



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

AMJAD ABU HASNA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA, CITOTOXICIDADE,
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RADIOPACIDADE DE
CIMENTOS BIOCERÂMICOS REPARADORES**

2021

AMJAD ABU HASNA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA, CITOTOXICIDADE, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E RADIOPACIDADE DE CIMENTOS BIOCERÂMICOS
REPARADORES**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos clínicos e laboratoriais de materiais e técnicas endodônticas.

Orientador: Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Abu Hasna, Amjad

Ação antimicrobiana, citotoxicidade, composição química e radiopacidade de cimentos biocerâmicos reparadores / Amjad Abu Hasna. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.

83 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: Cláudio Antonio Talge Carvalho.

1. Ação antibiofilme. 2. Agregado trióxido mineral. 3. Citotoxicidade. 4. Cinco óxidos minerais. 5. Composição química. I. Antonio Talge Carvalho, Cláudio, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Jose Luiz da Silva Lage Marques

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia

Campus de São Paulo

Prof. Dr. Carlos Henrique Ferrari

Centro Universitário Uningá

Instituição Hodos Pós Graduação

Campus Brasília

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de dezembro de 2021.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, *in memoriam*...? Não sei! Bom, tentar de novo:

Ao meu pai, meu eterno herói, meu exemplo maior, meu homem grande, meu humano perfeito, ao homem que possui o rosto mais feliz da vida, ao homem que possui o sorriso mais franco, os sentimentos mais verdadeiros, a alma mais pura, o abraço mais carinhoso, ao meu primeiro e único amigo, meu pai, sorria pai, eu estou alcançando o nosso sonho.

À minha mãe, esta mulher guerreira, que não cansa, que luta e faz o papel da mãe e do pai, que apoia sem fim, ama sem fim, e dá sem fim, te agradeço por ser quem você é.

Aos meus irmãos Ahmed, Majed e Aboud que junto a mim formam os quatros pilares que sustentam a casa do meu pai.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos-irmãos pelos anos que vivemos juntos, **Esteban Isaí Flores Orozco**, por ser a primeira pessoa a me dar apoio, sem me conhecer, sem saber meu nome, sem saber quem sou eu, por pura bondade apenas. Obrigado por ser um amigo verdadeiro, e um irmão de outra mãe, obrigado pelas viagens compartilhadas, palestras em dupla, festas, atendimentos, obrigado por ser companheiro. **Guilherme Schmitt de Andrade**, o namorado da minha amiga, como gosto de falar para te irritar, meu irmão, você sabe quem é você na minha vida acadêmica e pessoal, admiro a pessoa que você é, continue voando.

À minha amiga **Daiane Pereira**, a parceira, e a companheira, desde a época da especialização, e até hoje, não me largou, e espero que nunca largue. Nossos projetos sem fins virão.

Às minhas colegas e amigas da pós-graduação, **Rayana Durate Khoury**, a primeira parceira, no mestrado, no PAADES, no doutorado, nas disciplinas, nos projetos, nos artigos, obrigado por ser companheira nisso tudo. A **Cassia Cestari Toia**, a minha linda amiga, parceira de projetos, a sonhadora como ninguém e merecida como ninguém, obrigado pelos anos que vivemos juntos, e por mais anos que vivermos. A **Bruna e Giovanna**, as últimas a entrar no grupo de amigos de endodontia, todos nós ganhamos com vocês, ganhamos duas amigas lindas e maravilhosas. Obrigado a todas vocês pelos momentos bons que passamos juntos.

Ao meu amigo **Carlos Henrique Ferrari**, um colega, que se tornou amigo, irmão, parceiro, não é por nada, apenas por ele ser Carlos, a pessoa que ajuda sem esperar nada em troca, que se disponha por nada.

À minha querida amiga **Marina Gullo**, minha primeira amiga da UNESP e do Brasil, a primeira a falar comigo Português e Inglês, a primeira a me apresentar para os colegas da restauradora, obrigado por fazer parte da minha jornada.

Aos meus amigos, **Ingrid e Mauro**, o casal que me deu apoio desde o primeiro dia, o casal que esteve presente nos dias de conquistas batendo palmas para mim, e nos dias tristes dando apoio e compartilhando as forças, obrigado de coração.

Ao casal mineiro mais perfeito, **Jaiane e Ricardo**, obrigado por fazerem parte da minha vida pessoal e profissional, obrigado por me ensinar tanto, obrigado por estarem ao meu lado nos momentos difíceis e nos tempos leves.

Ao meu amigo, **Amir**, meu conterrâneo que compartilho com ele as boas lembranças da minha terra amada. Obrigado por fazer parte da minha jornada.

Ao meu orientador, Prof. Adj. **Cláudio Antonio Talge Carvalho**, essa pessoa que tornou o doutorado uma viagem leve, um aprendizado gostoso, uma caminhada que eu com certeza farei de novo, obrigado pela orientação, apoio e amizade.

À Profa. Tit. **Marcia Carneiro Valera**, a pessoa que não pode faltar na minha lista de agradecidos, desde o primeiro dia que me recebeu na UNESP com braços abertos, e me ensinou docência, me ensinou sobre a vida, corrigiu meu português, me ensinou a postura de um professor e pesquisador, me deu apoio e não largou mão, essa pessoa eu devo muito a ela do que eu me torno hoje, e não posso ser ingrato, só tenho que a agradecer.

À Profa. Adj. **Ana Paula Martins Gomes**, a pessoa que torna tudo leve e gostoso, a pessoa que eu trabalhei muito pouco junto, porém a que marcou muito a minha vida pessoal e profissional, a pessoa que não pode faltar na minha banca da defesa.

À Profa. Adj. **Luciane Dias de Oliveira**, a pessoa mais alegre da faculdade, a mais produtiva, prima de coração, agradeço por disponibilizar os seus laboratórios para eu executar este trabalho, agradeço a parceira nos projetos e nos artigos, muitos ainda para sair. Você é uma das pessoas que farão falta na minha banca.

Ao Prof. Adj. **Cesar Rogério Pucci**, o professor que deu total apoio para mim até saírem os nossos primeiros artigos, e que se tornou depois um amigo e parceiro, estou muito grato pela amizade. E ao Prof. Adj. **Eduardo Bresciani**, que faz falta na minha banca, mas a pessoa que eu mais admiro. Obrigado pelo apoio e pela amizade.

Ao Prof. Adj. **José Luiz Lage Marques**, o meu exemplo profissional com sua postura como professor, pesquisador e clínico. Agradeço todos os

ensinamentos passados durante o curso de especialização, e agradeço por aceitar fazer parte da minha banca.

Aos meus colegas, as professoras **Bruna, Mirian, e Taty**, e o professor **Enrico** que fazem meus dias mais leves, e fazem parte da minha vida profissional e pessoal, obrigado por tudo de coração.

Às minhas alunas, as pessoas que entraram há pouco tempo na minha vida, mas a tornaram alegre, a minha favorita **Lara**, meu orgulho imensurável. As preferidas, **Marina, Luma, Nathalia Marchetti e Nathalia Oliveira**, vocês são muito especiais na minha vida, tenho orgulho de cada uma de vocês.

Às minhas queridas orientadas, **Alana**, a pessoa que entrou na minha vida e a marcou; e a **Larissa Marques, Marcelle Simões e Ana Luisa Theodoro**, obrigado por me permitirem ser coorientador dos seus trabalhos, e obrigado por se tornarem amigas e colegas de profissão.

Aos meus amigos, **Lucas de Paula Ramos e Tiago Moreira**, obrigado pela parceria e todo apoio na execução do trabalho, sem vocês esse trabalho não seria concluído.

Ao Prof. Adj. **Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes**, obrigado pelo apoio e parceria na execução do trabalho.

Aos colegas **Carolina, Caroline, Felipe, Fernando, Gustavo e Thaís**, e ex-colegas de pós-graduação **Tatiane Sampaio Bittencourt, Diego Rabello, e Miguel Christian Castillo**, obrigado pela amizade.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Adj. **Alexandre Luiz Souto Borges**. Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora. Agradeço pela oportunidade de ser um discente do programa.

À CAPES pela concessão de bolsa.

“Felizmente, eu ando na montanha e
olho de cima para as nuvens em baixo”

Mahmoud Darwish

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Agregado trióxido mineral "MTA".....	19
2.1.1 Ação antimicrobiana do MTA.....	20
2.1.2 Citotoxicidade do MTA.....	21
2.1.3 Composição química e radiopacidade do MTA.....	23
2.2 Agregado trióxido mineral reparador de alta plasticidade.....	25
2.3 Cimento de cinco óxidos minerais "5MO"	26
3 PROPOSIÇÃO.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Avaliação da ação antimicrobiana dos cimentos.....	30
4.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) dos grupos experimentais.....	30
4.1.2 Avaliação da atividade antibiofilme dos grupos experimentais pelo teste de MTT.....	33
4.2 Avaliação da citotoxicidade dos grupos experimentais.....	33
4.3 Avaliação da composição química dos cimentos biocerâmicos.....	38
4.3.1 Análise dispersiva de energia por raio X (EDAX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
4.3.2 Difração de raios-X.....	40
4.4 Avaliação da radiopacidade dos cimentos biocerâmico	40
4.5 Análise estatística.....	42

5 RESULTADO.....	43
5.1 Avaliação antimicrobiana dos cimentos.....	43
5.1.1 CIM e CMM dos cimentos.....	43
5.1.2 A viabilidade celular dos microrganismos em biofilmes pelo teste de MTT.....	43
5.2 A citotoxicidade pelo teste de MTT.....	46
5.3 Avaliação da composição química dos cimentos biocerâmico.....	50
5.3.1 Análise dispersiva de energia por raio X (EDAX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
5.3.2 Difração de raio X (DRX).....	57
5.4 Avaliação da radiopacidade dos cimentos biocerâmico.....	58
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5MO	Cinco óxidos minerais
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CIM	Concentração inibitória mínima
CMM	Concentração microbicida mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DO	Densidade óptica
DRX	Difração de raios-X
EDS/ EDAX	Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTA	Agregado trióxido mineral
MTA HP	Agregado trióxido mineral reparador de alta plasticidade (<i>Mineral Trioxide Aggregate Repair HP</i>)
NaCl	Solução fisiológica
NaOCl	Hipoclorito de sódio
PBS	tampão fosfato-salino
SFB	Soro fetal bovino
solução de MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide

Abu Hasna A. Ação antimicrobiana, citotoxicidade, composição química e radiopacidade de cimentos biocerâmicos reparadores [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

Os cimentos biocerâmicos possuem diversas aplicações clínicas na área de endodontia. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana do cimento de cinco óxidos minerais “5MO”, do agregado trióxido mineral “MTA” que já é um material consagrado, como também do agregado trióxido mineral reparador de alta plasticidade “MTA HP”, e comparar a capacidade dos mesmos na eliminação de microrganismos anaeróbios, comumente encontrados em infecções endodônticas primárias por meio de teste de MTT; avaliar e comparar também a biocompatibilidade dos mesmos através testes de citotoxicidade de MTT sobre cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) e osteoblastos (MG-63); avaliar a composição química dos mesmos através da microscopia eletrônica de varredura “MEV” acoplada a espectroscopia de raios X por dispersão em energia “EDS ou EDAX” e avaliar a fase por difração de raios-X “DRX”; além de avaliar a sua radiopacidade. Neste estudo, foi observada a atividade antibiofilme efetiva dos grupos experimentais sobre alguns microrganismos anaeróbios incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*, por outro lado, os mesmos foram biocompatíveis sobre os macrófagos e osteoblastos após 5 min de contato. Além disso, foram encontrados principais componentes químicos em que a presença de titânio, enxofre e potássio e a ausência de tungstênio no 5MO o torna diferente do MTA e do MTA HP, e a presença de estrôncio no MTA HP o torna diferente do 5MO e do MTA. Todos os biocerâmicos avaliados apresentaram uma radiopacidade adequada para serem utilizados clinicamente de acordo com o protocolo para radiopacidade de materiais dentários, publicado pela *International Standards Organization (ISO)*. Sendo assim, os cimentos biocerâmicos 5MO, MTA HP, e MTA possuem ação antimicrobiana efetiva contra todos os microrganismos anaeróbios analisados, são biocompatíveis, possuem componentes químicos em comum, e possuem radiopacidade adequada para o uso clínico de material dentário.

Palavras-chave: Ação antibiofilme. Agregado trióxido mineral. Cinco óxidos minerais. Citotoxicidade. Composição química. Radiopacidade.

Abu Hasna A. Antimicrobial action, cytotoxicity, chemical composition and radiopacity of reparative bioceramic cement. [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

Bioceramic cements have several clinical applications in endodontics. This study aimed to evaluate the antimicrobial action of the cement of five mineral oxides "5MO", mineral trioxide aggregate "MTA" which is already an established material, as well as the mineral trioxide aggregate repair high plasticity "MTA HP", and to compare their ability to eliminate anaerobic microorganisms, commonly found in primary endodontic infections by means of MTT test; to evaluate and compare their biocompatibility through MTT cytotoxicity tests on mouse macrophage cultures (RAW 264.7) and osteoblasts (MG-63); evaluate their chemical composition through scanning electron microscopy "SEM" coupled with energy dispersion X-ray spectroscopy "EDS or EDAX" and evaluate the phase by X-ray diffraction "XRD"; in addition to evaluating its radiopacity. In this study, all tested bioceramic cements were effective over some anaerobic microorganisms including Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Parvimonas micra, Fusobacterium nucleatum and Prevotella intermedia, on the other hand, they were biocompatible on macrophages and osteoblasts after 5 minutes of contact. In addition, main chemical components were found in which the presence of titanium, sulfur and potassium and the absence of tungsten in 5MO makes it different from MTA and MTA HP, and the presence of strontium in MTA HP makes it different from 5MO and MTA. All evaluated bioceramic cements presented adequate radiopacity to be used clinically according to the protocol for radiopacity of dental materials, published by the International Standards Organization (ISO). Thus, 5MO, MTA HP, and MTA bioceramic cements have effective antimicrobial action against all tested anaerobic microorganisms, are biocompatible, have chemical components in common, and have adequate radiopacity for the clinical use of dental material.

Keywords: Anti-biofilm action. Mineral trioxide aggregate. Five mineral oxides. Cytotoxicity. Chemical composition. Radiopacity.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico conservador visa proteger a polpa exposta através da indução da formação de dentina secundária (Pincemaille, 1950) considerando a capacidade de tecido pulpar inflamado em regenerar e formar um tecido mineralizado (Bubenik, 1954) aplicando o conceito chamado “capeamento pulpar” (Nyborg, 1955) que é uma técnica conhecida desde o século XVIII como a aplicação de um material não irritante sobre uma polpa ferida para desinflamar o tecido pulpar (*not stirring up the fire*) e manter o dente funcional (Barrett, 1877), acreditando-se que a pressão criada ao cobrir a polpa agredida com um material bioativo apresentaria um efeito fundamental no reparo da mesma (Kalnins, 1957).

Na endodontia contemporânea, o capeamento pode ser indireto sobre uma estrutura fina de dentina sem exposição pulpar, ou direto sobre uma polpa exposta (Swift, Trope, 1999). Por outro lado, a pulpotomia é a remoção da polpa coronária mantendo a polpa radicular (Tobin, 1946). Todos esses procedimentos encaixam-se sob a técnica de apicogênese visando o desenvolvimento fisiológico contínuo e a formação final da raiz de dentes com rizogênese incompleta que possuem uma polpa viva que sofreu alguma irritação patológica (Tenca, Tsamtsouris, 1978).

Já para a polpa necrosada, apicificação é a técnica de escolha, na qual um dente permanente imaturo não vital, que perdeu sua capacidade de desenvolvimento radicular, é induzido a formar uma barreira calcificada (Torabinejad, Walton, 2009). Por outro lado, outra técnica mais contemporânea está ganhando um espaço aumentado na endodontia regenerativa, é conhecida como revascularização visando o restabelecimento da vascularização no espaço pulpar após lesões traumáticas (Andreasen et al., 2018) por meio da aplicação de

um material bioativo sobre um coágulo sanguíneo estimulado (Iwaya et al., 2001), visando restaurar a vascularização (Huang, Lin, 2008), permitindo assim a diferenciação de células tronco a formar tecidos igual a dentina (Torabinejad, Walton, 2009).

O agregado trióxido mineral “MTA” é um material reparador bioativo derivado do cimento de Portland (Torabinejad, 1993), que tem sido efetivo em vários procedimentos clínicos como um material reparador e regenerador, servindo efetivamente em diversas situações clínicas de apicogênese incluindo o capeamento pulpar e como material reparador em casos de ápice incompleto onde necessita de tratamento endodôntico parcial (pulpotomia) (Dammachke et al., 2010; Moradi et al., 2006; Linsuwanont et al., 2017), além disso, é indicado para a mesma finalidade em casos de polpa necrosada, tanto para apicificação (Linsuwanont et al., 2018) quanto para revascularização pulpar (Saeki et al., 2014; Yadav et al., 2015). Uma outra aplicação do MTA é como material de selamento de perfurações laterais e em furcas (Alsulaimani, 2018; Lee et al., 1993).

O MTA foi escolhido após décadas do uso do cimento de hidróxido de cálcio “Ca(OH)₂” que foi amplamente estudado para avaliar a sua eficácia como material reparador no manejo de casos de rizogênese incompleta incluindo pulpotomia e capeamento pulpar apresentando resultados interessantes (Cvek, 1972; Schröder, 1972). O Ca(OH)₂ foi o material de escolha após vários estudos que aprovaram a sua ação regeneradora e reparadora (Cvek, 1972; Matsuzaki et al., 1990) até o surgimento do MTA.

Uma novidade nesta área é o cimento de cinco óxidos minerais “5MO” que também é um material derivado do cimento de Portland, que foi desenvolvido para tratar vários tipos de acidentes e complicações endodônticas. O 5MO também demonstrou ser efetivo em casos de capeamento pulpar quando comparado ao cimento de Ca(OH)₂ (Dycal) (Ala Rachi et al., 2014), sendo

interessante ampliar os estudos sobre este cimento inovador. Além do agregado trióxido mineral reparador de alta plasticidade (*Mineral Trioxide Aggregate Repair HP*) “MTA HP”, um cimento à base de silicato, de alta plasticidade e propriedades físicas aumentadas (Silva et al., 2016) com biocompatibilidade e biomineralização semelhante ao MTA (Cintra et al., 2017), apresentando também um grau adequado de compatibilidade celular com células-tronco da polpa dental humana (Tomás-Catalá et al., 2018).

Os cimentos reparadores endodônticos têm demonstrado comportamento clínico eficiente comprovado em diversos estudos (Abu Hasna et al. 2020c, Ala Rachi et al., 2014; Al-Nahlawi et al., 2021; Alsulaimani, 2018; Cintra et al., 2017; 2020^a; Matsuzaki et al., 1990), no entanto, a ação antimicrobiana destes materiais sobre bactérias de importância odontológica tem sido pouco explorada. A ação antimicrobiana é um fator extremamente relevante que deve ser avaliada devido a importância da desinfecção e de manter a assepsia da região selada com estes cimentos para garantir o sucesso do tratamento endodôntico (Delboni et al., 2017). É importante destacar que existe uma relação entre a infecção polimicrobiana dos canais radiculares, especialmente causada por bactérias anaeróbias estritas dos gêneros *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Dialister* e *Treponema*, e facultativas do gênero *Streptococcus* com os sinais e sintomas clínicos (Siqueira, Rôças, 2013). E mais especificamente, no perfil microbiano da infecção endodôntica primária foi observada a presença de diversos microrganismos anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* entre outros (Machado et al., 2020), tornando-se assim importante estudar a ação antimicrobiana dos cimentos reparadores sobre estes microrganismos.

Por outro lado, apesar do sucesso clínico apresentado pelo MTA, MTA

HP e 5MO (Ala Rachi et al., 2014; Alsulaimani, 2018; Cintra et al., 2017), ainda faltam estudos sobre a biocompatibilidade do MTA HP e 5MO sendo que a biocompatibilidade é de extrema importância e deve ser avaliada por ter efeito direto sobre o êxito desse tipo de tratamento endodôntico (Schweickl et al., 2006). Portanto, o teste de citotoxicidade pode ser realizado para avaliar a atividade metabólica das células que ficarão em contato com os materiais (Camilleri, Pitt Ford, 2006; Williams, 2008; Peng et al., 2021).

A composição química destes materiais é um outro fator relevante a ser explorado para entender o seu comportamento e a sua reação com os outros materiais (Khan et al., 2016). A composição química possui efeito direto no pH do material e nas substâncias que podem ser liberadas durante esta reação como íons de cálcio, arsênio e chumbo (Camilleri et al., 2012; Nassar et al., 2020; Sáez et al., 2017). Por outro lado, a composição química dos cimentos afeta diversas propriedades físicas como o tempo de cura ou endurecimento do material, a alteração cromática de dentes causada pelos cimentos, a radiopacidade dos cimentos para diferenciá-los radiograficamente de outros materiais e outras estruturas adjacentes (Ber et al., 2007; Borges et al., 2011; Guimarães et al., 2015), além de outras propriedades físicas como microdureza, capacidade de selamento e infiltração marginal (Aksel et al., 2018; Camargo et al., 2012).

Diante do exposto, nota-se a necessidade de avaliar ação antimicrobiana, citotoxicidade, análise morfológica, composição química e radiopacidade do cimento 5MO, em comparação com os cimentos MTA HP e MTA. Podendo, assim, contribuir com a comunidade acadêmica no uso de mais alternativas de cimentos reparadores que possam proporcionar resultados clínicos promissores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agregado trióxido mineral

É um material reparador que foi lançado primeiramente em 1993 como um material de selamento de perfurações laterais da raiz dentária, comparado à amálgama e um cimento restaurador intermediário de óxido de zinco-eugenol (IRM) em que foi concluído que o MTA mostrou o melhor comportamento, a menor infiltração marginal e a menor tendência de extravasamento (Lee et al., 1993). No mesmo ano e nos próximos dois anos, o MTA foi estudado como material de preenchimento da extremidade da raiz (*plug*) avaliando a sua capacidade de selamento, infiltração por corante, e a infiltração bacteriana respectivamente (Torabinejad et al., 1993, 1994, 1995d). Além disso, o MTA foi estudado amplamente depois avaliando a sua capacidade em fechamento das perfurações na região da furca (Ford et al., 1995), a sua adaptação marginal e suas propriedades físicas e químicas (Torabinejad et al., 1995a, 1995e).

Os resultados positivos relatados nos últimos estudos por diversos autores chamaram a atenção ao MTA a ser estudado de forma mais extensa apresentando o MTA como material reparador novo, inventado pelo professor Mahmoud Torabinejad, tendo um grande impacto na prática endodôntica e melhorando a taxa de sucesso em todos os consultórios odontológicos mundialmente (Asgary et al., 2013) após a sua aprovação pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos Americanos (*The United States Food and Drug Administration* - FDA) em 1998 e o seu lançamento no mercado em 1999 primeiramente pela Dentsply Tulsa (Dentsply Tulsa, Johnson City, TN) com o nome ProRoot MTA nos Estados Unidos Americanos (Schmitt et al.,

2001), e posteriormente no Brasil pela Angelus (Angelus, Londrina, Brasil) como nome comercial Angelus MTA em 2001 e sendo aprovado pela FDA em 2011.

2.1.1 Ação antimicrobiana do MTA

A ação antimicrobiana do MTA foi avaliada sobre nove bactérias facultativas incluindo: *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, e *Escherichia coli B* e sete bactérias anaeróbicas estritas incluindo: *Prevotella buccae*, *Bacteroides fragilis*, *P. intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium necrophorum*, *F. nucleatum* e *Peptostreptococcus anaerobius* comparado à amálgama, óxido de zinco-eugenol (IRM) e Super EBA em que foi concluído que o MTA teve um efeito antibacteriano em algumas das bactérias facultativas e nenhum efeito em qualquer uma das bactérias anaeróbicas estritas (Torabinejad et al., 1995b).

Além disso, a ação antimicrobiana do MTA foi avaliada em comparação ao Ca(OH)_2 sobre *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, e contra *Candida albicans* e o Ca(OH)_2 mostrou-se mais efetivo (Estrela et al., 2000). Porém, (Al-Hezaimi et al., 2005) concluíram que o MTA tanto o nacional (Angelus) quanto o ProRoot apresentam um poder antimicrobiano efetivo contra *S. mutans*, *Streptococcus sanguis* e *S. salivarius*. Além disso, (Ribeiro et al., 2010) concluíram que o MTA em condições aeróbicas provocou atividade antimicrobiana por indução de espécies reativas de oxigênio.

Associar o MTA com outros materiais como óxido de zircônio (ZrO_2),

pentóxido de nióbio (Nb₂O₅), nanopartículas de hidroxiapatita (HAN) e nanopartículas de prata (AgNPs) foi relatado na literatura, aumentado assim a sua ação antimicrobiana (Guerreiro Tanomaru et al., 2014, 2016; Vazquez-Garcia et al., 2016).

(Prestegaard et al., 2014) avaliaram o efeito antimicrobiano do MTA sozinho sem outras associações comparado o Ca(OH)₂ sobre *E. faecalis* verificando que o Ca(OH)₂ foi mais efetivo. Além disso, outros estudos mostraram que o MTA como material reparador possui um poder antimicrobiano limitado (Farrugia et al., 2017) e não é eficaz contra biofilme de microcosmo multiespécies (Jardine et al., 2019).

2.1.2 Citotoxicidade do MTA

A citotoxicidade do MTA foi avaliada em comparação com a amálgama, óxido de zinco-eugenol IRM e Super EBA em que foi concluído que o MTA foi o menos tóxico seguido por amálgama, Super EBA e óxido de zinco-eugenol IRM sobre células L929 de camundongo (Torabinejad et al., 1995c). Comparando o efeito citotóxico dos mesmos materiais sobre fibroblastos de ligamento periodontal humano, o Super EBA e o MTA foram os menos tóxicos após exposição de 24 h (Keiser et al., 2000). Inversamente, um outro estudo avaliou o efeito do MTA, óxido de zinco-eugenol IRM, amálgama, e Retroplast sobre fibroblastos e macrófagos de camundongo e mostrou após 24 h resultados negativos, em que todos os materiais avaliados inibiram a proliferação celular (Haglund et al., 2003). De Deus et al. (2005) verificaram que a citotoxicidade do MTA diminui-se com o tempo permitindo o restabelecimento da cultura celular.

Diversos radiopacificadores foram adicionados ao MTA, assim a sua citotoxicidade foi estudada, em que o óxido de bismuto, o mais utilizado com o cimento de Portland, encontra-se biocompatível com as células imortalizadas do ligamento periodontal humano por 10 min (Kim et al., 2008) e com o tecido conjuntivo subcutâneo por 7 e 60 dias (Coutinho-Filho et al., 2008). Assim, outro estudo relatou a biocompatibilidade de pentóxido de nióbio (Nb_2O_5) como outro radiopacificador associado com o cimento de Portland (Silva et al., 2015).

Nos anos seguintes, diversos estudos relatados na literatura mostraram que o MTA não possui citotoxicidade ou um leve grau de citotoxicidade sobre diversas linhagens de células utilizando métodos de avaliação diferentes (Asgary et al., 2012; Chang et al., 2014; Saberi et al., 2016; Rodríguez-Lozano et al., 2017; Yoshino et al., 2013).

Porém, em um estudo mais recente sugeriu que existe um possível efeito citotóxico do MTA ao tecido pulpar quando há contato direto (Tsai et al., 2018), ainda, outro estudo revelou que o MTA possui um grau de citotoxicidade sobre células-tronco da polpa dentária (Youssef et al., 2019), porém sobre a mesma linhagem de células, um outro estudo mostrou que o MTA é biocompatível (Omidi et al., 2020). Assim, torna-se necessário um estudo mais atual sobre a citotoxicidade do MTA sobre linhas diferentes de células humanos de interesse odontológico.

2.1.3 Composição química e radiopacidade do MTA

Na patente do MTA foi descrito que o mesmo consiste em 50-75% (em peso) de óxido de cálcio e 15-25% de dióxido de silício. O óxido de bismuto foi adicionado para proporcionar radiopacidade ao material (Torabinejad, 1993), o mesmo autor e o inventor do MTA no seu primeiro estudo avaliando a composição química do MTA concluiu que o mesmo possui íons de cálcio e fósforo como moléculas principais e que o MTA é mais radiopaco do que Super-EBA e óxido de zinco-eugenol IRM (Torabinejad et al., 1995a).

O MTA é um cimento biocerâmico derivado do cimento de Portland, a diferença na composição química entre os dois é a presença do óxido de bismuto no MTA (Estrela et al., 2000). O MTA cinza foi a primeira versão lançada comercialmente (Schmitt et al., 2001) e causava um escurecimento dos dentes tratados, assim, sugeriu-se a criação e o lançamento de uma nova versão da cor do dente (*tooth colored MTA*) ou a conhecida comercialmente como a versão branca para evitar o potencial escurecimento do MTA cinza por motivos cosméticos (Holland et al., 2002). Porém, a composição química entre as duas versões, cinza e branca, é a mesma sem diferença significativa exceto ao trióxido de alumínio (Al_2O_3), óxido de magnésio (MgO) e, especialmente, óxido de ferro (FeO) que se-encontram mais concentrados na MTA cinza (Asgary et al., 2005).

Não há diferença significativa na radiopacidade entre o MTA cinza e branco, porém, essa radiopacidade é maior do que a do cimento de Portland. Apesar da diferença na composição química entre as duas versões do MTA, e entre o MTA e o cimento de Portland (Islam et al., 2006). A composição química do MTA foi alterando como é observado nos estudos encontrados na

literatura, em que ausência de íons bismuto e presença de íons potássio eram as principais diferenças entre o MTA e o cimento de Portland, e a quantidade significativa de ferro encontrada no MTA cinza quando comparado ao MTA branco (Song et al., 2006).

Essa diferença na composição entre o MTA e o cimento de Portland, chamou atenção dos pesquisadores de associar o óxido de bismuto ao cimento de Portland e avaliar os resultados, em que o primeiro estudo relatou que adicionar 20% de óxido de bismuto ao cimento de Portland tem maior potencial para ser usado como alternativa ao MTA (Kim et al., 2008). Outro estudo afirmou que ainda o MTA possui radiopacidade maior (Coutinho-Filho et al., 2008) e que o MTA branco e o cimento Portland branco com óxido de bismuto 15% apresentaram a radiopacidade necessária para um cimento endodôntico (Bueno et al., 2009) sugerindo assim essa associação como alternativa viável ao MTA (Hwang et al., 2009).

Outros radiopacificadores, além do óxido de bismuto, foram sugeridos como sulfato de bário, dióxido de titânio, óxido de zinco, pó de ouro e liga de prata / estanho em que os melhores resultados foram encontrados com a liga de prata / estanho e o pó de ouro (Camilleri, Gandolfi 2010) e em outros estudos foram sugeridos o pentóxido de nióbio “Nb₂O₅” como radiopacificador alternativo (Mestieri et al., 2014), o óxido de zircônio (ZrO₂) (Guerreiro Tanomaru et al., 2014), nanopartículas de hidroxiapatita (HAn) (Guerreiro Tanomaru et al., 2016) e nanopartículas de prata (AgNPs) (Vazquez-Garcia et al., 2016), em que todos apresentaram resultados promissores para a radiopacidade e as propriedades físicas e biológicas do cimento de Portland

A composição química do MTA possui efeito direto no seu potencial de escurecimento, assim como o veículo que reage com o MTA (Guimarães et al., 2015). Entretanto, mesmo com o surgimento do MTA branco ainda continuou a

causar escurecimento nos dentes tratados (Salem-Milani et al., 2017), por isso foi sugerida uma adição de óxido de zinco ZnO em várias concentrações a fim de inibir a alteração cromática dentária sem interferir na radiopacidade do MTA (Marciano et al., 2017).

O veículo utilizado na manipulação do MTA possui efeito também na sua composição química, em que os precipitados formados após manipular com água destilada são principalmente o carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio, enquanto o precipitado após manipular com a solução tampão fosfato-salina “PBS” foi o fosfato de cálcio amorfo (Han et al., 2010). Por outro lado, a técnica de manipulação manual ou mecânica também altera os precipitados formados (Basturk et al., 2018).

2.2 Agregado trióxido mineral reparador de alta plasticidade “MTA HP”

É uma nova versão do MTA que possui alta plasticidade segundo o fabricante. Segundo (Cintra et al., 2017), o MTA HP foi avaliado em comparação com os dois MTA convencionais, MTA Angelus e ProRoot MTA, sobre linhagem de fibroblastos L929 e o MTA HP apresentou biocompatibilidade semelhante ao MTA Angelus e aumento da viabilidade dos fibroblastos em comparação ao mesmo cimento após um período mais longo. Além disso, o efeito do MTA HP sobre a viabilidade celular das células-tronco da polpa dental humana demonstrou aumento adequado na viabilidade celular e a análise por MEV revelou um alto grau de proliferação e fixação celular comparado com várias versões do MTA (Tomás-Catalá et al., 2017). Em outro estudo realizado pela mesma equipe, e comparando o MTA HP com outros

cimentos biocerâmicos, concluiu-se que o MTA HP apresentou grau adequado de citotoxicidade com o mesmo tipo de células-tronco e com bom grau de migração celular (Tomás-Catalá et al., 2018). Outro estudo revelou que o MTA e MTA HP mantiveram a viabilidade celular de osteoblastos e além disso, pela análise do MEV foi observado um alto grau de proliferação celular (Ferreira et al., 2019). A sua ação antimicrobiana foi avaliada em comparação com outro cimento biocerâmico (iRoot BP Plus) sobre bactéria aeróbia e anaeróbia em que o último foi mais efetivo (ElReash et al., 2019).

O MTA HP possui uma radiopacidade igual à do MTA convencional dada pela presença do radiopacificador tungstato de cálcio (Guimarães et al., 2018; Ferreira et al., 2019). Além disso, é considerado como material bioativo devido à presença aumentada de aluminato de cálcio e a sua habilidade rápida e eficaz em formação de revestimento de superfície de fosfato de cálcio cristalino (Jiménez-Sánchez et al., 2019a, 2019b).

Conforme o fabricante (Angelus), a principal diferença entre o MTA e MTA HP é na substituição da água destilada por um líquido que contém água e mais um plastificante orgânico que dá ao produto uma alta plasticidade e a substituição do radiopacificador (de Óxido de Bismuto para Tungstato de Cálcio), garantindo a ausência de descoloração dental.

2.3 Cimento de cinco óxidos minerais “5MO”

O 5MO é um cimento odontológico reparador desenvolvido para tratar todos os acidentes e complicações endodônticas. O 5MO mostrou eficiência em casos de capeamento pulpar comparado ao Ca(OH)_2 Dycal. Este material é semelhante ao MTA (ProRoot), desenvolvido pelo Dr. Maysour Ala Rachi

(Número da patente Síria: 5770) (Ala Rachi et al., 2014).

Poucos estudos na literatura foram desenvolvidos para investigar o 5MO e suas propriedades físicas, biológicas e químicas. Na literatura consultada, há dois relatos de casos clínicos utilizaram o 5MO como material de preenchimento da extremidade da raiz “*plug*” após realizar apicectomia. O primeiro caso de um dente adjacente de um odontoma complexo em que não foram observados sinais e sintomas de inflamação ao longo de doze meses de controle, porém, com neoformação óssea observada radiograficamente na região da lesão. Portanto, foi concluído que o 5MO parece ser um cimento biocerâmico eficaz com características reparadoras (Flores Orozco et al., 2019). O outro relato de caso é de um dente com perfuração lateral onde foi feita apicectomia e descontaminação com o auxílio da terapia fotodinâmica. Neste caso foi observada uma neoformação óssea na região periapical do dente e boa adaptação marginal após 12 meses e foi concluído que o 5MO é eficaz em induzir o reparo da lesão periapical e selamento da área periapical exposta do dente, sugerindo que o sucesso alcançado dependeu principalmente da desinfecção do canal radicular e do sítio cirúrgico alcançado com o auxílio da terapia fotodinâmica antimicrobiana usando o azul de metileno com fotossensibilizador junto com laser diodo de baixa potência (Abu Hasna et al., 2020c).

O 5MO foi comparado ao MTA como material de capeamento pulpar em 96 dentes anteriores de cães saudáveis. Ambos os materiais de capeamento pulpar foram utilizados nas cavidades classe V que foram preparadas nos dentes. Após a exposição da polpa, os materiais de capeamento pulpar foram aplicados diretamente na polpa exposta. Após 7 e 90 dias, os animais foram sacrificados e os espécimes foram examinados em microscópio óptico de luz para estimar a quantidade de inflamação pulpar e formação de dentina na interface do material de capeamento. Não houve diferença significativa entre os materiais MTA e 5MO em termos de resposta pulpar, formação de tecido duro e preservação de

tecido pulpar normal. Pela avaliação histológica: após 7 dias de capeamento pulpar direto, ambos os grupos apresentam inflamação severa e moderada, sem formação de dentina. Após 90 dias de capeamento pulpar direto, uma ponte calcificada foi formada diretamente abaixo do material de capeamento no local da lesão em ambos os grupos MTA e 5MO; ambos os grupos não mostraram sinais de inflamação. Sendo assim, foi concluído que não há diferença significativa entre MTA e 5MO quando usado como material de capeamento pulpar direto (Darweesh et al., 2020).

Em outro relato de caso mais recente, o 5MO foi testado com material para preenchimento de duas perfurações (furca e broca de pino) de canal radicular e induzir cicatrização clínica e radiográfica nos tecidos periodontais com / sem o uso de matriz esponjosa de colágeno, o 5MI foi efetivo em ambos os casos após acompanhamento de três anos (Al-Nahlawi et al., 2021).

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os cimentos 5MO, MTA HP e MTA quanto:

- a) ação antimicrobiana sobre bactérias anaeróbias de interesse endodôntico: *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. micra*, *F. nucleatum* e *P. intermedia* na forma planctônica e em biofilme;
- b) citotoxicidade utilizando cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) e osteoblastos (Mg-63);
- c) análise morfológica por meio da MEV;
- d) análise da composição química e estrutura por meio de EDS/EDAX e avaliação da fase por DRX;
- e) análise da radiopacidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação antimicrobiana dos cimentos

4.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) dos grupos experimentais

Cinco cepas diferentes de *P. gingivalis* (ATCC 33277), *P. endodontalis* (ATCC 35406), *P. micra* (ATCC 23195), *F. nucleatum* (ATCC 25586) e *P. intermedia* (ATCC 33563). Os inóculos preparados a partir do crescimento de cultura de 24 h incubadas em câmara de anaerobiose Whitley DG250 Workstation (*Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, BD17 7SE, Reino Unido*) em ágar Brucella (Himedia, Mumbai, Índia) enriquecido com sangue. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro (Espectrofotômetro visível V-5000, Shanghai Metash Instruments Co., Ltd, China) (1×10^8 cells / mL), sendo que a densidade óptica foi 600 nm para todos e o comprimento da onda foi 0,80 nm para todos os microrganismos exceto ao *F. nucleatum* que foi 1,0 nm.

Os grupos experimentais foram: I) solução salina (grupo controle negativo) (Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil); II) hipoclorito de sódio “NaOCl” 2,5% (Biodinâmica, Iporã, PR, Brasil) (grupo controle positivo); III) 5MO (Golden Yatti LLC Muscat, Omã) que foi manipulado conforme as instruções do fabricante (Quadro 1) na proporção 0,085 g pó / 0,25 ml líquido (aproximadamente 3×Pó : 1×líquido); IV) MTA HP (Angelus, Londrina, Brasil) que foi manipulado conforme as instruções do fabricante (Quadro 1) na

proporção 0,085 g pó / 0,25 ml líquido (aproximadamente 3×Pó : 1×líquido); e V) MTA (Angelus, Londrina, Brasil) foi manipulado conforme as instruções do fabricante (Quadro 1) na proporção 0,085 g pó / 0,25 ml líquido (aproximadamente 3×Pó : 1×líquido).

Quadro 1 - A composição química dos cimentos testados conforme o fabricante

Material	Fabricante	Composição
5MO	(Golden Yatti LLC Muscat, Omã)	CaO, SiO ₂ , TiO ₂ , Al ₂ O ₃ e MgO
MTA HP	Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A	A diferença entre o MTA e o MTA HP está na substituição da água destilada por um líquido que contém água e outro plastificante orgânico que confere ao produto alta plasticidade. A substituição do radiopacificador (de Óxido de Bismuto por Tungstato de Cálcio), garantindo o ausência de descoloração dentária.
MTA	Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A	SiO ₂ , K ₂ O, Al ₂ O ₃ , Na ₂ O, Fe ₂ O ₃ , SO ₃ , CaO, Bi ₂ O ₃ , MgO.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a determinação da CIM dos grupos experimentais foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M11-A7 (Patel et al., 2015). O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça), onde foram adicionados 100

μL / de meio de cultura (caldo Brucella) (Himedia, Mumbai, Índia) por poço.

No primeiro poço de cada fileira, foram adicionados os discos dos cimentos manipulados conforme as instruções dos fabricantes, e nos grupos controles foram adicionados 100 μL de NaOCl 2.5% ou de solução salina estéril. Foi realizada a maceração dos cimentos relativos aos grupos experimentais com o meio de cultura, de onde partiram uma série de 10 diluições seriadas de todos os grupos experimentais. Logo em seguida, 100 μL dos inóculos padronizados foram adicionados em cada poço, e as placas foram incubadas por 24 h em anaerobiose a 37°C. A CIM foi determinada quando não apresentava turvações que indicassem crescimento microbiano.

4.1.2 Avaliação da atividade antibiofilme dos grupos experimentais pelo teste de MTT

Foi avaliada a ação dos cimentos sobre os biofilmes monotípicos dos mesmos microrganismos utilizados anteriormente. Cinco inóculos diferentes foram preparados e padronizados em espectrofotômetro (1×10^8 UFC / mL) em solução fisiológica (NaCl 0,9%) (Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil). Depois, em microplacas de 96 poços, foram adicionados em cada poço 100 μL de inóculo correspondente. Em seguida, as placas foram submetidas à incubação (37°C) sob agitação (75 rpm) por 90 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 100 μL de caldo Brucella e as placas foram incubadas (37°C) por 7 dias em anaerobiose, com substituição do meio de cultura a cada 48 hs. Passado o período de formação de cada biofilme, estes foram colocados em contato com os materiais a serem avaliados por período de 24 h incubados (37°C) em anaerobiose. Posteriormente, foi realizado o teste de mensuração do

biofilme (MTT). Foram realizados 2 experimentos independentes, com 5 repetições cada, totalizando n=10 para cada grupo experimental.

Após contato com materiais de acordo com os grupos experimentais, o biofilme foi preparado para o teste de MTT. Para isso, foram adicionados 100 µL de solução de MTT “3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide” (Sigma-Aldrich, Missouri - USA), a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 h em câmara de anaerobiose a 37°C. Passado o período de incubação, foi retirada a solução de MTT e adicionado 100 µL de Dimetilsulfóxido “DMSO” (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e a placa foi novamente incubada a 37°C em estufa por 10 min e colocada no agitador constante por 10 min. Após isso, a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC. Highland Park Winooski, Vermont, EUA). As densidades ópticas “DO” obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade das células do microrganismo, pela fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

4.2 Avaliação da citotoxicidade dos grupos experimentais

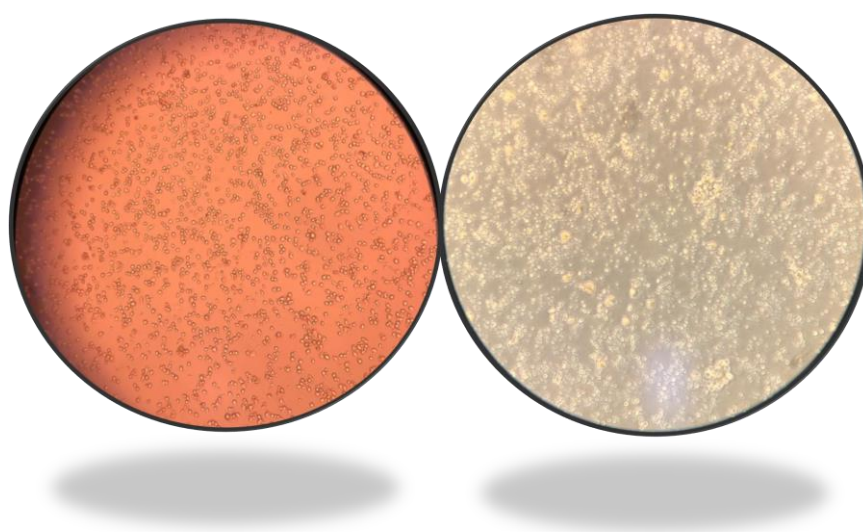
A avaliação da citotoxicidade dos grupos experimentais foi realizada por meio do teste colorimétrico MTT, que analisa a atividade mitocondrial celular, após contato com os meios condicionados por 5 min e 24 h. Para tanto, foram utilizadas culturas de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) (Rio de Janeiro Cell Bank -APABCAM – RJ, Brasil) e osteoblastos (MG-63) (Rio de Janeiro Cell Bank -APABCAM – RJ, Brasil).

Após descongelamento, as células foram mantidas em frascos de cultivo

celular (TPP, Zollstrasse, Suíça), cultivadas em meio de *Dulbecco's modified Eagle medium* “DMEM” (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino “SFB” (Invitrogen, New York, EUA), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, com 5% de CO₂. Foi realizada troca do meio de cultura a cada 48 h e quando fosse observado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco (Figura 1), as células eram transferidas para outro frasco celular.

Para utilização nos testes, a monocamada de células foi desagregada do fundo do frasco de cultura com 0,25% de ácido tripsina-etilenodiaminotetracético (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, as células foram ressuspensas em meio DMEM + 10% SFB e transferidas para um tubo tipo falcon onde foram centrifugadas por 5 min à 2000 rpm. A quantificação do número de células viáveis foi realizada pelo teste de exclusão com azul de Trypan (0,4%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Figura 1 - As células em meio DMEM observadas em microscópio óptico.



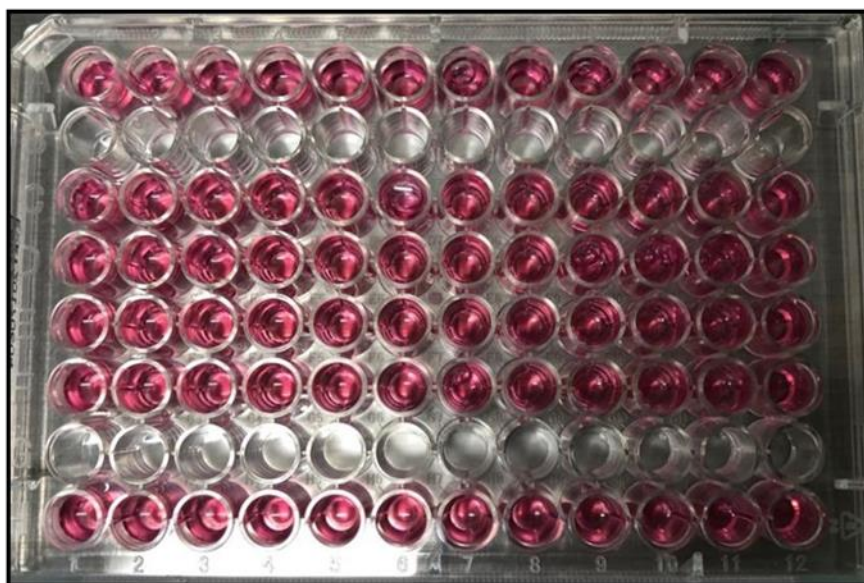
Legenda: Lado esquerdo: macrófagos, lado direito: osteoblastos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após cultivo celular, em microplacas de 96 poços foram adicionados 200 μL de meio DMEM e suplementado com 10% de SFB contendo 2×10^4 células viáveis. Estas placas foram incubadas (37°C , com 5% de CO_2) por 24 h para que ocorresse aderência celular (Figura 2).

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS. Foram utilizados poços-controles, contendo apenas células com meio de cultura. O período de incubação foi de 5 min e 24 h. O número de poços foi igual a 10 para todos os grupos.

Figura 2 – Placa de 96 poços contendo meio de cultivo com células



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para preparo de cimentos biocerâmicos, os mesmos foram manipulados numa placa de 24 poços onde 100 mg de cada cimento foi manipulado com a quantidade certa do próprio líquido seguindo as instruções do fabricante. Já no grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Paraná, Brasil)

foi a considerada a proposição (1:1) (pó: líquido). O grupo do Ca(OH)_2 foi acrescentado nesse teste devido a sua biocompatibilidade para servir como grupo de controle positivo e foi manipulado com água destilada.

Transcorridos os períodos após a espatulação dos materiais, cada poço contendo os cimentos, foi preenchido com 2 mL do meio de cultura (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% e as placas permaneceram em estufa com 5% CO_2 a 37°C por 24 h (Figura 3). A quantidade de 100 μL do meio tratado em contato com cada cimento por poço foi aplicada. O grupo de NaOCl foi utilizado como grupo de controle.

Figura 3 - Os cimentos manipulados e incubados com 2 mL de meio DMEM.



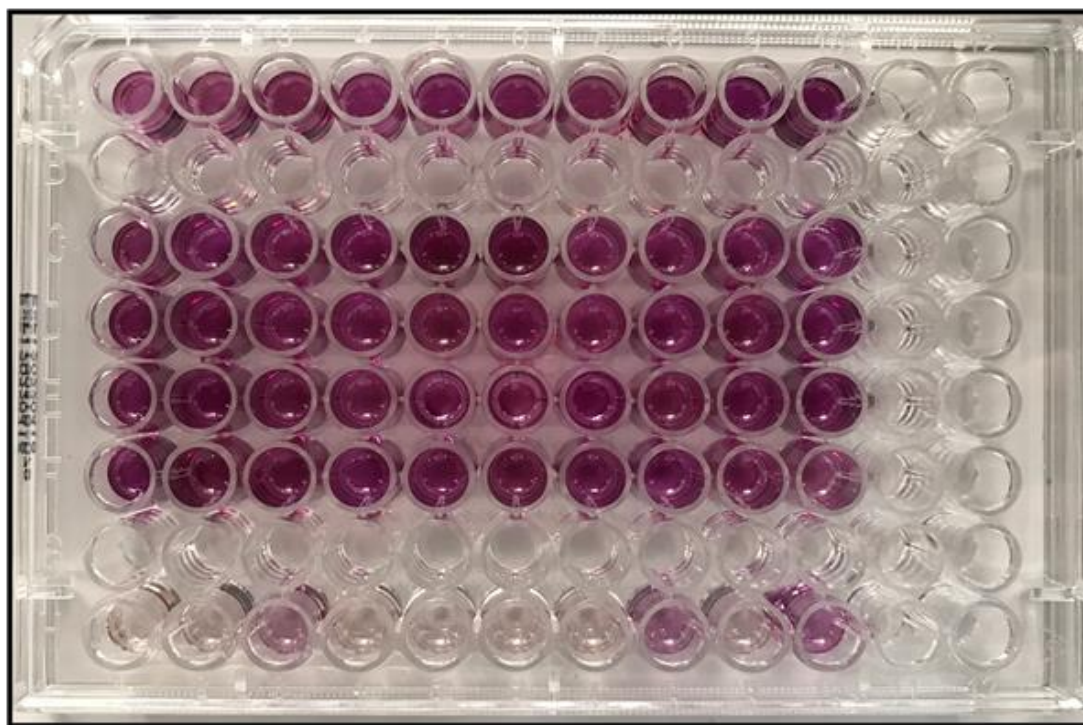
A coluna esquerda mostra os cimentos manipulados e o meio de cultura aplicado sobre os mesmos. A coluna direita mostra somente os cimentos após remoção do meio de cultura

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificação da viabilidade da cultura, foi realizada análise da atividade mitocondrial das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazina. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 1 mL de PBS estéril (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

Foram adicionados 100 μ L da solução de MTT por poço e as placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 1 h, abrigadas da luz. Posteriormente, esta solução foi descartada e foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) por poço para expor os cristais de formazina produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis (Figura 4).

Figura 4 - DMSO aplicado para expor os cristais de formazina produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após incubação de 10 min e agitação em *shaker*, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

4.3 Avaliação morfológica e da composição química dos cimentos biocerâmicos

4.3.1 Análise dispersiva de energia por raio X (EDAX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A composição química foi determinada por análise dispersiva de energia por raio X (EDAX) também conhecida como (EDS ou EDX) por MEV (MIRA3-TESCA, Brno-Kohoutovice, Czech Republic). Esta análise foi feita primeiramente para o pó de cada cimento biocerâmico (5MO, MTA HP e MTA) em que uma fina camada de pó de cada cimento foi dispersa sobre uma placa de polimetilmetacrilato montada em um *stub* de alumínio. O EDAX foi usado para determinar os elementos componentes dos cimentos.

Posteriormente, foi feita análise morfológica dos cimentos biocerâmicos em forma de pó, e em forma de discos dos cimentos manipulados conforme as instruções dos fabricantes. Os cimentos foram compactados entre duas placas de vidro em moldes de silicone de (5 mm × 2 mm) até o total endurecimento dos cimentos. Após, os cimentos foram colocados em placas de Petri e guardados na

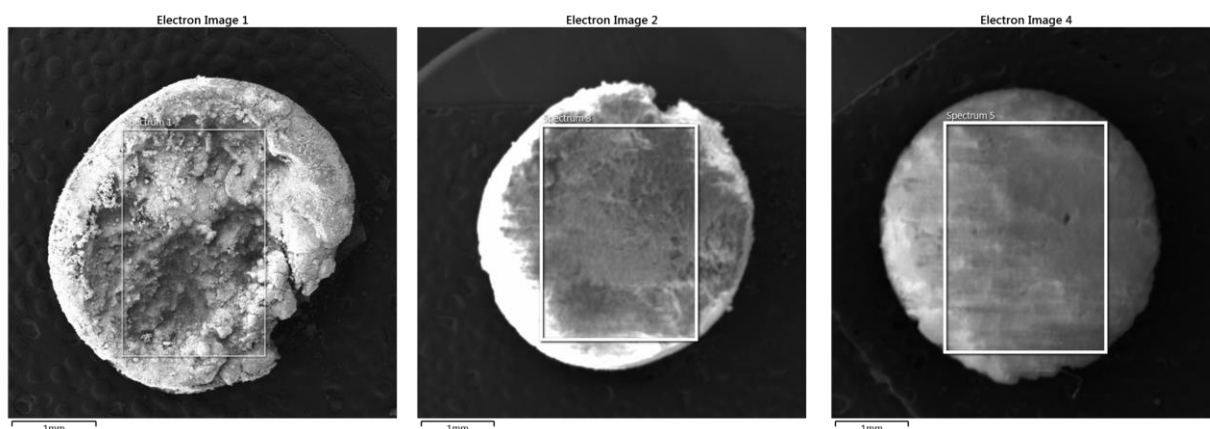
estufa em umidade 100% por 3 dias a 37 °C, quando foram tratados de uma das seguintes formas:

a) Mantidos com umidade de 100% a 37 °C (controle).

b) Imersos em água destilada por 4 h seguido por secagem ao ar por 12 h.

Logo em seguida, os discos foram montados em um *aluminum stub*, e todos os *stubs* (três de pó de cada cimento, três de discos controle, três de discos imersos em água) foram revestidos com carbono para condutividade elétrica. As amostras foram visualizadas em MEV (Figura 5).

Figura 5 - Imagens ilustrativas dos discos visualizados em MEV de esquerda para direita (5MO, MTA HP, MTA), respectivamente



Fonte: Elaborada pelo autor.

Imagens dos diferentes componentes da microestrutura do material em diferentes ampliações no modo de retroespalhamento de elétrons foram capturadas com uma ampliação de até 5k, 10k, 20k, 50k × e a espectroscopia de energia dispersiva das diferentes fases foi realizada.

4.3.2 Difração de raio X (DRX)

A análise de fase foi realizada usando difração de raios X (DRX) em um difratômetro automatizado de pó de cada grupo experimental usando radiação Cu K α e um monocromador de cristal secundário. As amostras foram apresentadas na forma de pó em um único porta-amostras de cristal, o que evita picos de difração indesejados. A identificação da fase foi realizada pelo uso de um software de correspondência de busca utilizando o banco de dados do *International Center for Diffraction Data (ICDD) (International Center for Diffraction Data, Newtown Square, PA, EUA)*.

4.4 Avaliação da radiopacidade dos cimentos biocerâmicos

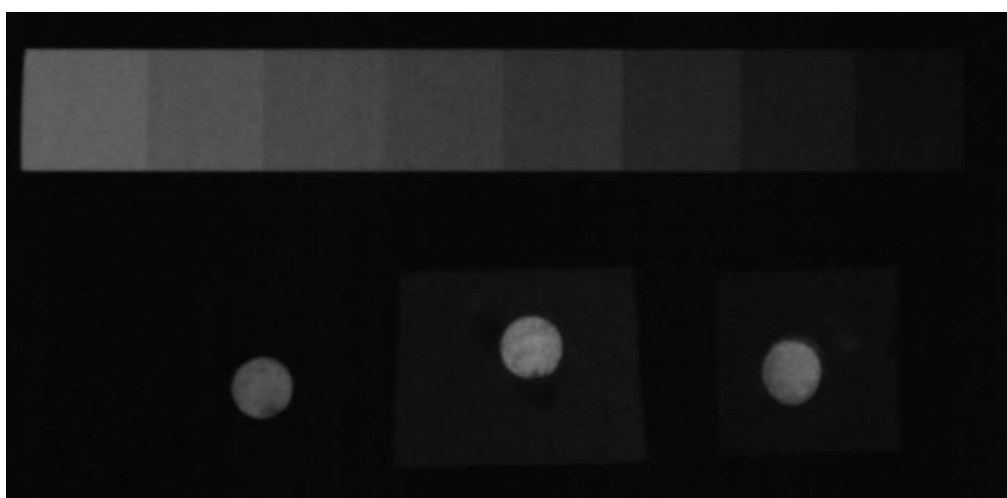
A radiopacidade dos cimentos biocerâmicos foi avaliada segundo a metodologia proposta por (Beyer-Olsen, Orstavik 1981) utilizando uma escala de alumínio *Step Wedge* (cunha em degraus) com espessura crescente (1 até 8 mm) e os discos dos cimentos preparados conforme as instruções dos fabricantes. Os cimentos foram compactados em anéis de silicone com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura utilizando esse tamanho único em todos.

Os discos biocerâmicos e a escala do alumínio foram fixados com adesivo no sensor tipo CCD de um aparelho de telerradiografia com intuito de se manter a padronização dos fatores de distância entre receptor de imagem e fonte de raios X, e obter-se uma imagem digital.

O aparelho radiográfico utilizado foi um ORTHOPHOS XG 5 (Dentsply Sirona, York, PA, EUA) operando com parâmetros de aquisição de 60 Kvp, 10

mA, tempo de exposição de 9,1s. Uma única aquisição foi feita (Figura 6) e a imagem obtida foi submetida à análise de intensidade pixel em um programa de análise de imagens (ImageJ 1.53e, *Wayne Rasband and Contributors, National Institute of Health, EUA*).

Figura 6 - Radiografia dos cimentos biocerâmicos junto com a escala de alumínio



Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram determinadas com a ferramenta de seleção, regiões de interesse (ROI) correspondentes às imagens dos cimentos e a cada um dos degraus da escala de alumínio (*steps*), individual e progressivamente de forma a se obter por meio do histograma de distribuição de valores de pixels (média, desvio padrão, valores máximo e mínimo). Foi então realizada uma análise comparativa entre os valores médios relativos aos cimentos e aqueles correspondentes aos degraus da escala, encontrando-se assim a equivalência mais próxima entre a densidade dos materiais estudados e a espessura em milímetros de alumínio (mm de Al).

4.5 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade, e depois analisados com teste de Kruskal Wallis complementado com teste de Dunn, considerando $\alpha \leq 0,05$ nível de significância usando o GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, EUA)

5 RESULTADO

5.1 Avaliação antimicrobiana dos cimentos

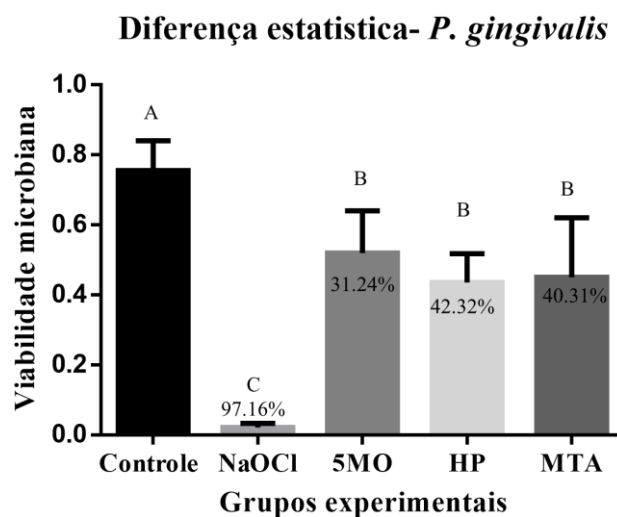
5.1.1 CIM e CMM dos cimentos

Devido a turvação do meio de cultura pelos cimentos, não foi possível determinar o CIM e CMM dos cimentos. Entretanto, as mesmas concentrações indicadas pelos fabricantes na proporção 0,085 g pó / 0,25 ml líquido (aproximadamente 3×Pó : 1×líquido) foram utilizadas nos próximos testes microbiológicos.

5.1.2 A viabilidade celular dos microrganismos em biofilme pelo teste de MTT

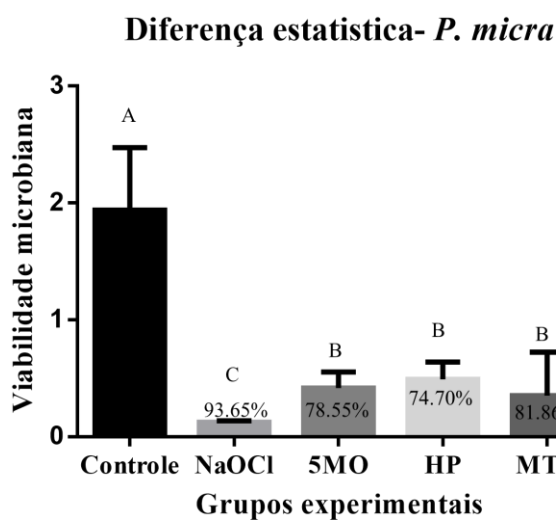
Todos os grupos experimentais foram efetivos contra todos os biofilmes microbianos avaliados apresentando redução estatística significativa (*P. gingivalis* $P < 0.0001$, *P. micra* $P < 0.0001$, *F. nucleatum* $P < 0.0001$, *P. intermedia* $P < 0.0001$) em comparação ao grupo controle (Figuras 7,8,9 e 10).

Figura 7 – Diferença estatística da viabilidade microbiana (calculada pela refletância) e redução (em%) no biofilme de *P. gingivalis* pelo teste de MTT



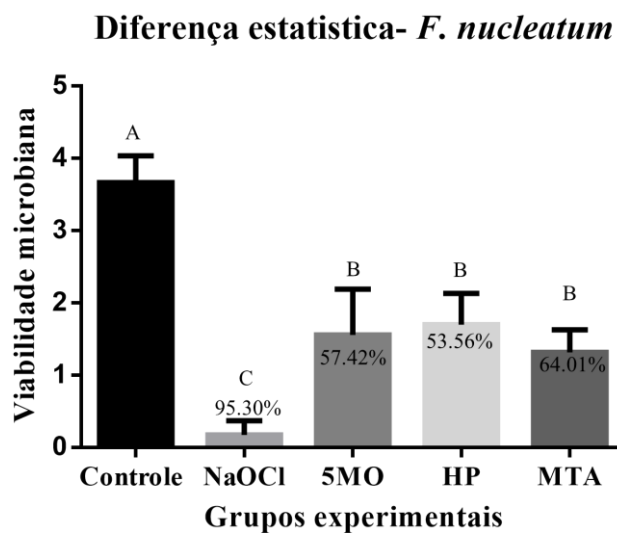
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 – Diferença estatística da viabilidade microbiana (calculada pela refletância) e redução (em%) no biofilme de *P. micra* pelo teste de MTT



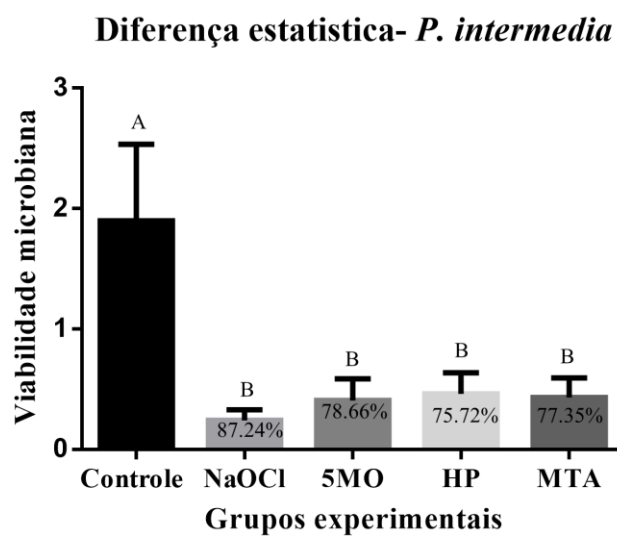
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 – Diferença estatística da viabilidade microbiana (calculada pela refletância) e redução (em%) no biofilme de *F. nucleatum* pelo teste de MTT



Fonte: Elaborada pelo autor.

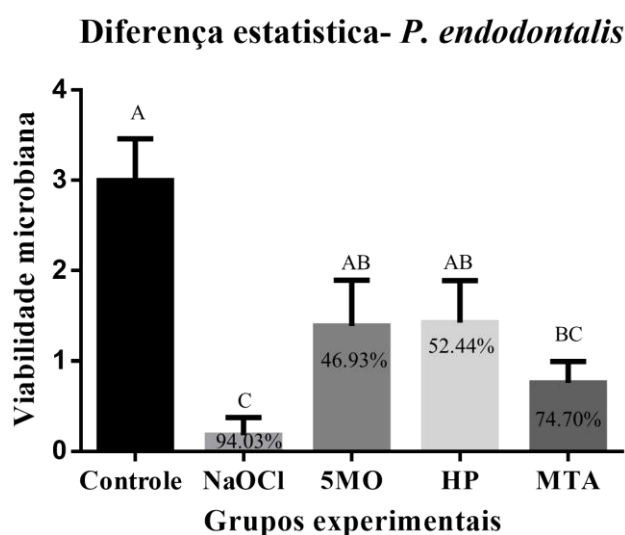
Figura 10 – Diferença estatística da viabilidade microbiana (calculada pela refletância) e redução (em%) no biofilme de *P. intermedia* pelo teste de MTT



Fonte: Elaborada pelo autor.

Porém, sobre *P. endodontalis*, não houve diferença estatística significativa entre os cimentos biocerâmico. O MTA foi semelhante ao grupo de NaOCl, por outro lado o 5MO e HP foram semelhantes ao grupo controle (Figura 11).

Figura 11 - Diferença estatística da viabilidade microbiana (calculada pela refletância) e redução (em%) no biofilme de *P. endodontalis* pelo teste de MTT



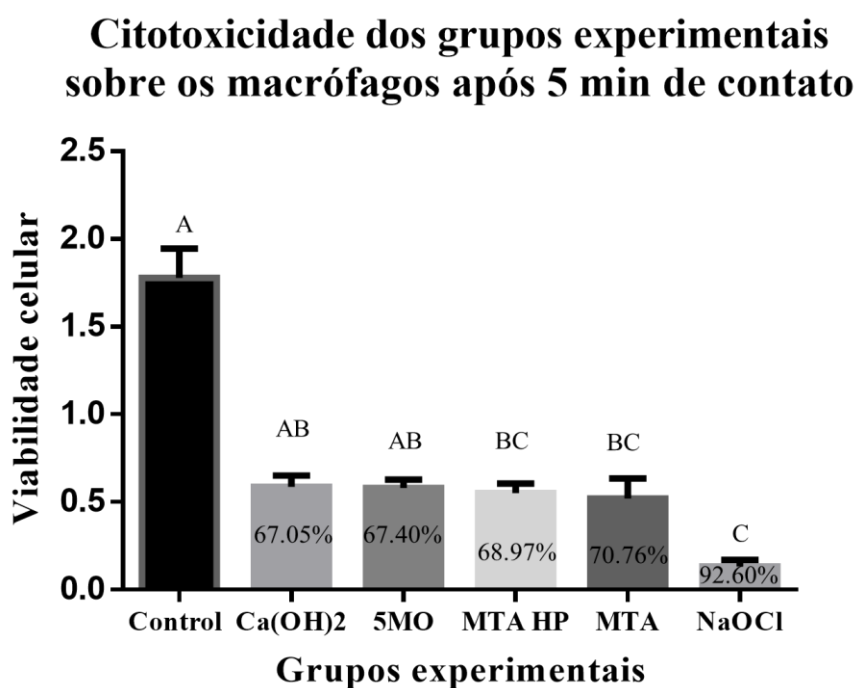
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 A citotoxicidade pelo teste de MTT

Os grupos Ca(OH)_2 e 5MO foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle após aplicação sobre os macrófagos por 5 min se-apresentou uma biocompatibilidade adequada, porém os grupos HP e MTA tiveram diferença significativa do grupo controle. O grupo NaOCl foi o mais citotóxico com

diferença significativa de todos os grupos experimentais menos os grupos HP e MTA. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 5MO, HP e MTA (Figura 12).

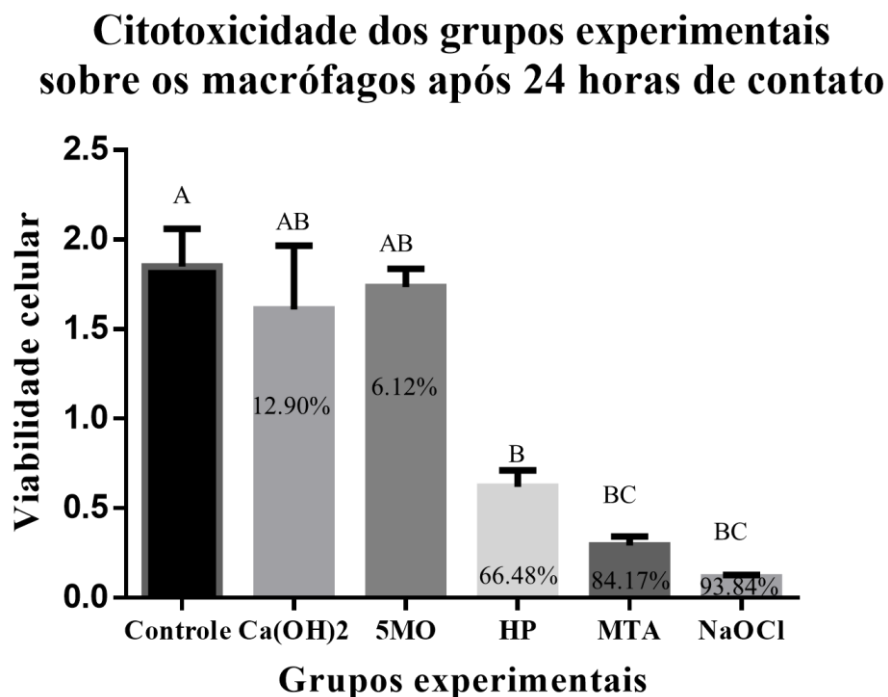
Figura 12 - A diferença estatística calculada pela fluorescência de células entre os grupos experimentais e a redução da viabilidade celular de macrófagos (em %) após aplicação dos grupos experimentais por 5 min



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na aplicação dos grupos experimentais por 24 h, os mesmos resultados foram encontrados, porém, o grupo HP foi estatisticamente diferente do NaOCl. Mais uma vez, não houve diferença significativa entre os grupos $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 5MO, HP e MTA. Destaque-se que os grupos do 5MO e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle (Figura 13).

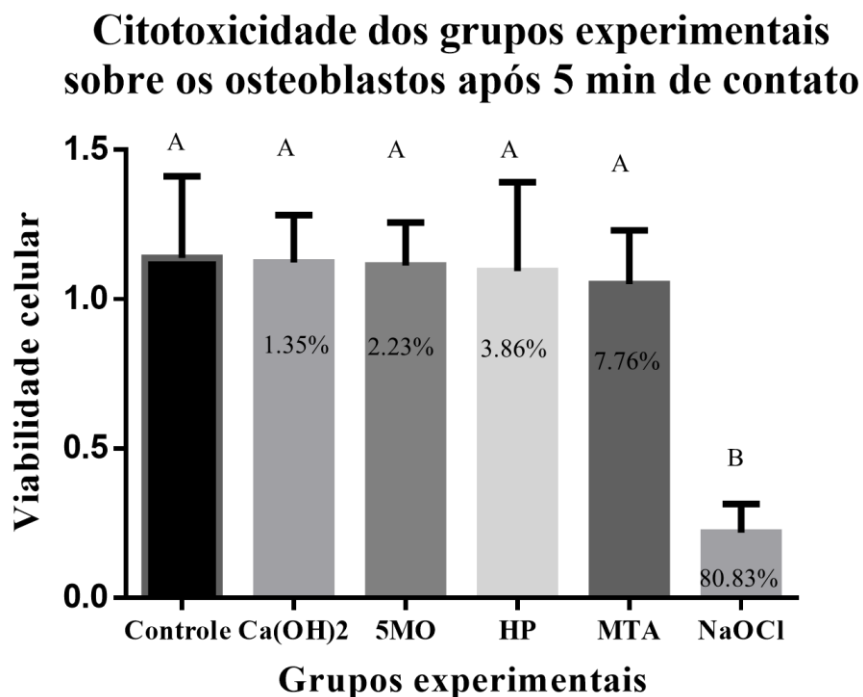
Figura 13 - A diferença estatística calculada pela fluorescência de células entre os grupos experimentais e a redução da viabilidade celular de macrófagos (em %) após aplicação dos grupos experimentais por 24 h



Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação a cultura de osteoblastos, todos os grupos experimentais apresentaram viabilidade celular estatisticamente semelhante ao grupo controle, sendo diferentes do grupo NaOCl que foi citotóxico (Figura 14).

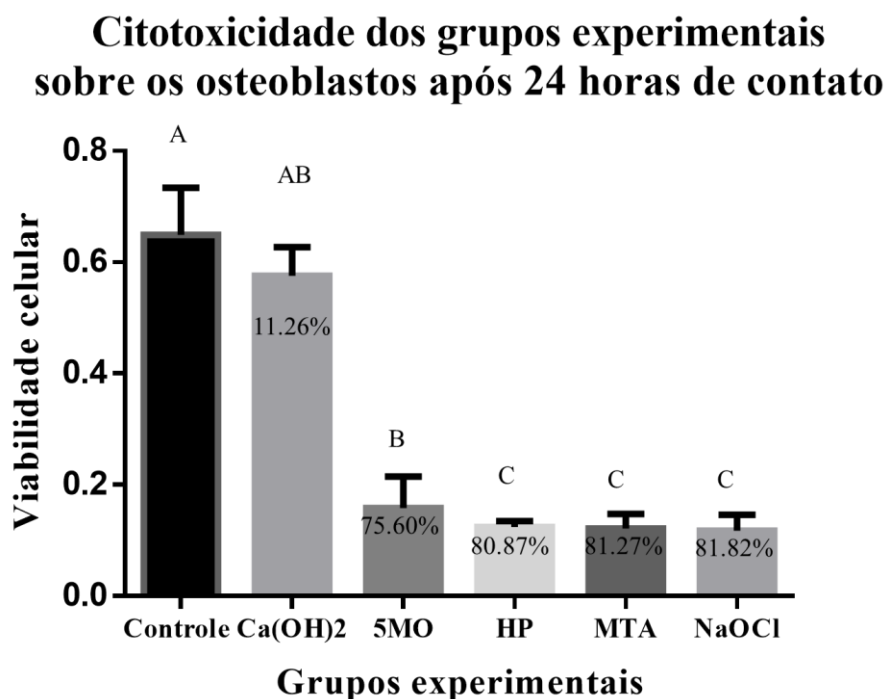
Figura 14 - A diferença estatística calculada pela fluorescência de células entre os grupos experimentais e a redução da viabilidade celular de osteoblastos (em %) após aplicação dos grupos experimentais por 5 min



Fonte: Elaborada pelo autor.

Porém, após aplicação por 24 h sobre os osteoblastos, somente o Ca(OH)₂ foi igual ao grupo controle. O Ca(OH)₂ não apresentou diferença significativa com o grupo 5MO. O grupo 5MO foi igual aos grupos HP, MTA, e NaOCl que não tinham diferença estatística entre si (Figura 15).

Figura 15 - A diferença estatística calculada pela fluorescência de células entre os grupos experimentais e a redução da viabilidade celular de osteoblastos (em %) após aplicação dos grupos experimentais por 24 h



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Avaliação morfológica e da composição química dos cimentos biocerâmicos

5.3.1 Análise dispersiva de energia por raio X (EDAX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O EDAX dos cimentos avaliados em forma de pó mostrou que o 5MO é

composto principalmente de cálcio, oxigênio, bismuto, carbono, titânio, silício e quantidades menores de alumínio, enxofre, magnésio, potássio e ferro; e que o pó do MTA HP é composto principalmente de cálcio, oxigênio, tungstênio e antimônio; e que o pó do MTA é composto cálcio, oxigênio, bismuto e silício e de quantidades menores de carbono e alumínio (Quadro 2).

A presença de titânio, enxofre e potássio e a ausência de tungstênio no 5MO o torna diferente do MTA e do MTA HP, e a presença de tungstênio e antimônio no MTA HP o torna diferente do 5MO e do MTA (Figura 16).

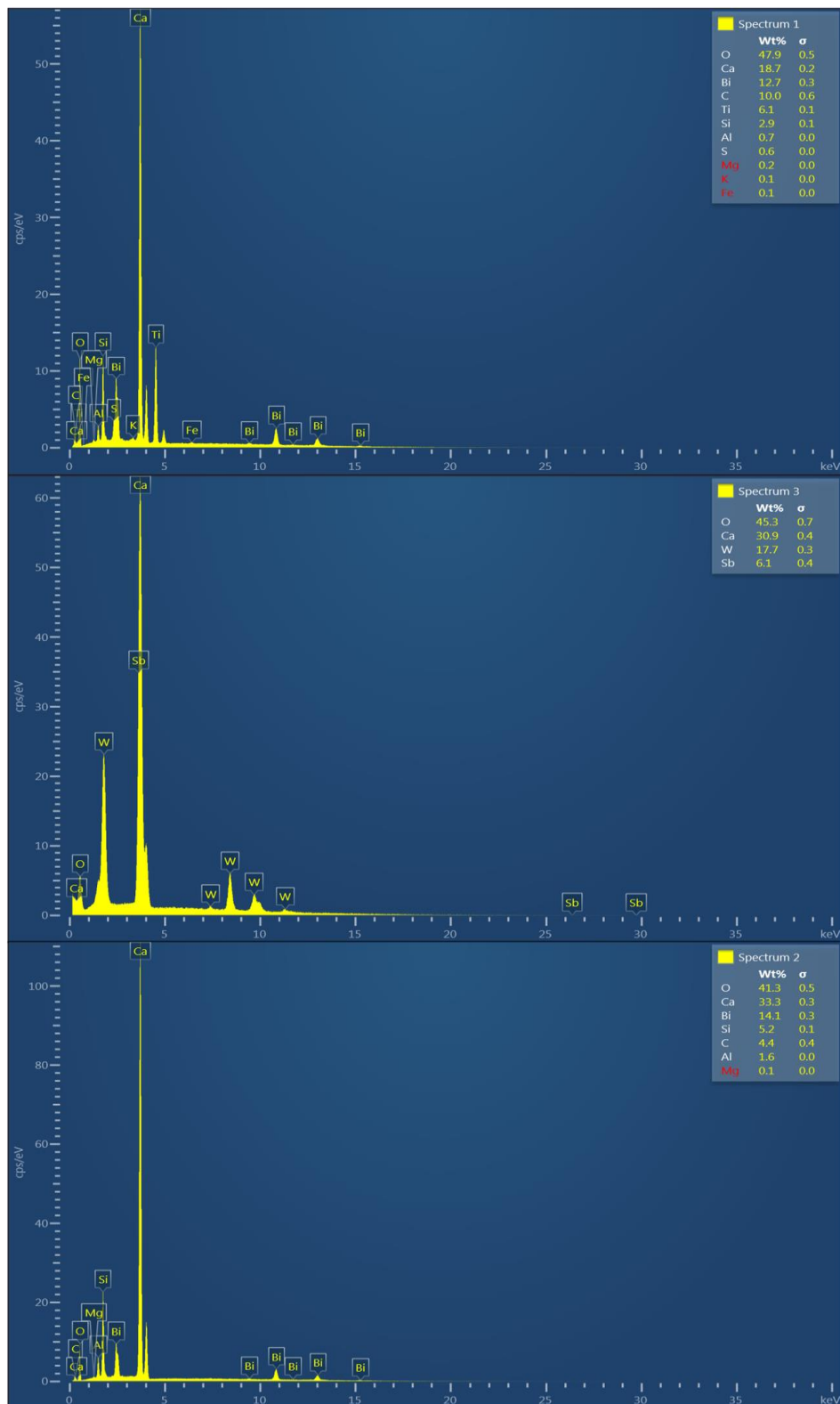
As imagens do MEV mostraram pequenas partículas irregulares intercaladas com algumas partículas alongadas semelhantes a agulhas no grupo do 5MO; pequenas partículas irregulares com algumas partículas maiores bem como partículas alongadas no grupo do MTA HP, e partículas cristalinas no grupo do MTA (5K, 10K, 20k e 50k ×) (Figuras 17, 18, 19 e 20).

Quadro 2 - A composição química dos cimentos testados conforme o teste EDAX

Material	Composição química
5MO	Ca, O, Bi, C, Ti, Si, Al, S, Mg, K e Fe
MTA HP	Ca, O, W e Sb
MTA	Ca, O, Bi, Si, C e Al.

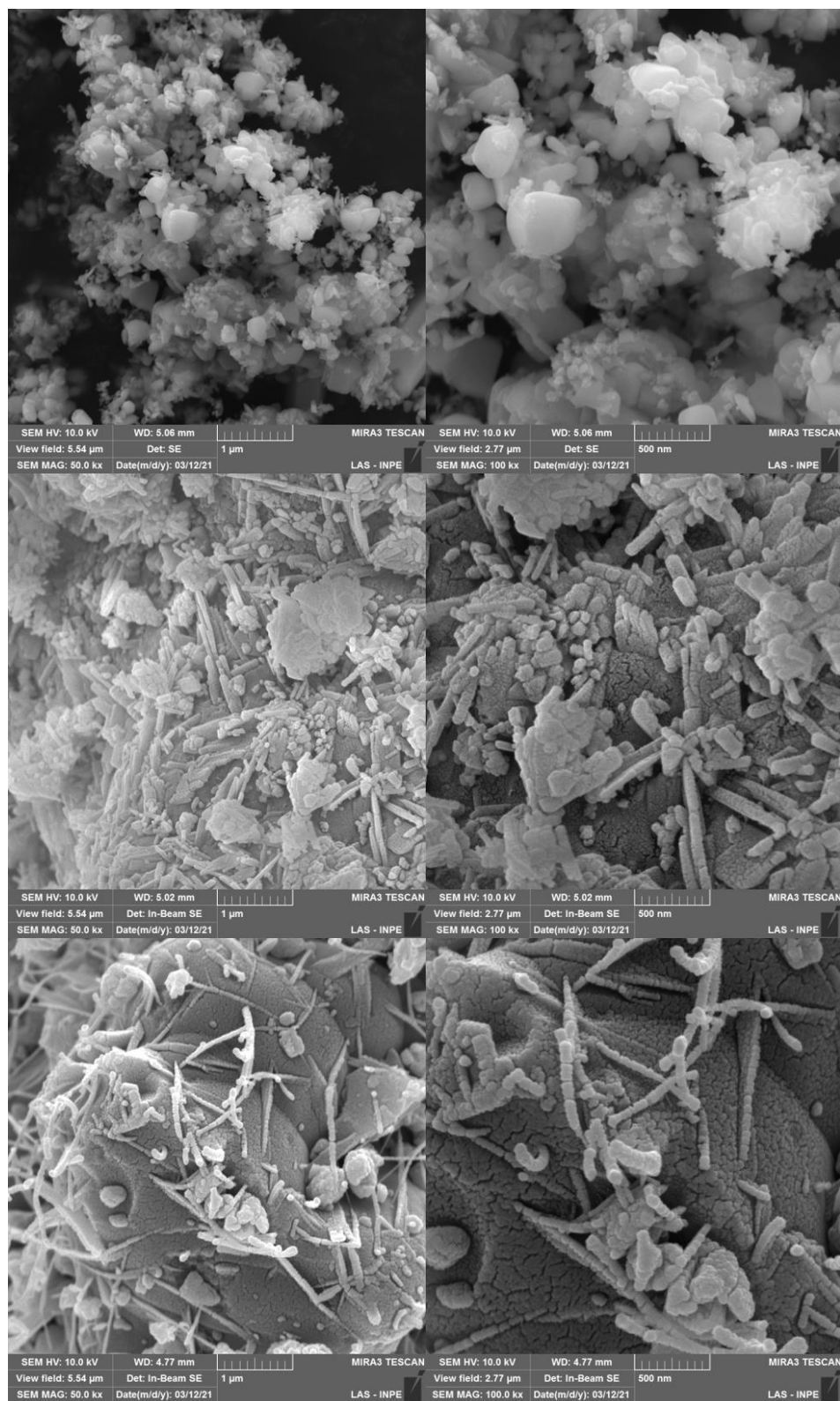
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - A composição química dos disco do 5MO, MTA HP, MTA respectivamente



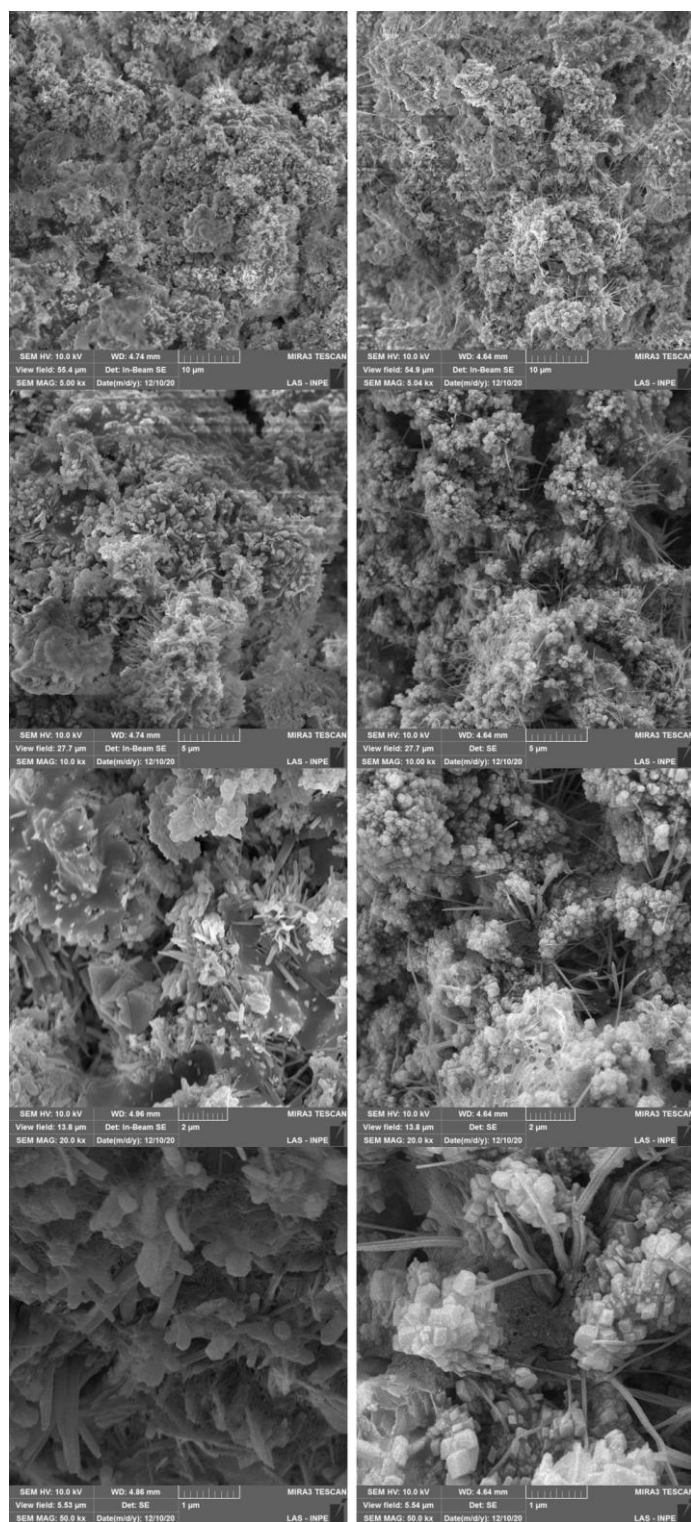
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 - Imagens ilustrativas do pó de 5MO (primeira linha), MTA HP (segunda linha) e MTA (terceira linha) (50K e 100K ×)



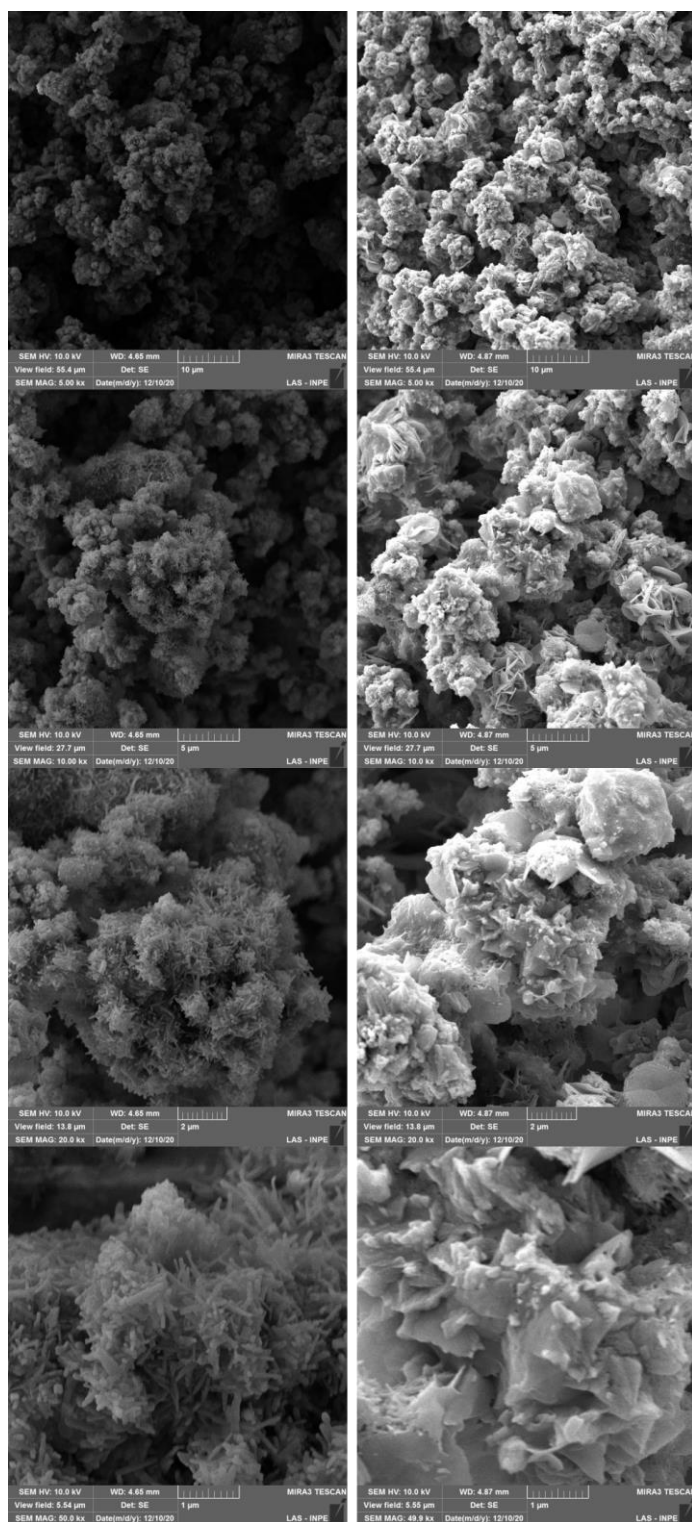
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 - Imagens ilustrativas dos discos de 5MO (controle) (coluna esquerda), e após imersão em água por 4 h (coluna direita) (5K, 10K, 20K e 50K ×)



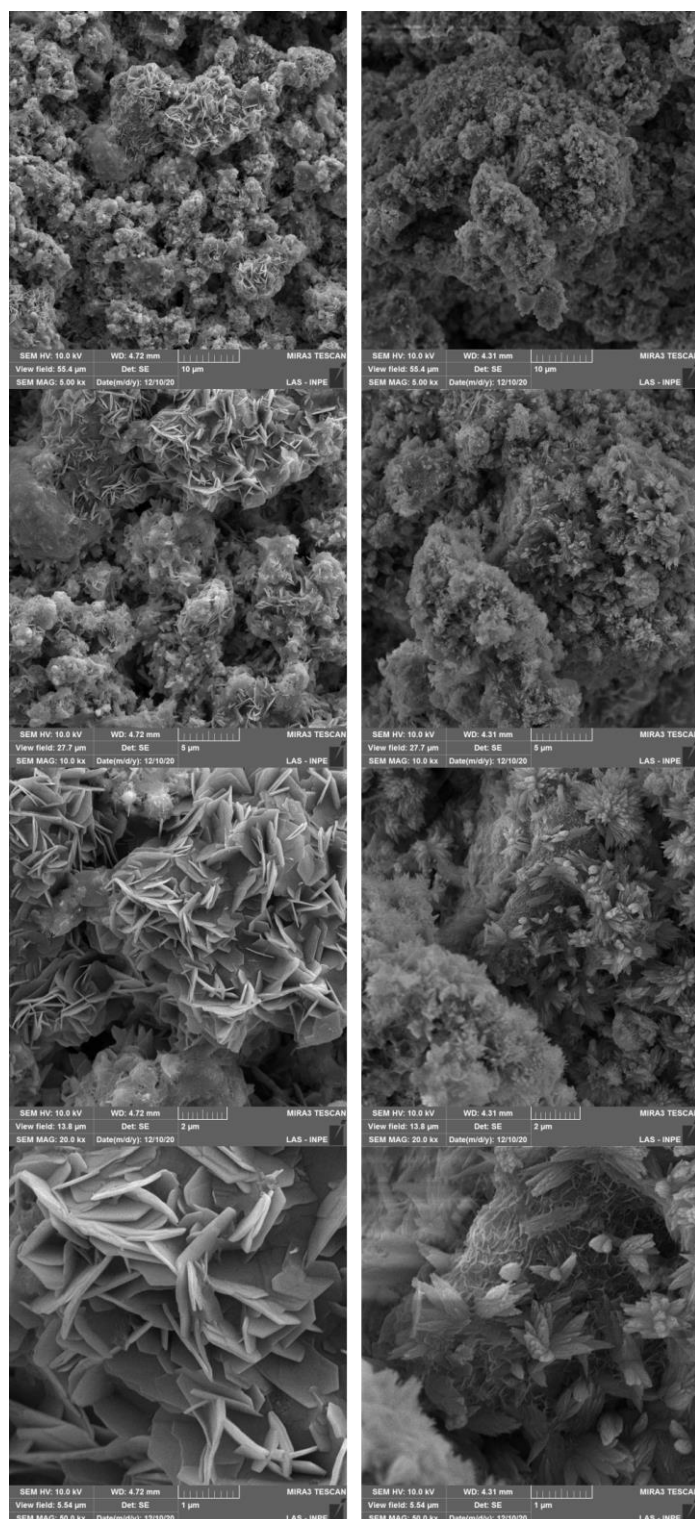
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 - Imagens ilustrativas dos discos de MTA HP (controle) (coluna esquerda), e após imersão em água por 4 h (coluna direita) (5K, 10K, 20K e 50K ×)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - Imagens ilustrativas dos discos de MTA (controle) (coluna esquerda), e após imersão em água por 4 h (coluna direita) (5K, 10K, 20K e 50K ×)

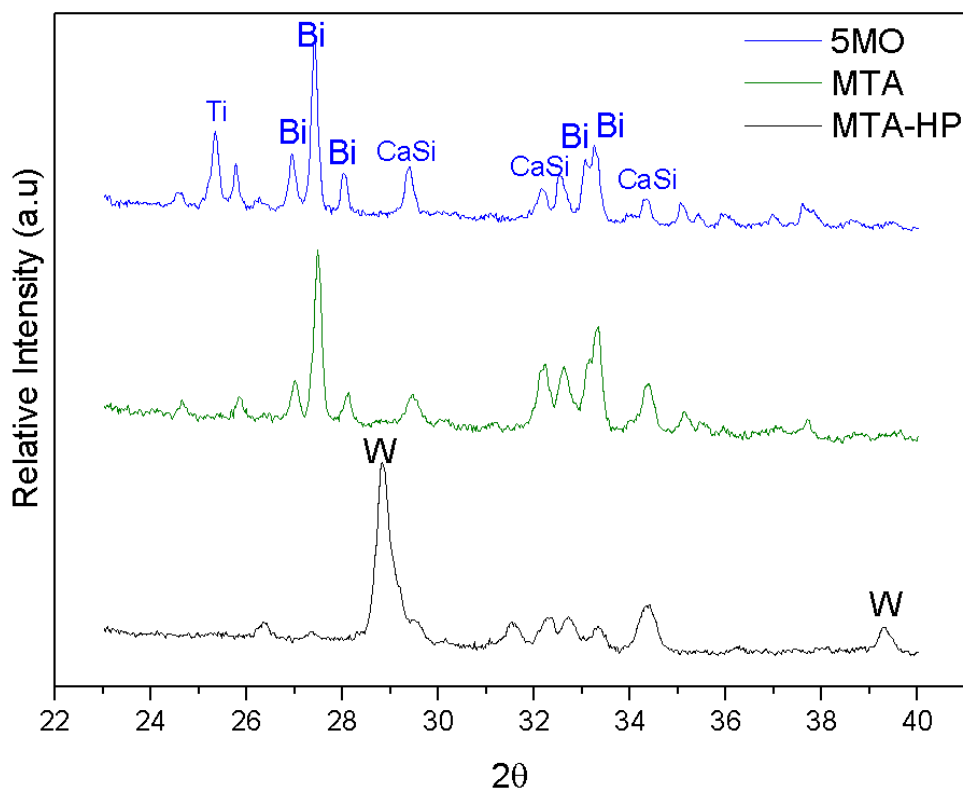


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.2 Difração de raio X (DRX)

A análise de fase mostrou que a principal diferença entre o 5MO e MTA é a presença de dióxido de titânio “anatásio” (TiO_2) que é um composto que possui atividade bactericida. Ambos, o 5MO e o MTA possuem óxido de bismuto (Bi_2O_3) e silicato tricálcio “alite” ($\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$). Por outro lado, o MTA HP possui tungstato de cálcio (CaWO_4) (Figura 21).

Figura 21 - A análise de fase dos cimentos biocerâmicos



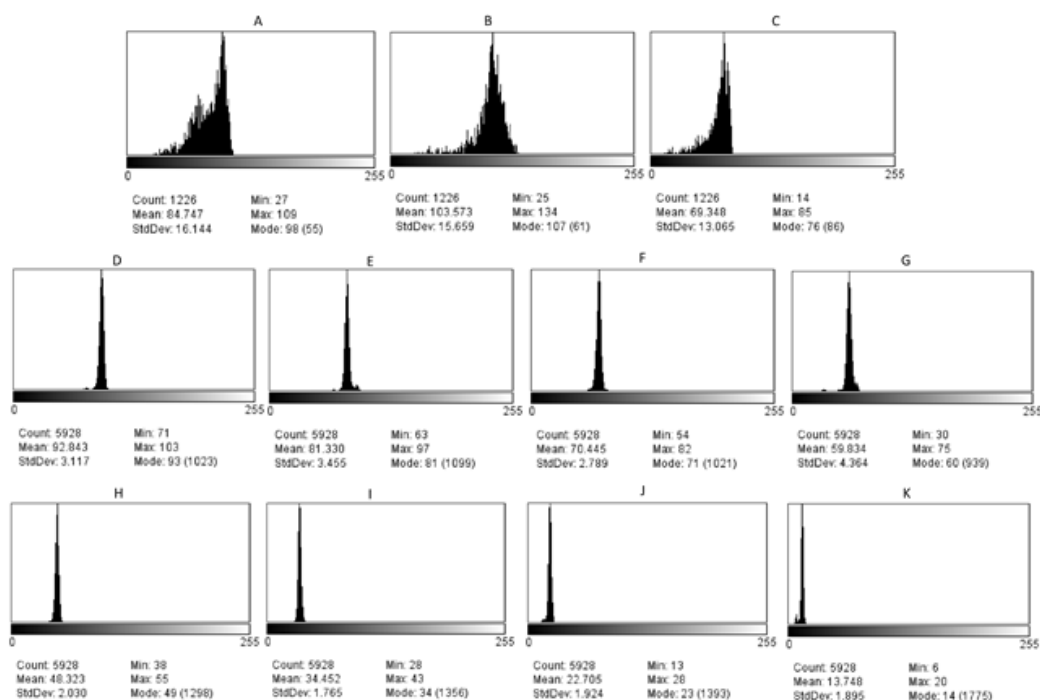
Legenda: (Bi= Bi_2O_3 , CaSi= $\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$, Ti= TiO_2 (anatase), W= CaWO_4)

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Avaliação da radiopacidade dos cimentos biocerâmicos

Os histogramas dos cimentos biocerâmicos mostraram que o 5MO possui uma radiopacidade corresponde aproximadamente aos 7° - 8° degraus da escala do alumínio (7-8 mm de alumínio) (média entre os dois degraus); o MTA HP possui uma radiopacidade corresponde ao 8° degrau (8 mm) da escala do alumínio e ultrapassa a sua média; e que o MTA possui uma radiopacidade corresponde ao 6° degrau (6 mm) da escala do alumínio (Figura 22).

Figura 22 - Histograma da intensidade pixel dos cimentos biocerâmicos e a escala do alumínio



Legendas: A) = histograma do 5MO; B) = histograma do MTA HP; C) = histograma do MTA; D-K) = histograma dos oito degraus da escala do alumínio

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com o protocolo para radiopacidade de materiais dentários, publicado pela *International Standards Organization (ISO) (International Organization For Standardization 2012)* estes devem apresentar uma radiopacidade igual ou superior àquela apresentada pela mesma espessura de alumínio, uma vez que este metal possui radiopacidade similar à da dentina (Devito et al., 2004).

6 DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento endodôntico consiste principalmente em redução da carga microbiana do sistema de canais radiculares (Haapasalo 1989), tornando assim relevante o estudo da ação antimicrobiana de qualquer material utilizado no tratamento endodôntico incluindo solução irrigadora, medicação intracanal, material obturador, ou cimento biocerâmico (Abu Hasna et al., 2020a, 2020b; Carvalho et al., 2020; Estrela et al., 2000).

O MTA é um cimento biocerâmico que possui ação antimicrobiana comprovada em alguns estudos relatados na literatura. Segundo (Torabinejad et al., 1995b) o MTA possui efeito antibacteriano sobre algumas bactérias facultativas, porém, não possui efeito sobre bactérias anaeróbias estritas em comparação com amálgama, óxido de zinco-eugenol, Super EBA. A ação antimicrobiana do MTA varia conforme a sua concentração (Al-Hezaimi et al., 2005), assim, ficam entendidos de alguma forma, os resultados controversos relatados na literatura (Ribeiro et al., 2010). No presente estudo, foi verificado que o MTA possui ação antimicrobiana efetiva contra todos os microrganismos testados uma vez que o mesmo reduziu de forma significativa a viabilidade do biofilme comprovado pelo teste de MTT.

Os cimentos biocerâmicos reparadores não foram testados ainda sobre os microrganismos anaeróbios usados no presente estudo, tornando esta pesquisa pioneira e inovadora neste tema, trazendo contribuição relativa. Jardine et al., (2019) demonstraram que o MTA não é eficaz contra biofilme de microcosmo multiespécies. Por outro lado, em outro estudo foi relatado que o MTA possui poder antimicrobiano significante sobre *E. faecalis* e *S. mutans* (Morita et al., 2021).

Assim, ElReash et al. (2019), levantaram a bandeira que a ação antimicrobiana dos cimentos à base de silicato de cálcio contra espécies

bacterianas estritamente anaeróbicas ainda é questionável. Apesar de Queiroz et al. (2021) concluíram que o MTA HP possui um poder antimicrobiano contra *E. faecalis*, ainda um estudo mais recente, não inibiu o crescimento planctônico de *S. mutans*, mas foi capaz de reduzir o biofilme de *S. mutans* (Silva et al., 2021). No presente estudo, o MTA HP foi efetivo contra todos os microrganismos avaliados exceto *P. endodontalis* no teste de MTT.

O 5MO é um cimento que ainda não teve suas propriedades estudadas, portanto, foi indicado o uso do 5MO associado com a terapia fotodinâmica para garantir uma desinfecção adequada (Abu Hasna et al., 2020c), essa indicação vale ainda aos outros biocerâmicos desde que a ação antimicrobiana dos mesmos seja questionável (Jardine et al., 2019). No presente estudo, o 5MO apresentou um poder antimicrobiano efetivo contra todos os microrganismos avaliados no teste de MTT exceto sobre *P. endodontalis*.

O NaOCl foi utilizado neste estudo como grupo controle devido a sua ação antimicrobiana comprovada e relatada na literatura sobre diversos microrganismos (Abu Hasna et al., 2020b) e ainda sua ação contra as endotoxinas e as metaloproteinases da matriz “MMPs” (Carvalho et al., 2016, 2020).

Por outro lado, o estudo da ação antimicrobiana de qualquer material com aplicação clínica deve ser complementado com estudos sobre a biocompatibilidade do mesmo (Camilleri, Pitt Ford 2006). O MTA é menos tóxico que a amálgama, Super EBA, e IRM sobre células L929 de camundongo (Torabinejad, Hong, Pitt Ford, et al., 1995b), e mesmo que a citotoxicidade começa alta, a tendência é diminuir-se gradualmente com o tempo (De Deus et al., 2005).

O MTA foi indicado para uso clínico desde que apresentou uma biocompatibilidade sobre os osteoblastos MG63 (Mitchell et al., 1999) e essa biocompatibilidade aumenta com o tempo após 72 h (Pelliccioni et al., 2004).

Estudos mais recentes ainda comprovaram a biocompatibilidade do MTA sobre os osteoblastos MG63 após 5 dias (Willershausen et al., 2013; Attik et al., 2014) demonstrando um potencial considerável para o uso dos biocerâmicos como materiais reparadores (Gomes-Cornélio et al., 2016). No presente estudo, foi revelado que todos os biocerâmicos foram compatíveis sobre os osteoblastos MG63 após 5 min, porém somente o 5MO permaneceu biocompatível após 24 h.

O MTA apresenta também biocompatibilidade sobre os macrófagos (Assmann et al., 2015), assim também o MTA Fillapex, uma versão comercial do MTA, que foi biocompatível sobre os macrófagos de camundongo após 4 h (Braga et al., 2015) e sobre a mesma linhagem testada no presente estudo também foi biocompatível após 1 e 2 dias (Zhu et al., 2017; Tu et al., 2019). No presente estudo o MTA foi biocompatível sem ter diferença significativa entre os grupos Ca(OH)_2 , 5MO, HP e MTA após 5 min e 24 h.

Assim também, o MTA HP apresenta uma biocompatibilidade semelhante ao do MTA sobre os fibroblastos L929 e células-tronco da polpa dentária humana após 24, 48, e 72 h, sendo que essa biocompatibilidade aumenta com o tempo (Cintra et al., 2017; Tomás-Catalá et al., 2017). MTA HP apresenta biocompatibilidade adequada sobre os osteoblastos após 24, 48, e 72 h (Ferreira et al., 2019). No presente estudo, foi verificado que somente após 5 min, o MTA HP foi biocompatível, sendo que esses resultados controversos podem ser explicados pelo pH do cimento no momento de aplicação (Collado-González et al., 2019).

A biocompatibilidade do 5MO não foi estudada ainda, de modo que os resultados apresentados são pioneiros e visam contribuir de forma relevante para a área de endodontia, uma vez que a biocompatibilidade do 5MO foi semelhante aos grupos de Ca(OH)_2 e controle após 5 min de aplicação sobre os macrófagos de camundongo, e semelhante aos grupos de Ca(OH)_2 , MTA HP e MTA após 24 h. Ainda mais, foi estatisticamente igual a todos os grupos avaliados exceto ao

grupo de NaOCl após 5 min de contato com os osteoblastos, e semelhante ao grupo de Ca(OH)_2 após contato por 24 h, apresentando assim uma biocompatibilidade adequada.

No teste de citotoxicidade do atual estudo, o Ca(OH)_2 foi utilizado como grupo de controle positivo devido a sua biocompatibilidade relatada na literatura (Peng et al., 2021), e o NaOCl como controle negativo devido a sua citotoxicidade relatada na literatura (Jeong et al., 2021).

O MTA é um cimento biocerâmico derivado do cimento de Portland, a diferença na composição química entre os dois é a presença do óxido de bismuto no MTA (Estrela et al., 2000). Conforme o fabricante (Angelus), a principal diferença entre o MTA e MTA HP é na substituição do radiopacificador (de óxido de bismuto para tungstato de cálcio), garantindo a ausência de descoloração dental. Esses resultados foram encontrados no presente estudo na análise XRD, em que o óxido de bismuto encontra-se na composição do MTA e do 5MO e o tungstato de cálcio se encontra na composição do MTA HP.

No presente estudo foi demonstrado que o MTA possui fase química de silicato tricálcio “alite” e o óxido de bismuto, esses resultados concordam com outros relatados na literatura (Camilleri, 2008; Belío-Reyes et al., 2009; Cianconi et al., 2016; Guven et al., 2014), sendo que essa composição junto com a morfologia do MTA que apareceu em formato de partículas alongadas e agulhas são afetadas pelo pH ambiental, pela presença de íons, e pela contaminação com sangue (Bozeman et al., 2006; Lee et al., 2004; Song et al., 2016). Ainda, a cristalinidade apresentada pelos biocerâmicos após manipulados é afetada pela hidratação dos mesmos (Akhavan et al., 2016; Yamamoto et al., 2017), e também, a hidratação é afetada pela técnica de manipulação e inserção (Basturk et al., 2018).

Na literatura consultada, não há estudo sobre a composição química do MTA HP e o 5MO, de modo que o presente estudo demonstrou a presença de

titânio, enxofre e potássio e a ausência de tungstênio no 5MO, o que torna o 5MO diferente do MTA e do MTA HP, e a presença de tungstênio e antimônio no MTA HP o torna diferente do 5MO e do MTA (Figura 22).

Na análise do DRX, foi revelada a presença do dióxido de titânio “anatásio” (TiO₂) no 5MO que é um composto que possui atividade antimicrobiana (Fu et al., 2005; Baran et al., 2021) e apresenta uma biocompatibilidade aumentada (Wachesk et al., 2021), justificando assim o comportamento antimicrobiano do 5MO e a sua biocompatibilidade apresentada no atual estudo.

O MTA apresenta uma radiopacidade maior que a do Super-EBA e IRM (Torabinejad et al., 1995a), porém, outro estudo mais recente, mostrou que o Sealer 26 e IRM apresentam uma radiopacidade maior que a do MTA, e que a radiopacidade do MTA é semelhante à do Super EBA (Tanomaru-Filho et al., 2008). Por outro lado, o MTA apresenta uma radiopacidade maior que a do cimento de Portland que se encontra em diferentes formulações comerciais (Danesh et al., 2006; Islam et al., 2006). A radiopacidade dos cimentos biocerâmicos varia dependendo do radiopacificador, da proporção de pó / água, e do veículo (Camilleri, Gandolfi 2010; Cavenago et al., 2014; Guimarães et al., 2015).

Em geral, todos os biocerâmico apresentam uma radiopacidade maior que a da dentina (Vivan et al., 2009), respeitando o protocolo para radiopacidade de materiais dentários, publicado pela *International Standards Organization (ISO) (International Organization For Standardization, 2012)*. No presente estudo, todos os biocerâmico avaliados mostraram uma radiopacidade adequada, em que o 5MO possui uma radiopacidade corresponde aproximadamente aos 7° - 8° degraus da escala do alumínio (7-8 mm de alumínio) (média entre os dois degraus); o MTA HP possui uma radiopacidade corresponde ao 8° degrau (8 mm) da escala do alumínio e ultrapassa a sua média; e o MTA possui uma

radiopacidade corresponde ao 6º degrau (6 mm) da escala do alumínio. Esses resultados concordam com os relatados na literatura, sendo que os cimentos à base de MTA apresentaram radiopacidade dentro das especificações da *American National Standard Institute/American Dental Association*.

A radiopacidade varia também entre os diferentes tipos do MTA (Mendes et al., 2017, Souza et al., 2015;), porém, o MTA HP apresenta uma radiopacidade semelhante à do MTA (Galarça et al., 2018Guimarães et al., 2018;). Já no presente estudo, o MTA HP apresentou uma radiopacidade maior que à do MTA demonstrada pela presença do tungstato de cálcio (Guimarães et al., 2018).

Finalmente, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo foi demonstrado que o cimento do 5MO e do MTA HP podem ser usados como alternativos ao MTA devido as suas capacidades antimicrobianas e a biocompatibilidade apresentada por ambos, além de possuírem radiopacidade adequada para o uso clínico de materiais dentários.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- Todos os biocerâmicos apresentaram um poder antimicrobiano efetivo promovendo redução da viabilidade dos biofilmes microbianos de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. micra*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*;
- Todos os biocerâmicos apresentaram biocompatibilidades semelhantes em 5 min sobre macrófagos e osteoblastos, entretanto, o 5MO apresentou biocompatibilidade superior após 24 h sobre os macrófagos superior aos demais;
- O 5MO possui pequenas partículas irregulares intercaladas com algumas partículas alongadas semelhantes a agulhas; o MTA HP possui pequenas partículas irregulares com algumas partículas maiores bem como partículas alongadas; e o MTA possui partículas cristalinas;
- O óxido de bismuto é o radiopacificador do MTA e do 5MO, e o tungstato de cálcio é o radiopacificador do MTA HP;
- A principal diferença entre o 5MO e o MTA com relação a sua composição química é a presença de titânio, enxofre e potássio e a ausência de tungstênio no 5MO;
- O dióxido de titânio “anatásio” (TiO₂) que é um composto que possui atividade bactericida explica a ação antimicrobiana e biocompatibilidade do 5MO;
- Os cimentos biocerâmicos avaliados apresentam um grau adequado de radiopacidade.

REFERÊNCIAS

- Abu Hasna A, Khoury RD, Toia CC, Gonçalves GB, de Andrade FB, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial effect of N-acetylcysteine and photodynamic therapy on root canals infected with enterococcus faecalis. *Iran Endod. J.* 2020a Oct;15(4):236-45. doi:10.22037/iej.v15i4.26865
- Abu Hasna A, Pereira Da Silva L, Pelegrini FC, Ferreira CLR, de Oliveira LD, Carvalho CAT. Effect of sodium hypochlorite solution and gel with/without passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and their endotoxins. *F1000Res.* 2020b Jun 24;9:642. doi: 10.12688/f1000research.24721.1. PMID: 33149896; PMCID: PMC7573735.
- Abu Hasna A, Pereira Santos D, Gavlik de Oliveira TR, Pinto ABA, Pucci CR, Lage-Marques JL. Apicoectomy of Perforated Root Canal Using Bioceramic Cement and Photodynamic Therapy. *Int J Dent.* 2020c Dec 9;2020:6677588. doi: 10.1155/2020/6677588. PMID: 33376491; PMCID: PMC7746471.
- Akhavan H, Mohebbi P, Firouzi A, Noroozi M. X-ray Diffraction Analysis of ProRoot Mineral Trioxide Aggregate Hydrated at Different pH Values. *Iran Endod J.* 2016 Spring;11(2):111-3. doi: 10.7508/iej.2016.02.007. Epub 2016 Mar 20. PMID: 27141218; PMCID: PMC4841345.
- Aksel H, Küçükkaya Eren S, Askerbeyli Örs S, Karaismailoğlu E. Surface and vertical dimensional changes of mineral trioxide aggregate and biodentine in different environmental conditions. *J Appl Oral Sci.* 2018 Dec 10;27:e20180093. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0093. PMID: 30540071; PMCID: PMC6296284.
- Al-Hezaimi K, Al-Hamdan K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Effect of white-colored mineral trioxide aggregate in different concentrations on *Candida albicans* in vitro. *J Endod.* 2005 Sep;31(9):684-6. doi: 10.1097/01.don.0000157983.12835.e0. PMID: 16123707.
- Ala Rachi MN, Al-Nahlawi TF and Kouki MT. New Five Minerals Oxides Pulp Capping Material Compared with Dycal. *Dental Materials* 30, p. e126. 2014.
- Al-Nahlawi T, Ala Rachi M, Abu Hasna A. Endodontic Perforation Closure by Five Mineral Oxides Silicate-Based Cement with/without Collagen Sponge

Matrix. *Int J Dent*. 2021 Sep 7;2021:4683689. doi: 10.1155/2021/4683689. PMID: 34539787; PMCID: PMC8443381.

Alsulaimani RS. Immediate and Delayed Repair of 2 Sizes of Furcal Perforations in Dogs' Teeth Using Mineral Trioxide Aggregate Cement. *J Endod*. 2018 Jun;44(6):1000-6. doi: 10.1016/j.joen.2018.02.026.

Andreasen JO, Andreasen FM, Andreasen L. *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth*. 5th ed. United Kingdom: Wiley; 2018.

Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2005 Feb;31(2):101-3. doi: 10.1097/01.don.0000133156.85164.b2. PMID: 15671818.

Asgary S, Moosavi SH, Yadegari Z, Shahriari S. Cytotoxic effect of MTA and CEM cement in human gingival fibroblast cells. Scanning electronic microscope evaluation. *N Y State Dent J*. 2012 Mar;78(2):51-4. PMID: 22685917.

Asgary S, Motazedian HR, Parirokh M, Eghbal MJ, Kheirieh S. Twenty years of research on mineral trioxide aggregate: a scientometric report. *Iran Endod J*. 2013 Winter;8(1):1-5. Epub 2013 Jan 20. Erratum in: *Iran Endod J*. 2013 Spring;8(2):84. PMID: 23411944; PMCID: PMC3570971.

Assmann E, Böttcher DE, Hoppe CB, Grecca FS, Kopper PM. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2015 Jan;41(1):62-6. doi: 10.1016/j.joen.2014.09.019. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25447498.

Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, et al. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA(®). *Int Endod J*. 2014 Dec;47(12):1133-41. doi: 10.1111/iej.12261. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24517569.

Baran W, Cholewiński M, Sobczak A, Adamek E. A New Mechanism of the Selective Photodegradation of Antibiotics in the Catalytic System Containing TiO₂ and the Inorganic Cations. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 13;22(16):8696. doi: 10.3390/ijms22168696. PMID: 34445408; PMCID: PMC8395856.

Barrett WC. Pulp Capping. *Am J Dent Sci*. 1877 Apr;10(12):552-5. PMID: 30752882; PMCID: PMC6100989.

Basturk FB, Nekoofar MH, Gunday M, Dummer PMH. X-ray diffraction analysis of MTA mixed and placed with various techniques. *Clin Oral Investig*. 2018 May;22(4):1675-80. doi: 10.1007/s00784-017-2241-9. Epub 2017 Dec 29. PMID: 29288401.

Belío-Reyes IA, Bucio L, Cruz-Chavez E. Phase composition of ProRoot mineral trioxide aggregate by X-ray powder diffraction. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):875-8. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.004. Epub 2009 Apr 19. PMID: 19482189.

Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod*. 2007 Oct;33(10):1231-4. doi: 10.1016/j.joen.2007.06.012. Epub 2007 Jul 19. PMID: 17889696.

Beyer-Olsen EM, Orstavik D. Radiopacity of root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981 Mar;51(3):320-8. doi: 10.1016/0030-4220(81)90062-1. PMID: 6938892.

Borges AH, Pedro FL, Semanoff-Segundo A, Miranda CE, Pécora JD, Cruz Filho AM. Radiopacity evaluation of Portland and MTA-based cements by digital radiographic system. *J Appl Oral Sci*. 2011 May-Jun;19(3):228-32. doi: 10.1590/s1678-77572011000300009. PMID: 21625738; PMCID: PMC4234334.

Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod*. 2006 May;32(5):425-8. doi: 10.1016/j.joen.2005.08.009. Epub 2006 Feb 17. PMID: 16631841.

Braga JM, Oliveira RR, de Castro Martins R, Vieira LQ, Sobrinho AP. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. *Dent Traumatol*. 2015 Oct;31(5):390-5. doi: 10.1111/edt.12190. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26086068.

Bubenik J. [Regenerating capacity of injured dental pulp]. *Prakt Zahn Lek*. 1954;2(4):74-83. Czech. PMID: 13194470.

Bueno CE, Zeferino EG, Manhães LR Jr, Rocha DG, Cunha RS, De Martin AS. Study of the bismuth oxide concentration required to provide Portland cement with adequate radiopacity for endodontic use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jan;107(1):e65-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.09.016. PMID: 19101486.

Camargo CH, Fonseca MB, Carvalho AS, Camargo SE, Cardoso FG, Valera MC. Microhardness and sealing ability of materials used for root canal perforations. *Gen Dent*. 2012 Nov-Dec;60(6):e393-7. PMID: 23220318.

Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006 Oct;39(10):747-54. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01135.x. PMID: 16948659.

Camilleri J. Characterization and chemical activity of Portland cement and two experimental cements with potential for use in dentistry. *Int Endod J*. 2008 Sep;41(9):791-9. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01439.x. PMID: 18798923.

Camilleri J, Gandolfi MG. Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *Int Endod J*. 2010 Jan;43(1):21-30. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01621.x. PMID: 19891720.

Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J*. 2012 Aug;45(8):737-43. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02027.x. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22394277.

Carvalho AS, Oliveira LD, Cardoso FG, Oliveira FE, Valera MC, Carvalho CA. Limewater and Polymyxin B Associated with NaOCl for Endotoxin Detoxification in Root Canal with Necrotic Pulp. *Braz Dent J*. 2016 Sep-Oct;27(5):573-7. doi: 10.1590/0103-6440201600934. PMID: 27982236.

Carvalho CAT, Hasna AA, Carvalho AS, Vilela PDGF, Ramos LP, Valera MC, et al. Clinical Study of Sodium Hypochlorite, Polymyxin B And Limewater Effect on MMP-3,-8,-9 In Apical Periodontitis. *Braz Dent J*. 2020 Mar-Apr;31(2):116-1. doi: 10.1590/0103-6440202003081. PMID: 32556009.

Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM, et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2014 Feb;47(2):120-6. doi: 10.1111/iej.12120. Epub 2013 May 3. PMID: 23647286.

Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):113-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.036. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24332001.

Cianconi L, Palopoli P, Campanella V, Mancini M. Composition and microstructure of MTA and Aureoseal Plus: XRF, EDS, XRD and FESEM evaluation. *Eur J Paediatr Dent*. 2016 Dec;17(4):281-5. PMID: 28045315.

Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G, et al. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. *J Endod*. 2017 May;43(5):774-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.12.018. Epub 2017 Mar 18. PMID: 28320539.

Collado-González M, López-García S, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Tomás-Catalá CJ, Moraleda JM, et al. Biological effects of acid-eroded MTA Repair HP and ProRoot MTA on human periodontal ligament stem cells. *Clin Oral Investig*. 2019 Oct;23(10):3915-24. doi: 10.1007/s00784-019-02822-2. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30684060.

Coutinho-Filho T, De-Deus G, Klein L, Manera G, Peixoto C, Gurgel-Filho ED. Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Dec;106(6):e69-77. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.07.028. Epub 2008 Oct 16. PMID: 18926734.

Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odontol Revy*. 1972;23(1):27-44. PMID: 4504474.

Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schäfer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod*. 2010 May;36(5):814-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.001. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20416425.

Danesh G, Dammaschke T, Gerth HU, Zandbiglari T, Schäfer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *Int Endod J*. 2006 Mar;39(3):213-9. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01076.x. PMID: 16507075.

Darweesh F, Shahawy T, Zaghloul N, Almowaqee M. Impact of a New Silicate-Based Capping Material on Healing Potentiality of Traumatically Exposed Healthy Dog's Dental Pulp. *Egypt. Dent. J*. 2020 Apr;66(2):981-9. doi: 10.21608/EDJ.2020.24580.1042

Delboni MG, Gomes BP, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* Genotypes from Multiple Oral Sites Associated with Endodontic Failure Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *J Endod*. 2017 Mar;43(3):377-82. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.042. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28131414.

De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J*. 2005 Sep;38(9):604-9. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.00987.x. PMID: 16104973.

ElReash AA, Hamama H, Eldars W, Lingwei G, Zaen El-Din AM, Xiaoli X. Antimicrobial activity and pH measurement of calcium silicate cements versus new bioactive resin composite restorative material. *BMC Oral Health*. 2019 Nov 4;19(1):235. doi: 10.1186/s12903-019-0933-z. PMID: 31684929; PMCID: PMC6829974.

Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J*. 2000;11(1):3-9. PMID: 11210272.

Farrugia C, Baca P, Camilleri J, Arias Moliz MT. Antimicrobial activity of ProRoot MTA in contact with blood. *Sci Rep*. 2017 Jan 27;7:41359. doi: 10.1038/srep41359. PMID: 28128328; PMCID: PMC5269669.

Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep*. 2019 Mar 8;9(1):3933. doi: 10.1038/s41598-019-40365-4. PMID: 30850648; PMCID: PMC6408552.

Flores Orozco EI, Abu Hasna A, Teotonio de Santos Junior M, Flores Orozco EI, Falchete Do Prado R, Rocha Campos G, et al. Case Report: Interdisciplinary management of a complex odontoma with a periapical involvement of superior anterior teeth. *F1000Res*. 2019 Aug 29;8:1531. doi: 10.12688/f1000research.20337.1. PMID: 31824665; PMCID: PMC6880268.

Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med*

Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995 Jun;79(6):756-63. doi: 10.1016/s1079-2104(05)80313-0. PMID: 7621036.

Fu G, Vary PS, Lin CT. Anatase TiO₂ nanocomposites for antimicrobial coatings. *J Phys Chem B*. 2005 May 12;109(18):8889-98. doi: 10.1021/jp0502196. PMID: 16852057.

Galarça AD, Da Rosa WLO, Da Silva TM, da Silveira Lima G, Carreño NLV, Pereira TM, et al. Physical and Biological Properties of a High-Plasticity Tricalcium Silicate Cement. *Biomed Res Int*. 2018 Nov 27;2018:8063262. doi: 10.1155/2018/8063262. PMID: 30622963; PMCID: PMC6288567.

Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Mestieri LB, Falcoski Tde O, Soares CP, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of calcium silicate-based cements on an osteoblast lineage. *Braz Oral Res*. 2016 May 20;30(1):S1806-83242016000100247. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0048. PMID: 27223138.

Guerreiro Tanomaru JM, Storto I, Da Silva GF, Bosso R, Costa BC, Bernardi MI, et al. Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dent Mater J*. 2014;33(4):466-70. doi: 10.4012/dmj.2013-328. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24786343.

Guerreiro-Tanomaru JM, Vázquez-García FA, Bosso-Martelo R, Bernardi MI, Faria G, Tanomaru M Filho. Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physico-chemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements. *J Appl Oral Sci*. 2016 May-Jun;24(3):204-10. doi: 10.1590/1678-775720150422. PMID: 27383700; PMCID: PMC5022225.

Guimarães BM, Tartari T, Marciano MA, Vivian RR, Mondeli RF, Camilleri J, et al. Color stability, radiopacity, and chemical characteristics of white mineral trioxide aggregate associated with 2 different vehicles in contact with blood. *J Endod*. 2015 Jun;41(6):947-52. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.008. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25799532.

Guimarães BM, Prati C, Duarte MAH, Bramante CM, Gandolfi MG. Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitalcem. *J Appl Oral Sci*. 2018 Apr 5;26:e2017115. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0115. PMID: 29641748; PMCID: PMC5912399.

Guven Y, Tuna EB, Dincol ME, Aktoren O. X-ray diffraction analysis of MTA-Plus, MTA-Angelus and DiaRoot BioAggregate. *Eur J Dent*. 2014 Apr;8(2):211-215. doi: 10.4103/2278-344X.130603. PMID: 24966772; PMCID: PMC4054052.

Haapasalo M. Bacteroides spp. in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol*. 1989 Feb;5(1):1-10. doi: 10.1111/j.1600-9657.1989.tb00330.x. PMID: 2598878.

Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spångberg LS, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jun;95(6):739-45. doi: 10.1067/moe.2003.231. PMID: 12789158.

Han L, Okiji T, Okawa S. Morphological and chemical analysis of different precipitates on mineral trioxide aggregate immersed in different fluids. *Dent Mater J*. 2010 Oct;29(5):512-7. doi: 10.4012/dmj.2009-133. Epub 2010 Sep 1. PMID: 20823620.

Holland R, Souza Vd, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J*. 2002;13(1):23-6. PMID: 11870957.

Huang GT, Lin LM. Letter to the editor: comments on the use of the term "revascularization" to describe root regeneration. *J Endod*. 2008 May;34(5):511; author reply 511-2. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.009. Epub 2008 Mar 14. PMID: 18436023.

Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Mar;107(3):e96-102. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.11.015. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19157923.

International Organization For Standardization 2012. ISO - ISO 6876:2012 - Dentistry — Root canal sealing materials [Online]. Available at: <https://www.iso.org/standard/45117.html> [Accessed: 17 March 2021].

Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod.* 2006 Mar;32(3):193-7. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.043. PMID: 16500224.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol.* 2001 Aug;17(4):185-7. doi: 10.1034/j.1600-9657.2001.017004185.x. PMID: 11585146.

Jardine AP, Montagner F, Quintana RM, Zaccara IM, Kopper PMP. Antimicrobial effect of bioceramic cements on multispecies microcosm biofilm: a confocal laser microscopy study. *Clin Oral Investig.* 2019 Mar;23(3):1367-72. doi: 10.1007/s00784-018-2551-6. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30022269.

Jeong JW, Sarmast ND, Terlier T, van der Hoeven R, Holland JN, Parikh N. Assessment of the cytotoxic effects and chemical composition of the insoluble precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Int Endod J.* 2021 Oct;54(10):1892-901. doi: 10.1111/iej.13583. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34081782.

Jiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019 Aug;107(6):2109-20. doi: 10.1002/jbm.b.34304. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30637928.

Jiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. MTA HP Repair stimulates in vitro an homogeneous calcium phosphate phase coating deposition. *J Clin Exp Dent.* 2019 Apr 1;11(4):e322-e326. doi: 10.4317/jced.55661. PMID: 31110610; PMCID: PMC6522111.

KALNINS V. The effect of pressure on the healing of the exposed human dental pulp. *J Dent Res.* 1957 Jun;36(3):437-46. doi: 10.1177/00220345570360031701. PMID: 13428902.

Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000 May;26(5):288-91. doi: 10.1097/00004770-200005000-00010. PMID: 11199738.

Khan S, Kaleem M, Fareed MA, Habib A, Iqbal K, Aslam A, Ud Din S. Chemical and morphological characteristics of mineral trioxide aggregate and

Portland cements. *Dent Mater J.* 2016;35(1):112-7. doi: 10.4012/dmj.2015-117. PMID: 26830831.

Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jan;105(1):e54-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.08.001. PMID: 18155604.

Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993 Nov;19(11):541-4. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81282-3. PMID: 8151240.

Lee YL, Lee BS, Lin FH, Yun Lin A, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials.* 2004 Feb;25(5):787-93. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00591-x. PMID: 14609667.

Linsuwanont P, Kulvitit S, Santiwong B. Reinforcement of Simulated Immature Permanent Teeth after Mineral Trioxide Aggregate Apexification. *J Endod.* 2018 Jan;44(1):163-7. doi: 10.1016/j.joen.2017.08.031. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29153732.

Linsuwanont P, Wimonstuthikul K, Pothimoke U, Santiwong B. Treatment Outcomes of Mineral Trioxide Aggregate Pulpotomy in Vital Permanent Teeth with Carious Pulp Exposure: The Retrospective Study. *J Endod.* 2017 Feb;43(2):225-30. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.027. Epub 2016 Dec 29. PMID: 28041685.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig.* 2020 Sep;24(9):3169-79. doi: 10.1007/s00784-019-03191-6. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31933111.

Marciano MA, Camilleri J, Costa RM, Matsumoto MA, Guimarães BM, Duarte MAH. Zinc Oxide Inhibits Dental Discoloration Caused by White Mineral Trioxide Aggregate Angelus. *J Endod.* 2017 Jun;43(6):1001-7. doi: 10.1016/j.joen.2017.01.029. Epub 2017 Apr 14. PMID: 28416317.

Matsuzaki K, Fujii H, Machida Y. Experimental study of pulpotomy with calcium hydroxide-iodoform paste in dogs' immature permanent teeth. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1990 Feb;31(1):9-15. PMID: 2133445.

Mendes MS, Resende LD, Pinto CA, Raldi DP, Cardoso FG, Habitante SM. Radiopacity of Mineral Trioxide Aggregate with and without Inclusion of Silver Nanoparticles. *J Contemp Dent Pract.* 2017 Jun 1;18(6):448-51. doi: 10.5005/jp-journals-10024-2063. PMID: 28621272.

Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci.* 2014 Nov-Dec;22(6):554-9. doi: 10.1590/1678-775720140209. PMID: 25591023; PMCID: PMC4307770.

Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials.* 1999 Jan;20(2):167-73. doi: 10.1016/s0142-9612(98)00157-4. PMID: 10022786.

Moradi S, Naghavi N, Roohani E, Mohtasham N. Relationship between Duration of Pulp Exposure and Success Rate of Apexogenesis. *Iran Endod J.* 2006 Winter;1(4):145-50. Epub 2007 Jan 20. PMID: 24379882; PMCID: PMC3874111.

Morita M, Kitagawa H, Nakayama K, Kitagawa R, Yamaguchi S, Imazato S. Antibacterial activities and mineral induction abilities of proprietary MTA cements. *Dent Mater J.* 2021 Mar 31;40(2):297-303. doi: 10.4012/dmj.2019-351. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33028785.

Nassar M, Dargham A, Hiraishi N, Tamura Y, Tagami J. In Vitro Mitigation of Arsenic-Induced Toxicity by Reduced Glutathione in Rat Pulp Cells. *Eur Endod J.* 2020 Dec;5(3):277-81. doi: 10.14744/ej.2020.26878. PMID: 33353909; PMCID: PMC7881374.

Nyborg H. Healing processes in the pulp on capping; a morphologic study; experiments on surgical lesions of the pulp in dog and man. *Acta Odontol Scand.* 1955;13(suppl. 16):1-130. PMID: 14387628.

Omidi S, Bagheri M, Fazli M, Ahmadiankia N. The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human

dental pulp stem cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2020 Jun;23(6):768-75. doi: 10.22038/ijbms.2020.41511.9814. PMID: 32695293; PMCID: PMC7351436.

CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - tenth edition.* CLSI documento M07-A10. Wayne, Pa: Clinical and laboratory standards institute, 2015.

Pelliccioni GA, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Nanni M, Pagani S, Giunti A. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J Mater Sci Mater Med.* 2004 Feb;15(2):167-73. doi: 10.1023/b:jmsm.0000011819.26935.47. PMID: 15330052.

Peng W, Huan Z, Pei G, Li J, Cao Y, Jiang L, Zhu Y. Silicate bioceramics elicit proliferation and odonto-genic differentiation of human dental pulp cells. *Dent Mater J.* 2021 Aug 19. doi: 10.4012/dmj.2021-042. Epub ahead of print. PMID: 34408120.

Pincemaille M. [Conservative treatment of the pulp in pulpitis; cicatrization of pulp wounds by formation of secondary dentin; history]. *Inf Dent.* 1950 Oct 19;32(42):1876-87. Undetermined Language. PMID: 14794238.

Prestegaard H, Portenier I, Ørstavik D, Kayaoglu G, Haapasalo M, Endal U. Antibacterial activity of various root canal sealers and root-end filling materials in dentin blocks infected ex vivo with *Enterococcus faecalis*. *Acta Odontol Scand.* 2014 Nov;72(8):970-6. doi: 10.3109/00016357.2014.931462. Epub 2014 Jul 9. PMID: 25005627.

Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater.* 2021 Feb;37(2):311-20. doi: 10.1016/j.dental.2020.11.014. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33323301.

Ribeiro CS, Scelza MF, Hirata Júnior R, Buarque de Oliveira LM. The antimicrobial activity of gray-colored mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Jun;109(6):e109-12. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.02.008. PMID: 20451826.

Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of

calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J.* 2017 Jan;50(1):67-76. doi: 10.1111/iej.12596. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26660310.

Saberi EA, Karkehabadi H, Mollashahi NF. Cytotoxicity of Various Endodontic Materials on Stem Cells of Human Apical Papilla. *Iran Endod J.* 2016 Winter;11(1):17-22. doi: 10.7508/iej.2016.01.004. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26843872; PMCID: PMC4731528.

Saeki K, Fujita Y, Shiono Y, Morimoto Y, Maki K. Pulp revascularization in immature permanent tooth with apical periodontitis using mineral trioxide aggregate. *Case Rep Med.* 2014;2014:564908. doi: 10.1155/2014/564908. Epub 2014 May 14. PMID: 24959181; PMCID: PMC4052928.

Sáez MDM, López GL, Atlas D, de la Casa ML. Evaluation of pH and calcium ion diffusion from calcium hydroxide pastes and MTA. *Acta Odontol Latinoam.* 2017 Apr;30(1):26-32. English. PMID: 28688183.

Salem-Milani A, Ghasemi S, Rahimi S, Ardalan-Abdollahi A, Asghari-Jafarabadi M. The Discoloration effect of White Mineral Trioxide Aggregate (WMTA), Calcium Enriched Mixture (CEM), and Portland Cement (PC) on Human Teeth. *J Clin Exp Dent.* 2017 Dec 1;9(12):e1397-e1401. doi: 10.4317/jced.54075. PMID: 29410754; PMCID: PMC5794116.

Schmitt D, Lee J, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent.* 2001 Jul-Aug;23(4):326-30. PMID: 11572491.

Schröder U. Evaluation of healing following experimental pulpotomy of intact human teeth and capping with calcium hydroxide. *Odontol Revy.* 1972;23(3):329-40. PMID: 4507744.

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006 Oct;85(10):870-7. doi: 10.1177/154405910608501001. PMID: 16998124.

Silva EJ, Carvalho NK, Zanon M, Senna PM, DE-Deus G, Zuolo ML, Zaia AA. Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz Oral Res.* 2016 Jun 14;30(1):S1806-83242016000100269. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0084. PMID: 27305515.

Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015 Nov;19(8):2015-25. doi: 10.1007/s00784-015-1412-9. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25644135.

Silva PAO, Lima SMF, Martins DCM, Amorim IA, Lacorte C, de Almeida JA, et al. Concentrated MTA Repair HP reduced biofilm and can cause reparative action at a distance. *Int Endod J*. 2021 Oct;54(10):1925-36. doi: 10.1111/iej.13592. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34164821.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr;26(2):255-73. doi: 10.1128/CMR.00082-12. PMID: 23554416; PMCID: PMC3623375.

Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Dec;102(6):809-15. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.11.034. Epub 2006 Apr 21. PMID: 17138186.

Song M, Yue W, Kim S, Kim W, Kim Y, Kim JW, et al. The effect of human blood on the setting and surface micro-hardness of calcium silicate cements. *Clin Oral Investig*. 2016 Nov;20(8):1997-2005. doi: 10.1007/s00784-015-1693-z. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26696117.

Souza LC, Yadlapati M, Dorn SO, Silva R, Letra A. Analysis of radiopacity, pH and cytotoxicity of a new bioceramic material. *J Appl Oral Sci*. 2015 Jul-Aug;23(4):383-9. doi: 10.1590/1678-775720150065. PMID: 26398510; PMCID: PMC4560498.

Swift EJ Jr, Trope M. Treatment options for the exposed vital pulp. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1999 Aug;11(6):735-9; quiz 740. PMID: 10635232.

Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Duarte MA, Gonçalves M, Tanomaru JM. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *J Appl Oral Sci*. 2008 Nov-Dec;16(6):376-9. doi: 10.1590/s1678-77572008000600004. PMID: 19082394; PMCID: PMC4327706.

Tenca JJ, Tsamtsouris A. Continued root end development: apexogenesis and apexification. *J Pedod*. 1978 Winter;2(2):144-57. PMID: 289748.

Tobin DF. Pulpotomy technic. *Dent Surv.* 1946;22(5):888-90. PMID: 20981971.

Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod.* 2018 Jan;44(1):126-32. doi: 10.1016/j.joen.2017.07.017. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29079052.

Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2017 Dec;50 Suppl 2:e63-e72. doi: 10.1111/iej.12859. Epub 2017 Oct 6. PMID: 28891221.

Torabinejad, M. 1993. US5415547A - Tooth filling material and method of use - Google Patents [Online]. Available at: <https://patents.google.com/patent/US5415547A/en> [Accessed: 13 May 2018].

Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993 Dec;19(12):591-5. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80271-2. PMID: 8151252.

Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod.* 1994 Apr;20(4):159-63. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80326-2. PMID: 8035153.

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995a Jul;21(7):349-53. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80967-2. PMID: 7499973.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995b Aug;21(8):403-6. doi: 10.1016/s0099-2399(06)80824-1. PMID: 7595152.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995c Oct;21(10):489-92. doi: 10.1016/s0099-2399(06)80518-2. PMID: 8596067.

Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod.* 1995d Mar;21(3):109-12. doi: 10.1016/s0099-2399(06)80433-4. PMID: 7561650.

Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod.* 1995 Jun;21(6):295-9. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81004-6. PMID: 7673836.

Torabinejad, M, Walton RE. *Endodontics: Principles and Practice.* 3rd ed. Elsevier Health Sciences. 2009

Tsai CL, Ke MC, Chen YH, Kuo HK, Yu HJ, Chen CT, Tseng YC, Chuang PC, Wu PC. Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2018 May 15;19(1):21. doi: 10.1186/s40360-018-0214-5. PMID: 29764492; PMCID: PMC5952617.

Tu MG, Sun KT, Wang TH, He YZ, Hsia SM, Tsai BH, et al. Effects of mineral trioxide aggregate and bioceramics on macrophage differentiation and polarization in vitro. *J Formos Med Assoc.* 2019 Oct;118(10):1458-65. doi: 10.1016/j.jfma.2019.07.010. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31358435.

Vazquez-Garcia F, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Basso-Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Effect of Silver Nanoparticles on Physicochemical and Antibacterial Properties of Calcium Silicate Cements. *Braz Dent J.* 2016 Sep-Oct;27(5):508-14. doi: 10.1590/0103-6440201600689. PMID: 27982226.

Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Hungaro Duarte MA, et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Dec;108(6):e35-8. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.07.037. PMID: 19913718.

Wachesk CC, Seabra SH, Dos Santos TAT, Trava-Airoldi VJ, Lobo AO, Marciano FR. In vivo biocompatibility of diamond-like carbon films containing TiO₂ nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2021 Aug 30;32(9):117. doi: 10.1007/s10856-021-06596-6. PMID: 34460018; PMCID: PMC8405490.

Willershausen I, Wolf T, Kasaj A, Weyer V, Willershausen B, Marroquin BB. Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. *Arch Oral Biol.* 2013 Sep;58(9):1232-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.04.002. Epub 2013 May 3. PMID: 23647932.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941-53. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023. Epub 2008 Apr 28. PMID: 18440630.

Yadav P, Pruthi PJ, Naval RR, Talwar S, Verma M. Novel use of platelet-rich fibrin matrix and MTA as an apical barrier in the management of a failed revascularization case. *Dent Traumatol*. 2015 Aug;31(4):328-31. doi: 10.1111/edt.12168. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25787690.

Yamamoto S, Han L, Noiri Y, Okiji T. Evaluation of the Ca ion release, pH and surface apatite formation of a prototype tricalcium silicate cement. *Int Endod J*. 2017 Dec;50 Suppl 2:e73-e82. doi: 10.1111/iej.12737. Epub 2017 Jan 16. PMID: 27977862.

Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J*. 2013;24(2):111-6. doi: 10.1590/0103-6440201302115. PMID: 23780362.

Youssef AR, Emara R, Taher MM, Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health*. 2019 Jul 2;19(1):133. doi: 10.1186/s12903-019-0827-0. PMID: 31266498; PMCID: PMC6604301.

Zhu X, Yuan Z, Yan P, Li Y, Jiang H, Huang S. Effect of iRoot SP and mineral trioxide aggregate (MTA) on the viability and polarization of macrophages. *Arch Oral Biol*. 2017 Aug;80:27-33. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.03.010. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28364673.