers, such as Ca^{2+} and Sn^{4+} , generally is resulted from the hydrolytic degradation that involves a chain scission process during which polymer chains are cleaved to form oligomers and finally to form monomers, which have different functional groups from polymers. This process presents an interrelationship with erosion that designates the loss of material owing to monomers and oligomers leaving the matrix. Basically, water enters the polymer bulk, which might be accompanied by swelling. The intrusion of water triggers

chemical polymer degradation, leading to the creation of oligomers and monomers. Progressive degradation changes the microstructure of the bulk through the formation of pores, through which degradable components are released [24]. This study showed that the AH Plus and the experimental sealers did not promote a significant pH increase, in agreement with Vertuan *et al.* [25], in which the pH of the sealers remained below 6. Our results also differed from Almeida *et al.* [26], where the release of cationic ions (silver particles) alkalinized the pH of the eluate.

The clinical importance of the formation of calcium hydroxide during the setting of endodontic materials has been emphasized repeatedly in the literature [27]. Calcium ions activate a series of signalling pathways associated with mineralization [28,29] and hydroxide ions create an alkaline environment responsible for antibacterial and anti-inflammatory activity [23,30]. Therefore, the cumulative effect of Ca^{2+} of the EC over the 30 days can collaborate with the rising tendency of the pH of the Ca^{2+} . On the other hand, unfortunately, a dose-response relationship between calcium release and mineral recovery is still to be established according to Braga [31]. Hence, the required calcium concentrations necessary to achieve better remineralization of periapical tissues still need to be established to give this important subject full consideration.

The low concentration of Ca^{2+} and Sn^{4+} released from the experimental cements can be explained by the fact that they may copolymerize with the resin by forming a covalent bond with the polymer network, suggesting these cationic ions could be immobilized in the composite and not release over the time. The similarity of this phenomenon is described with other monomers, such as quaternary ammonium polymers, by Vaidyanathan *et al.* [32].

Dimensional change is another important property, and modifications in such property, possibly leading to contraction, would likely have a negative impact on the ability of the sealer [33]. According to ANSI/ADA standards [34], the mean linear shrinkage of a sealer should not exceed 1%, or 0.1% of expansion. In the present study, the dimensional change values of experimental sealers were not in accordance with ANSI/ADA [34] requirements. The expansion observed upon setting may be explained by the excessive absorption of water by the cements [35]. AH Plus unlike other experimental cements, contracted, and may be due to its solubility properties [25].

In this study, calcium and dibutyltin methacrylate were added in an experimental endodontic sealer with the main objective of improving its antibacterial effect. All the experimental sealers had anti-biofilm effect over time, reducing the viable bacteria in 15 days in comparison to the control group and AH Plus sealer. The antibacterial potential of calcium and dibutyltin methacrylates might be due to the fact that the di-n-butylidimethacrylatetin belongs to an organotin group [36]. Some studies have shown that organotin may inhibit DNA synthesis or induce DNA fragmentation [37, 38]. For example, one study [39] showed that organotin had anti-biofilm effect against some Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Studies in root canals contaminated with planktonic bacteria and monospecies model present limitations, showing results commonly overestimated, since bacteria, in these cases, are not protected by the biofilm formation [40]. Differently from Rossato [6], who evaluated the direct contact of the experimental sealers with strains of *Enterococcus faecalis*, in the present study, the antimicrobial capacity of methacrylates were tested in a microcosm biofilm model. Even though, the findings of our study were comparable to those obtained by Rossato [6], showing that the incorporation of methacrylates in root sealers increased the anti-biofilm potential, indeed.

Moreover, the characterization of several adhesive systems according to a protocol of accelerated aging, simulating different shelf-life periods of the materials, was performed. According to the ANSI, the shelf life of a material is the length of time (from the date of manufacture) where a material retains the physical and mechanical properties necessary to accomplish its prescribed purpose. Dental materials are kept for long periods between different usage on a shelf or in the refrigerator. The degradation process of resin composites is complex and includes many aspects. Two majors forms can be observed: intraoral degradation (mechanical, physical, or chemical) and extraoral degradation due to the storage of the material and its shelf life. Many materials used in dentistry are perishable and have specific storage requirements to maintain optimum properties and maximize their shelf-life [41]. The results obtained suggested that degree of conversion was affected after shelf-life simulation only for ETs, and film thickness was not affected after simulation for none of the tested materials. The degree of conversion is a feature that is largely influenced by the type and concentration of the photoinitiator system. In this study, the experimental sealers were based on the CQ/EDAB photoinitiation system. Some

studies have shown that, in acid environment, the effectiveness and stability of this photoinitiator system was low [42, 43]. On the other hand, an acid-base reaction occurs between the acid monomers and the amines, preventing the amine from acting as a polymerization co-initiator [39]. On the other hand, the amine-acid monomer interaction can neutralize the acid functional monomer, impairing its ability to form stable bonds with the hydroxyapatite of the dentin substrate [44]. In fact, the reduction in bond strength values after the lifetime simulation observed in this study could also have occurred as a result of this neutralization process.

Film thickness is a test which provides information about the volume occupied by the endodontic sealer in the root canal system after filling [45]. A thin film thickness is required to ensure a correct wetting of the dental substrate, and thus providing a better seal [46]. According to the immediate results, the addition of metal methacrylates did not affect the film thickness when compared to the experimental sealer and AH Plus. However, the obtained values of ECs and EXP exceed those established in ISO 6876 (50µm) [14]. It is possible that another material characteristic, such as viscosity and particle size distribution, had higher influences on this property [47]. This is the first study in the literature to report shelf-life of film-thickness. Through the months, it could be noticed that the film-thickness decreased for EXP, ECs and AH Plus, while it was increased for ETs, with a statistically significant difference between groups at 1-month period, but no difference at the second month. It is important to highlight, however, that all values of film thickness, after the storage time, were in accordance with ISO 6876 (2002) [14].

To date, there are limited independent publications on the properties and applications of modified endodontics sealers containing metal methacrylates. The incorporation of metal methacrylates into endodontic sealers may be promising. Nevertheless, further *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* investigations should be performed to evaluate the performance of these new materials and confirm their beneficial use in endodontic therapy.

Conclusions

The physico-chemical properties of the experimental sealer containing metal methacrylate of calcium and dibutyltin were not drastically altered, while its antibiofilm effect was enhanced. Furthermore, as the release of Ca^{2+} and Sn^{4+} had been

improved, a positive effect can be expected on the biological response of the modified sealer.

References

- [1] Ørstavik, D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics*, 2005; 12:25-38.
- [2] Grossman, Li; *Endodontic Practice*, 10 ed. Philadelphia: Henry Kimpton Publishers; 1981.297.
- [3] Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, eds. *Essential Endodontology. Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*. Oxford: Blackwell, 1998.
- [4] Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 2010; 36:16–27.
- [5] Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod* 2013;39:1281–6.
- [6] Rossato TCA, Gallas JA, Rosa WLO, Da Silva AF, Piva E, Peralta SL, Lund RG. Experimental Sealers Containing Metal Methacrylates: Physical and Biological Properties. *J Endod* 2017; 43:10.
- [7] Rezende GC, Massunari L, Queiroz IO, Gomes Filho JE, Jacinto RC, Lodi CS, Dezan Junior E. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. *Braz Oral Res* 2016; 30:e38.
- [8] Addy M. Plaque control as a scientific basis for the prevention of dental caries. *J R Soc Med* 1986; 79(Suppl 14):6–10.
- [9] Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. *Br Dent J* 1999; 186:286–96.
- [10] Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MAC, Consani S, Sousa-Neto MD. Solubility and Dimensional Change after Setting of Root Canal Sealers: A Proposal for Smaller Dimensions of Test Samples. *J Endod* 2007; 33:1110-6.
- [11] Guerreiro-Tanomaru JM, De Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Graeff MSZ, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod*, 2013; 39:346-350.

- [12] Shen Y, Zhang H, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. J Endod, 2009; 35:1051–1055.
- [13] Clark G. Shelf Life of Medical Devices, Guidance Document. Division of Small Manufacturers Assistance, Office of Training and Assistance, Center for Devices and Radiological Health, Food and Drug Administration, 1991.
- [14] ISO 6876:2012. Dentistry -- Root canal sealing materials. Int Organ Stand 2012.
- [15] Carlin JF. Antimony recycling in the United States in 2000. US Department of the Interior, US Geological Survey; 2006.
- [16] Souza AO, Pereira CC, Heling AI, Oreste EQ, Cadore S, Ribeiro AS, Vieira MA. Determination of total concentration and bioaccessible fraction of metals in infant cereals by MIP OES. J Food Compos Anal 2019; 77:60–65.
- [17] Bramer, EA. Flue gas emission from FBC. Coal Sci Technol, 1995; 22:51.
- [18] Xie W, Liu K, W P, Pan J, Riley T. Interaction between emissions of SO₂ and HCl in fluidized bed combustors. Fuel 1999; 78:1425-1436.
- [19] Misra DN. Interaction of Citric or Hydrochloric Acid with Calcium Fluorapatite: Precipitation of Calcium Fluoride. J Col Interf Sci. 1999;220:387-391.
- [20] Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Muller R, Rosentritt M, Skrtic D, Schmalz G. Reinforcement of experimental composite materials based on amorphous calcium phosphate with inert fillers. Dent Mater, 2014, 30;9:1052-1060.
- [21] Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition Dent Mater, 2011, 27;8: 762-769.
- [22] Alania Y, Chiari MD, Rodrigues MC, Arana-Chavez VE, Bressiani AHA, Vichi FM, Braga RR. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. Dent Mater, 2016, 32;12:e374-e381.
- [23] Holland R, de Souza V, Nery MJ, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. J Endod 2002; 28:173–6.
- [24] Gopferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion Biomaterials, 1996;17:103-114.

- [25] Vertuan GC, Duarte MAH, Moraes IG, Piazza B, Vasconcelos BC, Alcalde MP and Vivan RC. Physicochemical Properties of a New Root Canal Sealer J Endod. 2018; 44:501-505.
- [26] Almeida LH, Moraes RR, Morgental RD, Cava SS, Rosa WL, Rodrigues P, Ribeiro AS, Só M, Pappen FG. Synthesis of silver-containing calcium aluminate particles and their effects on a MTA-based endodontic sealer. Dent Mater. 2018; 34:e214-23.
- [27] Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3d culture. Biomater, 2005, 26;23:4847–4855.
- [28] Duarte MA, Midena RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Dos Santos F, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. J. Endod., 2009, 35;9:1274–1277.
- [29] Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, Zhu Y. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. J. Endod., 2011, 37;9:1240–1246.
- [30] Shen Q, Sun J, Wu J, Liu C, Chen F. An in vitro investigation of the mechanical-chemical and biological properties of calcium phosphate/calcium silicate/bismutite cement for dental pulp capping. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater., 2010, 94;1:141–148.
- [31] Braga RR. How far do calcium release measurements properly reflect its multiple roles in dental tissue mineralization? Clin Oral Investig, 2019, 29;23:501.
- [32] Vaidyanathan M, Sheehy EC, Gilbert SC, Beighton D. Antimicrobial properties of dentine bonding agents determined using in vitro and ex vivo methods J. Dent., 2009, 37;7:514-521.
- [33] Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Endod. 2007; 33:1235-8.
- [34] (ANSI/ADA) ANSIADA. Specification 57: Endodontic Sealing Material. In: Publishing A, editor. Chicago, IL, USA 2000.
- [35] Camilleri J, Montesin FE, Curtis RV, Ford TR. Characterization of Portland cement for use as a dental restorative material. Dent Mater. 2006; 22:569-75.

- [36] Cocco AR, da Rosa WLO, Peralta SL, Maske TT, da Silva AF, Hartwig CA, Mesko MF, Piva E, Lund RG. New adhesive system based in metals cross-linking methacrylate. *J Mech Behav Biomed Mat.* 2018; 77:519–526.
- [37] Ahmad, M.S., Hussain, M., Hanif, M., Ali, S., Mirza, B. Synthesis, chemical characterization and biological screening for cytotoxicity and antitumor activity of organotin (IV) derivatives of 3,4-methylenedioxy 6-nitrophenylpropenoic acid. *Molecules* 2007; 12:2348–2363.
- [38] Tabassum, S., Pettinaria, C. Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy. *J. Organomet. Chem.* 2006; 691:1761–1766.
- [39] Ahmad, M.S., Hussain, M., Hanif, M., Ali, S., Qayyum, M., Mirza, B. Di- and triorganotin (IV) esters of 3,4-methylenedioxyphenylpropenoic acid: synthesis, spectroscopic characterization and biological screening for antimicrobial, cytotoxic and antitumor activities. *Chem. Biol. Drug Des.* 2008;71: 568–576.
- [40] Cretella, G, Lajolo, C., Castagnola, R. Somma, F., Inchingolo, M., Marigo, L. The Effect of Diode Laser on Planktonic *Enterococcus faecalis* in Infected Root Canals in an Ex Vivo Model. *Photomed laser surg*, 2017; 35:190-194.
- [41] Sabbagh J, Nabbout F, Jabbour E, Leloup G. The effect of expiration date on mechanical properties of resin composites. *J Int Soc Prevent Communit Dent* 2018;8:99-103.
- [42] Sodré CS, Albuquerque PPAC, Isolan CP, Moraes RR, Schneider LF. Relative photon absorption determination and the influence of photoinitiator system and water content on C=C conversion, water sorption/solubility of experimental selfetch adhesives. *Int J Adhes Adhes* 2015; 63:152–7.
- [43] Ikemura K, Endo T. A Review of our Development of Dental Adhesives-Effects of Radical Polymerization Initiators and Adhesive Monomers on Adhesion. *Dent Mater J* 2010; 29:109–21.
- [44] Meereis CTW, Leal FB, Ogliari FA. Stability of initiation systems in acidic photopolymerizable dental material. *Dent Mater* 2016; 32:889–98.
- [45] Wu MK, Fan B, Wesselink PR. Leakage along apical root fillings in curved root canals. Part I: Effects of apical transportation on seal of root fillings. *J Endod*, 2000, 26;4:210-216.
- [46] 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 :437-48.

[47] Collares FM, Klein M, Santos PD, et al. Influence of radiopaque fillers on physicochemical properties of a model epoxy resin-based root canal sealer. *J Appl Oral Sci* 2013; 21:533-39.

Table 1. Composition of the sealer evaluated

Endodontic Sealer	Composition	
	Base Paste	Catalytic Paste
Experimental Endodontic Cement (E)	Bis-EMA30, Exothane 8, dimethacrylate PEG 400 α = 25, TEGDMA, camphorquinone, DHEPT, non- silanized silica and ytterbium	Bis-EMA 30, Exothane 8, TEGDMA, sulfinic, benzoyl peroxide, BHT, non- silanized silica and ytterbium
E + Calcium Methacrylate (ECs)	E + 2% calcium methacrylate	
E + Dibutyltin Methacrylate (ETs)	E + 2% dibutyltin methacrylate	
	Paste A	Paste B
AH Plus	Bisphenol-A Epoxy Resin; Bisphenol-E Epoxy Resin; Calcium tungstate; Zirconium oxide; Silica and Oxide of iron.	Amina Adamantada; N, N "-Dibenzyl-5- oxanonane diamine-1.9; TCD-Diamine; Calcium tungstate; Oxide of zirconium; Silica and Silicone Oil.

Table 2. General conditions of operation during analysis by MIP OES

Instrument Parameters				Operation conditions			
Read time (s)				3			
Number of replicates				3			
Stabilization time (s)				15			
Correction of background signal				Automatic			
Analyte	Wave-length (nm)	Display position (nm)	Nebulizer flow (L min ⁻¹)	Inclination	LD	LQ	R ²
Conventional nebulization (µg L ⁻¹)							
Ca ²⁺	393.366	10	0.6	1042042330	8.50	28.30	993.38
Multimodal nebulization (MSIS) (µg L ⁻¹)							
Sn ⁴⁺	317.505	0	0.8	42.86	16.95	56.52	0.99263

Inclination (a): Sensitivity; R2: Linear correlation coefficient squared; LD: Detection limit; LQ: Limit of quantification.

Table 3. Dimensional stability of the Different Materials Tested *

Group	Median	Interquartile range	Statistics
Exp	3,199	[2.603 - 4.068]	A
ECs	3,12	[1.853 - 4.209]	A
ETs	2,638	[1.904 - 3.56]	A
AH Plus	-14,179	[-21.98 - -10.707]	B

*Kruskal-Wallis / Dunn's Post hoc

Table 4. Median (25 – 75 percentile) for the total and viable biofilm biovolume (n=5)

Endodontic sealer	Total biofilm biovolume, $\mu\text{m}^3 \times 10^4$		Viable biofilm biovolume, $\mu\text{m}^3 \times 10^4$	
	7 days	15 days	7 days	15 days
ECs	36.65 (5.88 – 274.9) ^{A,ab}	14.39 (2.02 – 29.32) ^{A,bc}	17.01 (2.10 – 63.56) ^{A,a}	0.41 (0.08 – 1.79) ^{B,a}
ETs	32.26 (20.62 – 185.65) ^{A,ab}	319.45 (0.35 – 395.34) ^{A,a}	13.72 (9.57 – 45.83) ^{A,a}	0.08 (0.00 – 0.44) ^{B,a}
EXP	15.25 (4.99 – 58.79) ^{A,a}	226.92 (31.73 – 307.27) ^{B,bc}	4.91 (1.45 – 18.58) ^{A,a}	1.07 (0.01 – 5.13) ^{B,a}
AH Plus	4.34 (0.91 – 147.93) ^{A,a}	51.74 (20.64 – 130.69) ^{A,ab}	0.73 (0.14 – 78.04) ^{A,a}	31.01 (12.60 – 53.63) ^{A,b}
HA (control)	246.91 (73.29 – 421.83) ^{A,b}	462.57 (135.05 – 510.04) ^{A,c}	69.95 (11.87 – 96.86) ^{A,a}	38.65 (14.01 – 91.48) ^{A,b}

* Different upper-case letters indicate difference among the experimental times within the groups. Different lower-case letters indicate difference among the groups within the same experimental time.

Table 5. Degree of conversion and Film Thickness stability of the endodontic sealers evaluated after different periods of shelf-life simulation [mean (SD)].

	Degree of Conversion			Film Thickness (µm)		
	Immediate	1 month	2 months	Immediate	1 month	2 months
ECs	6.383 (1.266) ^{Ba}	2.29 (0.53) ^{Aa}	2.89 (2.11) ^{Aa}	100 (0.06) ^{Aa}	30 (0.008) ^{ABa}	6 (0.004) ^{Aa}
ETs	27.54 (2.771) ^{Aa}	10.26 (8.65) ^{Ab}	10.29 (5.03) ^{Ab}	5 (0.01) ^{Aa}	170 (0.15) ^{Ba}	50 (0.09) ^{Aa}
EXP	13.40 (6.78) ^{Ba}	6.65 (0.81) ^{Aa}	10.63 (4.76) ^{Aa}	80 (0.09) ^{Aa}	20 (0.05) ^{Aa}	6 (0.004) ^{Aa}
AH Plus	-	-	-	3 (0.004) ^{Aa}	6 (0.004) ^{Ba}	0 (0.00) ^{Aa}

*One Way ANOVA / Tukey's Post hoc. Uppercase letter indicate analysis within columns. Lowercase letter indicate analysis within rows.

Table 6. Degree of conversion (DC)* and Film thickness (FT)[#] of the Different Materials Tested with Calcium Methacrylate or Dibutyltin Methacrylate (Mean – Standard Deviation)

Group	DC (%)			FT (µm)		
	Mean	Standard deviation	Statistics	Mean	Standard deviation	Statistics
Exp	13.408	(6.782)	b	0.0833	(0.119)	a
EC	6.383	(1.266)	b	0.107	(0.0737)	a
ET	27.54	(2.771)	a	0.0567	(0.0208)	a
AHPlus	-	-	-	0.00333	(0.00577)	a

*One Way ANOVA / Tukey's Post hoc #One Way ANOVA

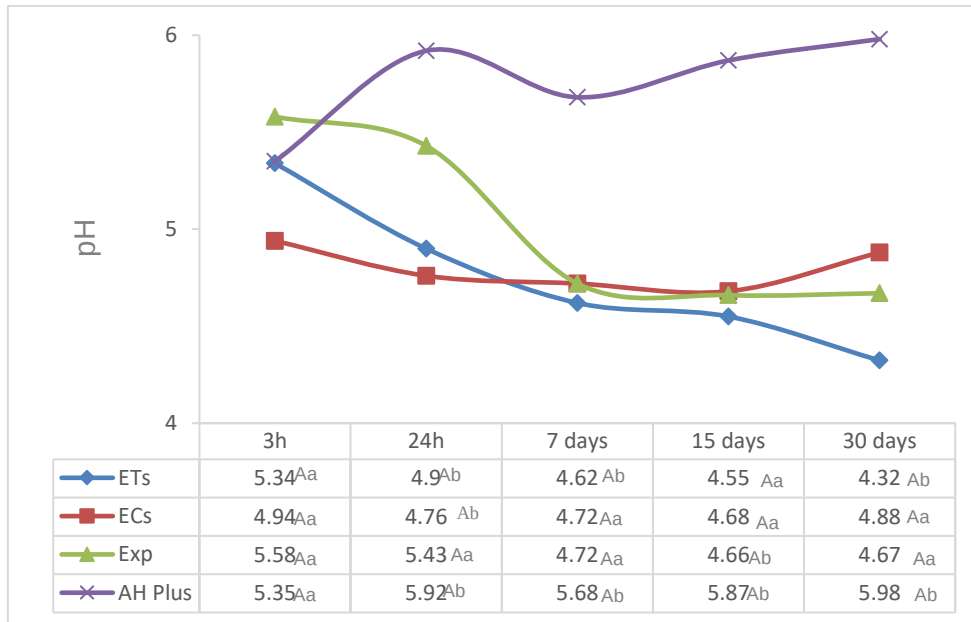


Fig 1. pH of the eluate of all endodontic sealers over the 30-day storage period.

(One Way ANOVA / Tukey's Post hoc. Mean pH at each evaluation period for each material, 3 hours after manipulation. Different uppercase letters indicate significant statistical difference ($P < 0.05$) between different evaluation periods for the same material. Different lowercase letters indicate statistically significant difference ($P < 0.05$) between different materials within the same evaluation period.)

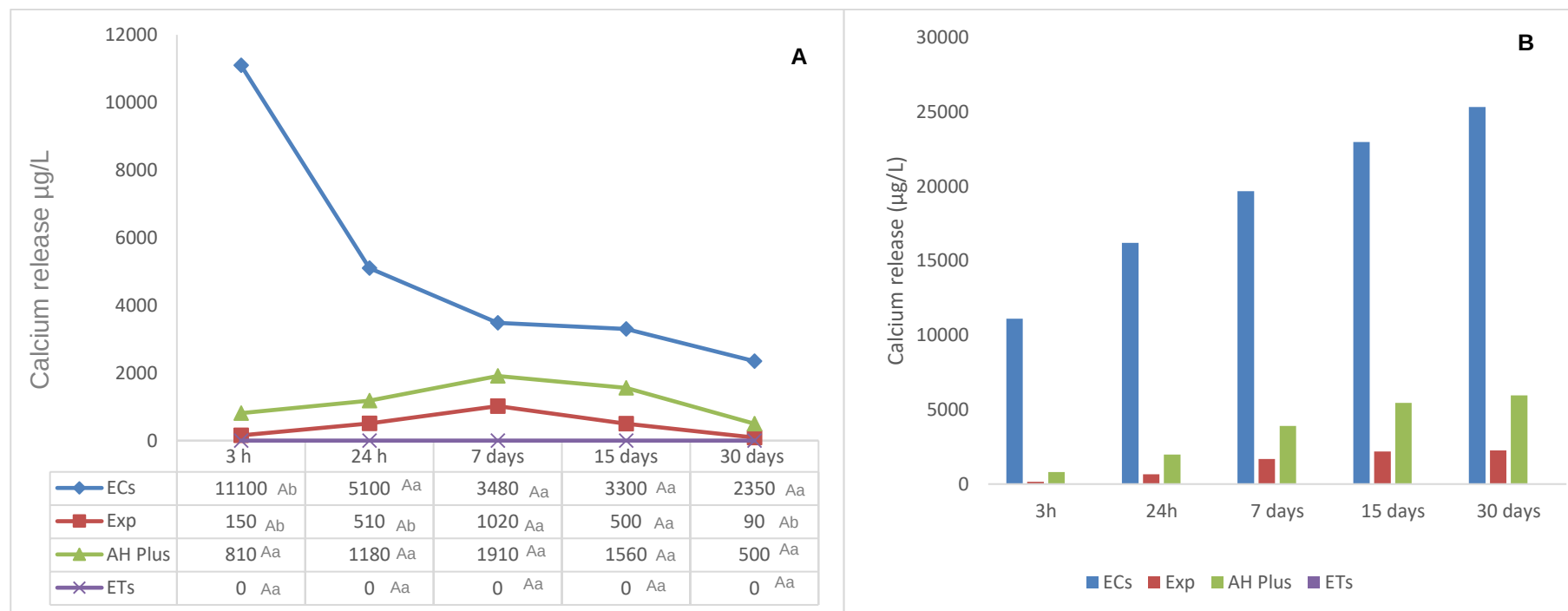


Fig 2. (A) Calcium ion release (µg/L) by conventional method over time for endodontic sealers tested. **(B)** Cumulative effect of Ca²⁺ released from endodontic sealers tested.

(One Way ANOVA / Tukey's Post hoc. Uppercase letters indicate analysis within same sealer. Lowercase letters indicate analysis within time)

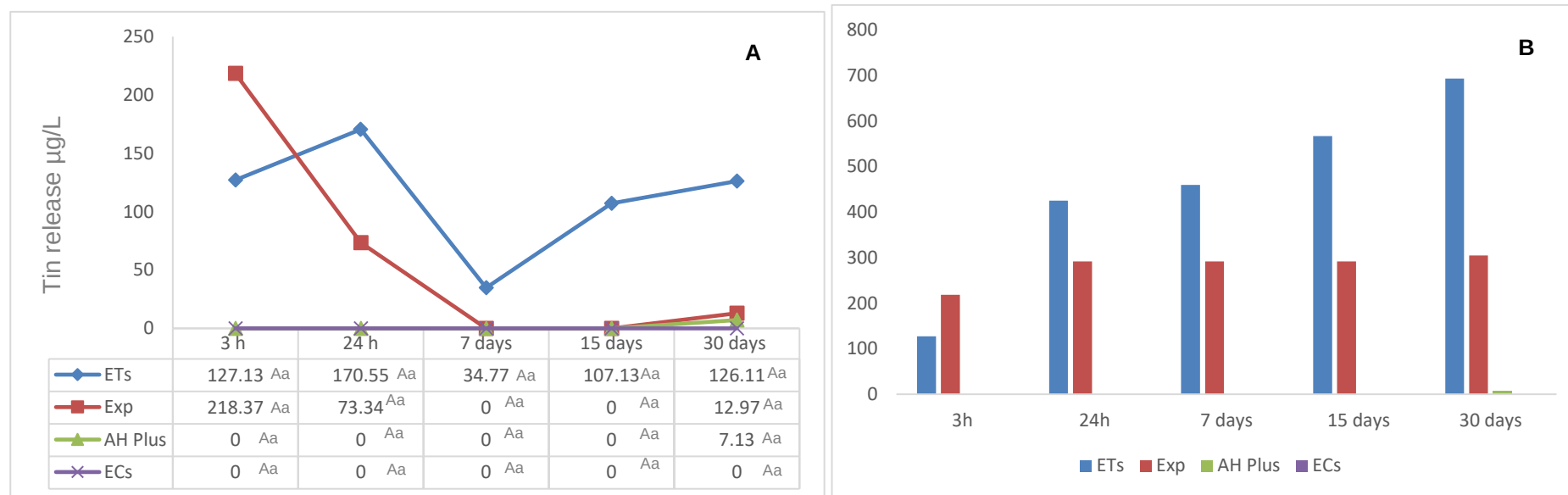


Fig 3. (A) Sn⁴⁺ ion release (µg/L) by multimodal method over time for endodontic sealers tested. **(B)** Cumulative effect of Sn⁴⁺ released from endodontic sealers tested.

(One Way ANOVA / Tukey's Post hoc. Uppercase letters indicate analysis within same sealer. Lowercase letters indicate analysis within time)

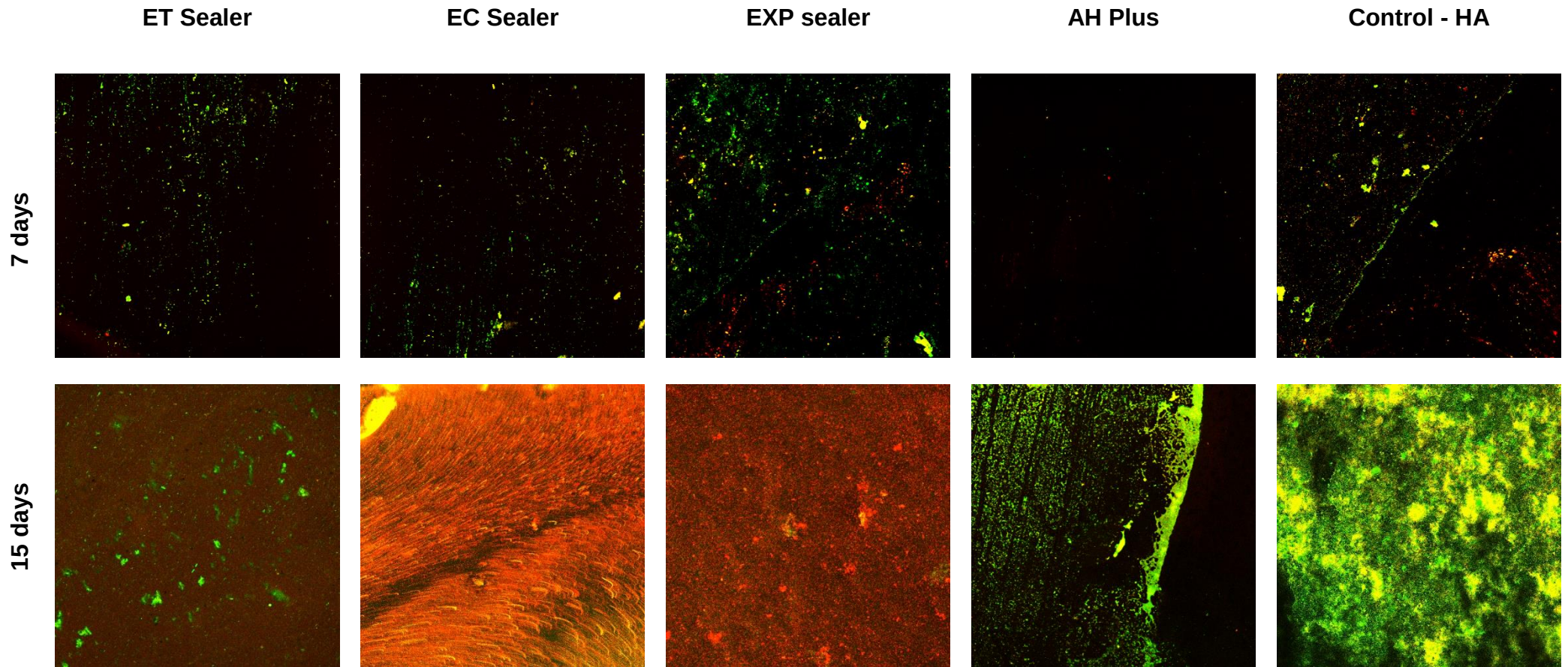


Fig 4. CLSM images of biofilms formed on the commercial and experimental materials at 7 and 15 days. Green fluorescence: viable bacteria; red fluorescence: dead bacteria.

5. Considerações Finais

As propriedades físico-químicas do cimento endodôntico experimental contendo metacrilatos metálicos de cálcio ou de dibutilestanho não foram drasticamente alteradas, sendo que foi notório o aumento do efeito antibiofilme do cimento com a adição destes monômeros contendo grupamentos metálicos. Além disso, tendo em vista o aumento da liberação de Ca^{2+} e Sn^{4+} , um efeito positivo pode ser esperado na resposta biológica do cimento modificado, o que deve ser investigado em mais estudos futuros.

6. Referências

ADDY, M. Plaque control as a scientific basis for the prevention of dental caries. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.79, n.Suppl 14, p.6–10, 1986.

AHMAD, M.S.; HUSSAIN, M.; HANIF, M.; ALI, S.; QAYYUM, M.; MIRZA, B. Di- and triorganotin (IV) esters of 3,4-methylenedioxyphenylpropenoic acid: synthesis, spectroscopic characterization and biological screening for antimicrobial, cytotoxic and antitumor activities. **Chemical Biology & Drug Design**. v.71, n.6, p.568–576, 2008.

ALANIA, Y.; CHIARI, M.D.; RODRIGUES, M.C.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; BRESSIANI, A.H.A.; VICHI, F.M.; BRAGA, R.R. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. **Dental Materials**, v.32, n.12, p.e374-e381, 2016.

ALMEIDA, L.H.; MORAES, R.R.; MORGENTAL, R.D.; CAVA, S.S.; ROSA, W.L.; RODRIGUES, P.; RIBEIRO, A.S.; SÓ, M.; PAPPEN, F.G. Synthesis of silver-containing calcium aluminate particles and their effects on a MTA-based endodontic sealer. **Dental Materials**. v.34, n.8, p.e214-223, 2018.

ALSHWAIMI, E.; BOGARI, D.; AJAJ, R.; AL-SHAHRANI, S.; ALMAS, K.; MAJEED, A. *In vitro* antimicrobial effectiveness of root canal sealers against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. **Journal of Endodontics**, v.42, p.1588–1597, 2016.

(ANSI/ADA) ANSIADA. **Specification 57: Endodontic Sealing Material**. In: Publishing A, editor. Chicago, IL, USA 2000.

ASSMANN, E.; BÖTTCHER, D.E.; HOPPE, C.B.; GRECCA, F.S.; KOPPER, P.M. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.41, n.1, p.62-66, 2015.

ATTRAMADAL, A.; SVATUN, B. *In vivo* antibacterial effect of tin on the oral microflora. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.92, n.2, p.161-164, 1984.

ATTRAMADAL, A.; NORDBO, H., ERIKSEN, H. M. Iron discoloration of acrylic resin exposed to chlorhexidine or tannic acid: a model study. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.49, n.1, p.126–129. 1983.

BARRY, JOHN E., JEFFREY A. TROGOLO, AND ELIZABETH A. PASTECKI. "Antimicrobial dental products." **U.S. Patent** No. 6,267,590. 31 Jul. 2001.

BRAGA, R.R. How far do calcium release measurements properly reflect its multiple roles in dental tissue mineralization? **Clinical Oral Investigation**, v.29, n.23, p.501, 2019.

BORGES, R.P.; SOUSA-NETO, M.D.; VERSIANI, M.A.; RACHED-JÚNIOR, F.A.; DE-DEUS, G.; MIRANDA, C.E.; PÉCORA, J.D. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. **International Endodontic Journal**, v.45, n.5, p.419-428, 2012.

BRAMER, E.A. Flue gas emission from FBC. **Coal Science Technology**, v. 22, p. 51, 1995.

CAMILLERI J, MONTESIN FE, CURTIS RV, FORD TR. Characterization of Portland cement for use as a dental restorative material. **Dental Materials**. v.22, n.6, p.569-75, 2006.

CARLIN, JR., JAMES F. Minerals Yearbook 2006: Tin. **United States Geological Survey**.

CARVALHO-JUNIOR, J.R.; CORRER-SOBRINHO, L.; CORRER, A.B.; SINHORETI, M.A.C.; CONSANI, S; SOUSA-NETO, M.D. Solubility and Dimensional Change after Setting of Root Canal Sealers: A Proposal for Smaller Dimensions of Test Samples. **Journal of Endodontics**, v.33, n.9, p.1110-1116, 2007.

CLARK, G. Shelf Life of Medical Devices, Guidance Document. Division of Small Manufacturers Assistance, **Food and Drug Administration**, 1991.

COCCO, A.R.; DA ROSA, W.L.O.; PERALTA, S.L.; MASKE, T.T.; DA SILVA, A.F.; HARTWIG, C.A.; MESKO, M.F.; PIVA, E.; LUND, R.G. New adhesive system based in metals cross-linking methacrylate. **Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials** v.77, n.1, p.519–526, 2018.

COLLARES, F.M. ; KLEIN, M. ; SANTOS, P.D. ; PORTELLA, F.F. ; OGLIARI, F. ; LEITUNE, V.C.B. ; SAMUEL, S.M.W. Influence of radiopaque fillers on physicochemical properties of a model epoxy resin-based root canal sealer. **Journal of Applied Oral Science**, v.21, n.6, p.533-539, 2013.

CRETELLA, G.; LAJOLO, C.; CASTAGNOLA, R.; SOMMA, F.; INCHINGOLO, M.; MARIGO, L. The Effect of Diode Laser on Planktonic *Enterococcus faecalis* in Infected Root Canals in an *Ex Vivo* Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.35, n.4, p.190-194, 2017.

DE PAZ, L.E.C. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1734-1739, 2009.

DUARTE, M.A.; MIDENA, R.Z.; ZEFERINO, M.A.; VIVAN, R.R.; WECKWERTH, P.H.; DOS SANTOS, F.; GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; TANOMARU-FILHO, M. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. **Journal of Endodontics**, v.35, n.9, p.1274–1277, 2009.

ELEY, B.M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. **Brazilian Dental Journal**, v.186, n.6, p.286–96, 1999.

ERSAHAN, S.; AYDIN, C. Dislocation resistance of iRoot SP, a calcium silicate-based sealer, from radicular dentine. **Journal of Endodontics**, v.36, n.12, p.2000-2002, 2010.

GANDOLFI, M.G.; PRATI, C. MTA and F-doped MTA cements used as sealers with warm gutta-percha. Long-term study of sealing ability. **International Endodontic Journal**, v.43, n.10, p.889-901, 2010

GARRIDO, A.D.; LIA, R.C.; FRANCA, S.C.; DA SILVA, J.F.; ASTOLFI-FILHO, S.; SOUSA-NETO, M.D. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaiferamultijuga* oil-resin. **International Endodontic Journal**, v.43, n.4, p.283–291, 2010.

GOMES-FILHO, J.E.; WATANABE, S.; LODI, C.S.; CINTRA, L.T.; NERY, M.J.; FILHO, J.A.; DEZAN, E. JR.; BERNABÉ, P.F. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. **Dental Traumatology**, v. 28, n. 6, p.452-456, 2012.

GROSSMAN, L. I. An improved root canal cement. **The Journal American Dental Association**, v.56, n.3, p. 381-5, 1958.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; DE FARIA-JÚNIOR, N.B.; DUARTE, M.A.H.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; GRAEFF, M.S.Z.; TANOMARU-FILHO, M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. **Journal of Endodontics**, v.39, n.3, p.346-350, 2013.

GÜVEN, E.P.; YALVAÇ, M.E.; KAYAHAN, M.B.; SUNAY, H.; ŞAHİN, F.; BAYIRLI, G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. **Journal of Applied Oral Science**, v.21, n.4, p.351-357, 2013.

GUVEN, E.P.; TASLI, P.N.; YALVAC, M.E.; SOFIEV, N.; KAYAHAN, M.B.; SAHIN, F. *In vitro* comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. **International Endodontic Journal**, v.46, n.12, p.1173–1182, 2013.

HIRAISHI, N.; LOUSHINE, R.J.; VANO, M.; CHIEFFI, N.; WELLER, R.N.; FERRARI, M.; PASHLEY, D.H., TAY, F.R. Is an oxygen inhibited layer required for bonding of resin-coated gutta-percha to a methacrylate-based root canal sealer? **Journal of Endodontics**, v.32, n.5, p.429-433, 2006.

HOLLAND, R.; DE SOUZA, V.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E.; OTOBONI FILHO, J.A.; JUNIOR, E.D.; MURATA, S.S. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **Journal of Endodontics**, v.28, n.3, p.173–6, 2002.

IKEMURA, K.; ENDO, T. A Review of our Development of Dental Adhesives-Effects of Radical Polymerization Initiators and Adhesive Monomers on Adhesion. **Dental Materials** v. 29, n.2, p.109–21, 2010.

ISO 6876:2012. Dentistry -- Root canal sealing materials. **International Organizations Standarts**, 2012.

MAENO, S.; NIKI, Y.; MATSUMOTO, H.; MORIOKA, H.; YATABE, T.; FUNAYAMA, A.; TOYAMA, Y.; TAGUCHI, T.; TANAKA, J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3d culture. **Biomaterials**, v.26, n.23, p.4847–4855, 2005.

MAROVIC, D.; TARLE, Z.; HILLER, K.A.; MULLER, R.; ROSENTRITT, M.; SKRTIC, D.; SCHMALZ, G. Reinforcement of experimental composite materials based on amorphous calcium phosphate with inert fillers. **Dental Materials**, v.30, n.9, p.1052-1060, 2014.

MEEREIS, C.T.W.; LEAL, F.B.; OGLIARI, F.A. Stability of initiation systems in acidic photopolymerizable dental material. **Dental Materials** v.32, n.7, p.889–98, 2016.

MISRA, D.N. Interaction of Citric or Hydrochloric Acid with Calcium Fluorapatite: Precipitation of Calcium Fluoride. **Journal of Colloid Interface Science**. v.220, n.2, p.387-391, 1999.

MORGENTAL, R.D.; VIER-PELISSER, F.V.; OLIVEIRA, S.D.; ANTUNES, F.C.; COGO, D.M.; KOPPER, P.M. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v.44, n.12, p.1128-1133, 2011.

NAGAS, E.; UYANIK, M.O.; EYMIRLI, A.; CEHRELI, Z.C.; VALLITTU, P.K.; LASSILA, L.V, DUMAZ, V. Dentin moisture conditions affect the adhesion of root canal sealers. **Journal of Endodontics**, v.38, n.2, p.240-244, 2012.

OLIVEIRA, A.C.; TANOMARU, J.M.; FARIA-JUNIOR, N.; TANOMARU-FILHO, M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 4, p. 370-375, 2011.

ORDINOLA-ZAPATA, R.; BRAMANTE, C.M.; CAVENAGO, B.; GRAEFF, M.S.Z.; DE MORAES, I.G.; MARCIANO, M.; DUARTE, M.A.H. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **International Endodontic Journal**, v.45, n.2, p.162-168, 2012.

ØRSTAVIK, D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. **Endodontic Topics**, v.12, n.1, p.25-38, 2005.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **Journal of Endodontics** v.36, n.1, p.16–27, 2010.

PENG, W.; LIU, W.; ZHAI, W.; JIANG, L.; LI, L.; CHANG, J.; ZHU, Y. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v.37, n.9, p.1240–1246, 2011.

RESENDE, L.M.; RACHED-JUNIOR, F.J.; VERSIANI, M.A.; SOUZA-GABRIEL, A.E.; MIRANDA, C.E.; SILVA-SOUSA, Y.T.; SOUSA NETO, M.D. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v.42, n.9, p.785-793, 2009.

ROSSATO, T.C.A.; GALLAS, J.A.; ROSA W.L.O.; DA SILVA, A.F.; PIVA, E; PERALTA, S.L; LUND, R.G. Experimental Sealers Containing Metal Methacrylates: Physical and Biological Properties. **Journal of Endodontics**, v.43, n.10, p.1725-1729, 2017.

SABBAGH, J.; NABBOUT, F.; JABBOUR, E.; LELOUP, G. The effect of expiration date on mechanical properties of resin composites. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v.8, n. 2, p.99-103, 2018.

SAMUI, A.B.; DALVI, V.G.; CHANDRASEKHAR, L.; PATRI, M.; CHAKRABORTY, B.C. Interpenetrating polymer networks based on nitrile rubber and metal methacrylates. **Journal of Applied Polymer Science**, v.99, n.5, p.2542-2548, 2006.

SHEN, Y.; ZHANG, H.; RUSE, N.D.; HAAPASALO, M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v.35, n.7, p.1051–1055, 2009.

SHEN, Q.; SUN, J.; WU, J.; LIU, C.; CHEN, F. An in vitro investigation of the mechanical-chemical and biological properties of calcium phosphate/calcium silicate/bismutite cement for dental pulp capping. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.94, n.1, p.141–148, 2010.

SODRÉ, C.S.; ALBUQUERQUE, P.P.A.C.; ISOLAN, C.P.; MORAES, R.R.; SCHNEIDER, L.F. Relative photon absorption determination and the influence of photoinitiator system and water content on C=C conversion, water sorption/solubility of experimental selfetch adhesives. **International Journal of Adhesion and Adhesive**, v.63, p.152–7, 2015.

SOUZA, A.O.; PEREIRA, C.C.; HELING, A.I.; ORESTE, E.Q.; CADORE, S.; RIBEIRO, A.S.; VIEIRA, M.A. Dermination of total concentration and bioaccessible fraction of metals in infant cereals by MIP OES. **Journal of Food Composition Analytics**, v.77, n.1, p 60–65, 2019.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, eds. Essential Endodontology. Prevention and Treatment of Apical Periodontitis. **Oxford: Blackwell**, 1998.

SVATUN, B. Plaque-inhibiting effect of dentifrices containing stannous fluoride. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.36, n.4, p. 205-210, 1978.

SVATUN, B; ATTRAMADAL, A. The effect of stannous fluoride on human plaque acidogenicity *in situ* (Stephan curve). **Acta Odontologica Scandinavica**, v.36, n.4, p. 211-218, 1978.

TABASSUM, S., PETTINARIA, C. Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy. **Journal of Organometallic Chemistry**. v.691, n., p.1761–1766, 2006.

TAŞDEMİR, T.; ER, K.; ÇELİK, D.; TAHAN, E.; SERPER, A.; CEYHANLI, K.T.; YEŞİLYURT, C. Bond strength of calcium silicate-based sealers to dentine dried with different techniques. **Medical Principles and Practice**, v.23, n.4, p.373-376, 2014.

TAKITA, T.; HAYASHI, M.; TAKEICHI, O.; OGISO, B.; SUZUKI, N.; OTSUKA, K.; ITO, K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. **International Endodontic Journal**, v.39, n.5, p.415-22, 2006.

TAY, F.R.; LOUSHINE, R.J.; MONTICELLI, F.; WELLER, R.N.; BRESCHI, L.; FERRARI, M.; PASHLEY, D.H. Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals. **Journal of Endodontics**, v.31, n.9, p.659-664, 2005.

VAIDYANATHAN, M.; SHEEHY, E.C.; GILBERT, S.C.; BEIGHTON, D. Antimicrobial properties of dentine bonding agents determined using in vitro and ex vivo methods **Journal of Dentistry**, v.37, n.7, p.514-521, 2009.

VERSIANI, M.A.; CARVALHO-JUNIOR, JR.; PADILHA, M.I.; LACEY, S.; PASCON, E.A.; SOUSA-NETO, M.D. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. **International Endodontic Journal**, v.39, n.4, p.464-471, 2006.

VERTUAN, G.C.; DUARTE, M.A.H.; MORAES, I.G.; PIAZZA, B.; VASCONCELOS, B.C.; ALCALDE, M.P.; VIVAN, R.C. Evaluation of physicochemical Properties of a New Root Canal Sealer. **Journal of Endodontics**. v.44, n.3, p.501-505, 2018.

VIAPIANA, R.; FLUMIGNAN, D.L.; GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; CAMILLERI, J.; TANOMARU-FILHO, M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, v.47, n.5, p.437-448, 2014.

YOST, K. G.; VANDEMARK, P. J. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* and *Leuconostoc mesenteroides* by sodium fluoride and ionic tin. **Applied Environment Microbiology**, v.35, n.5, p.920-924, 1978.

XIE, W. ; LIU, K. ; W, P. ; PAN, J. ; RILEY, T. Interaction between emissions of SO₂ and HCl in fluidized bed combustors. **Fuel** v.78, n.12, p.1425-1436, 1998.

XU, H.H.; MOREAU, J.L.; SUN, L.; CHOW, L.C. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. **Dental Materials**, v.27, n.8, p. 762-769, 2011.

WILTBANK, K.B.; SCHWARTZ, S.A.; SCHINDLER, W.G. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Journal of Endodontics**, v.33, n.10, p.1235-8, 2007.

WU, M.K.; FAN, B.; WESSELINK, P.R. Leakage along apical root fillings in curved root canals. Part I: Effects of apical transportation on seal of root fillings. **Journal of Endodontics**, v.26, n.4, p.210-216, 2000.

ZHANG, W.; LI, Z.; PENG, B. Assessment of a new root canal sealer's apical **sealing ability**. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.107, n.6, p.79-82, 2009.

ZHANG, H.; SHEN, Y.; RUSE, N.D.; HAAPASALO, M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v.35, n.7, p.1051-1055, 2009.

ZHANG, W.; LI, Z.; PENG, B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. **International Endodontic Journal**, v.43, n.9, p.769-774, 2010.

ZHOU HM, SHEN Y, ZHENG W, LI L, ZHENG YF, HAAPASALO M. Physical properties of 5 root canal sealers. **Journal of Endodontics**, v.39, n.10, p.1281–6, 2013.