



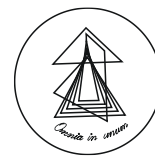
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora

Programa de Pós-graduação em Ciências

Saúde Bucal da Criança



PRISCILA TIYOKO SOUZA SHIMOKOMAKI

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E LIBERAÇÃO DE ÍONS DE
MATERIAIS DE FORRAMENTO A BASE DE SILICATO
DE CÁLCIO**

ARAÇATUBA – SP

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA
Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora

Programa de Pós-graduação em Ciências

Saúde Bucal da Criança



AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E LIBERAÇÃO DE ÍONS DE MATERIAIS DE FORRAMENTO A BASE DE SILICATO DE CÁLCIO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde Bucal da Criança junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

ARAÇATUBA – SP

2025

PRISCILA TIYOKO SOUZA SHIMOKOMAKI

Avaliação da citotoxicidade, atividade antimicrobiana e liberação de íons de materiais de forramento a base de Silicato de cálcio

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde Bucal da Criança junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem
UNESP – Câmpus de Araçatuba
Orientador

Prof^a. Dr^a. Fernanda Vicioni Marques
UNESP – Odontologia Preventiva e Restauradora – Câmpus de Araçatuba Prof. Dr.

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
USP – Ciências Biológicas – Câmpus de Bauru

Prof. Dr. Caio Sampaio
UNESP – Odontologia Preventiva e Restauradora – Câmpus de Araçatuba

Prof^a. Dr^a. Carla Oliveira Favretto
Faculdade Morgana Potrich – Odontopediatria

ARAÇATUBA – SP
06/03/202

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S556a Shimokomaki, Priscila Tiyoko Souza.
Avaliação da citotoxicidade, atividade antimicrobiana e liberação de íons de materiais de forramento a base de silicato de cálcio / Priscila Tiyoko Souza Shimokomaki. - Araçatuba, 2025
49 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Capeamento da polpa dentária 2. Calcarea silicata
3. Fluoretos 4. Fósforo I. T.

Black D27
CDD 617.645

Dedicatória

Dedicatória

À Deus e toda espiritualidade

Pela luz e força que me sustentaram ao longo desta jornada, pela fé que guiou meus passos e pela serenidade concedida nos momentos de adversidade.

Aos meus pais, Roberto e Cleide:

Pelo amor incondicional que me fortalece, pelo apoio incansável em cada escolha, pelo incentivo que me fez acreditar que o conhecimento transforma e pela escuta atenta nos dias difíceis, quando a saudade e os desafios pareciam grandes demais. Mais do que pais, vocês são meus pilares, meus exemplos e meus maiores amigos. Sem vocês, esta conquista não seria possível.

Agradecimentos especiais

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, Roberto e Cleide:

Obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio em todas as esferas da minha vida e pelo incentivo contínuo à minha formação acadêmica. A presença de vocês, mesmo à distância, foi essencial para que eu pudesse seguir em frente com determinação e coragem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem:

Meu mais sincero agradecimento pela paciência, pelos ensinamentos valiosos e pela orientação cuidadosa, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sou imensamente grata pela confiança, dedicação e apoio em cada etapa do processo. Sua orientação foi fundamental para meu crescimento, e levo comigo não apenas os aprendizados, mas também a inspiração do seu exemplo. Seu compromisso e dedicação serviram de inspiração ao longo desta caminhada. Foi uma honra ter sido sua orientanda!

Aos professores e colegas do departamento:

Pelo compartilhamento generoso de conhecimento, pelas trocas intelectualmente enriquecedoras e pelo apoio mútuo nos desafios da pesquisa. A convivência acadêmica, marcada pelo respeito, pela colaboração e pelo aprendizado conjunto, foi essencial para minha evolução como pesquisadora e tornou essa jornada ainda mais gratificante.

À minha dupla de pesquisa:

Muito obrigada por compartilhar a rotina diária e por ser a melhor dupla de pesquisa que eu poderia ter. Sua parceria tornou meus dias em Araçatuba mais leves e gratificantes! Sou imensamente grata pela sua amizade, pelas risadas e pelas conversas que tornaram essa jornada ainda mais especial. Obrigada por me acolher com tanto carinho e por toda a ajuda ao longo da minha pesquisa, sua presença e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho. Que possamos continuar compartilhando muitos cafés, boas conversas e momentos de alegria.

Aos amigos goianos:

Aos amigos, que, mesmo à distância, estiveram sempre presentes, oferecendo apoio incondicional, palavras de incentivo e acolhimento nos momentos de incerteza. Foram suas mensagens, ligações e gestos de carinho que tornaram os dias difíceis mais suportáveis e os momentos de conquista ainda mais especiais. A amizade e o companheirismo de cada um de vocês fizeram desta jornada uma experiência mais leve, significativa e inesquecível. Sou imensamente grata por tê-los ao meu lado.

Aos amigos que fiz durante essa trajetória:

Aos amigos que a academia me presenteou durante minha estadia em Araçatuba, minha mais profunda gratidão. Obrigada por cada palavra de incentivo, pelos conselhos sempre tão certos e pelo companheirismo inabalável. Juntos, dividimos angústias, superamos desafios e, acima de tudo, celebramos momentos inesquecíveis, tanto na pesquisa quanto na vida. Vocês tornaram meus dias mais leves, mais felizes e mais significativos. Levo comigo cada lembrança e a certeza de que a amizade que construímos seguirá para além desta jornada.

Ao projeto Primeiros Passos:

Minha mais profunda gratidão, por todo conhecimento compartilhado, por acreditarem em mim e me permitirem fazer parte dessa missão tão especial. Cada sexta-feira foi um aprendizado único, um momento de troca e dedicação em que, juntos, ajudamos tantas mães e bebês. Obrigada por me ensinarem não apenas a técnica, mas a sensibilidade, o profissionalismo e o carinho genuíno pelo cuidado à puérpera e ao recém-nascido. Foram momentos que marcaram minha trajetória, e levo comigo não apenas o aprendizado, mas também o orgulho do time incrível que formamos.

Ao projeto Sorriso Feliz:

Obrigada pelo conhecimento compartilhado, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de fazer parte de uma missão tão significativa. Cada sorriso devolvido foi a prova do impacto transformador do nosso trabalho, e cada criança atendida me ensinou o verdadeiro significado do cuidado, da empatia e do compromisso com a saúde. Sou imensamente grata pelo time extraordinário que formamos, pela dedicação incansável de cada membro, pelo apoio da bolsa financeira e, acima de tudo, por acreditarem que a prevenção é o caminho mais poderoso para mudar realidades. Essa experiência será para sempre um marco em minha jornada e seguirá viva em meu coração.

Agradecimentos

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor Prof. Assoc. Luciano Tavares Ângelo Cintra.

Ao programa de **Pós-Graduação em Ciência Odontológica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP representado pelo seu coordenador Prof. Assoc. **Juliano Pelim Pessan**, pela competência e qualidade na condução do programa de pós-graduação.

Aos funcionários da **Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela eficiência e profissionalismo.

Aos funcionários da área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Marcel** e **Mário**, pela ajuda, atenção e suporte prestados.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada gesto de apoio, cada palavra de encorajamento e cada contribuição, por menor que parecesse, teve um impacto imensurável em minha trajetória.

A todos, o meu mais sincero obrigada.

Epígrafe

Epígrafe

"Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos começos".

Lao Tzu

Resumo

Resumo

Shimokomaki, PTSS. **Avaliação da citotoxicidade, atividade antimicrobiana e liberação de íons de materiais de forramento a base de Silicato de cálcio.** 2025. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2025.

Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana, citotoxicidade e liberação de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais TheraBase, TheraCal LC, TheraCal PT e Fuji II LC. A liberação de íons foi analisada após imersão em água deionizada ou fluido corporal simulado (SBF) a 37 °C por 24 horas, seguida de espectrofotometria (Ca^{2+} e PO_4^{3-}) ou eletrodo íon-específico (F^-). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de halo de inibição em ágar contendo os seguintes microrganismos: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. A viabilidade celular foi testada em odontoblastos pelo ensaio de MTT em odontoblastos por 24, 48 e 72 horas. Análise estatística foi realizada com nível de significância de 5%. Para a avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais e avaliação da viabilidade celular foi usado ANOVA a dois critérios, seguida do teste de Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$). Para avaliação do teste antimicrobiano foi usado ANOVA a um critério, seguida do teste de Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$). O Fuji II LC apresentou maior liberação de F^- em pH ácido, enquanto o TheraCal LC se destacou na liberação de Ca^{2+} em pH ácido. Não houve liberação de PO_4^{3-} para nenhum dos materiais avaliados. Entre os materiais à base de Ca_2SiO_4 , o TheraCal LC demonstrou maior atividade antimicrobiana contra *A. israelii*, *L. casei* e *C. albicans*. O TheraCal PT não apresentou potencial de inibição. Em relação à viabilidade celular, TheraCal LC e TheraBase mantiveram maior viabilidade após 72 horas, enquanto Fuji II LC foi mais citotóxico. Conclui-se que o TheraCal LC e o TheraBase são materiais promissores para aplicação clínica, pois o TheraCal LC demonstrou elevada liberação de Ca^{2+} , enquanto o TheraBase apresentou liberação tanto de Ca^{2+} quanto de F^- . Ambos os materiais apresentaram atividade antimicrobiana eficaz contra *A. israelii*, *C. albicans* e *L. casei*, além de garantir viabilidade celular satisfatória, superando os outros materiais testados.

Palavras-chave: Capeamento da polpa dentária, Calcareia silicata, Fluoretos, Fósforo.

Abstract

Abstract

Shimokomaki, PTSS. **Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and ion release of lining materials based on calcium silicate.** 2025. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2025.

This study evaluated the antimicrobial activity, cytotoxicity, and ion release (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , and F^-) of the materials TheraBase, TheraCal LC, TheraCal PT, and Fuji II LC. Ion release was analyzed after immersion in deionized water or simulated body fluid (SBF) at 37°C for 24 hours, followed by spectrophotometry (for Ca^{2+} and PO_4^{3-}) or ion-specific electrode (for F^-). Antimicrobial activity was assessed using the agar diffusion method with the following microorganisms: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii*, *Candida albicans*, and *Enterococcus faecalis*. Cell viability was tested in odontoblasts using the MTT assay after 24, 48, and 72 hours of exposure. Statistical analysis was performed with a significance level of 5%. For the evaluation of Ca^{2+} , PO_4^{3-} , and F^- ion release and cell viability, two-way ANOVA was used, followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). For the antimicrobial test, one-way ANOVA was used, followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Fuji II LC showed the highest F^- release in acidic pH, while TheraCal LC was notable for its Ca^{2+} release under the same conditions. No PO_4^{3-} release was observed for any of the materials tested. Among the Ca_2SiO_4 -based materials, TheraCal LC exhibited the highest antimicrobial activity against *A. israelii*, *L. casei*, and *C. albicans*, while TheraCal PT showed no inhibition potential. Regarding cell viability, TheraCal LC and TheraBase maintained higher viability after 72 hours, whereas Fuji II LC was more cytotoxic. In conclusion, TheraCal LC and TheraBase are promising materials for clinical application, as TheraCal LC demonstrated high Ca^{2+} release, while TheraBase released both Ca^{2+} and F^- . Both materials exhibited effective antimicrobial activity against *A. israelii*, *C. albicans*, and *L. casei*, in addition to ensuring satisfactory cell viability, outperforming the other materials tested.

Keywords: Pulp capping, Calcium silicate, Fluorides, Phosphorus.

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1. Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de 34 inibição para os diferentes microrganismos de acordo com os materiais testados. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$). Teste de halo de inibição em ágar, $n=9$ (one-way ANOVA, Student-Newman-Keuls test, $p < 0.05$).

Figura 2. Colunas em azul, laranja e cinza indicam os períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, de exposição de MDPC-23 em contato com os materiais (two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$)), $n=9$. Médias e desvio-padrão (barras) para os diferentes grupos e tempos avaliados. Letras distintas denotam diferença estatística entre os grupos e tempos ($p < 0,05$).

Lista de quadros e tabelas

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1.	Identificação dos materiais a serem testados	28
Quadro 2.	Reagentes para a preparação do fluido corporal simulado (SBF) na ordem de dissolução, em água deionizada, exigida	29

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão (DP) da determinação de F^- , Ca^{2+} e PO_4^{3-} após 24 horas de imersão em água, SBF pH 7,0 e SBF pH 4,0 33

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. Materiais avaliados	28
2.2. Confeção dos corpos de prova	28
2.3. Avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais	29
2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana	31
2.5. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT	31
2.6. Análise estatística.....	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais.....	33
3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	34
3.3. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT	34
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	45

Avaliação da citotoxicidade, atividade antimicrobiana e liberação de íons de materiais de forramento a base de Silicato de cálcio

RESUMO

Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana, citotoxicidade e liberação de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais TheraBase, TheraCal LC, TheraCal PT e Fuji II LC. A liberação de íons foi analisada após imersão em água deionizada ou fluido corporal simulado (SBF) a 37 °C por 24 horas, seguida de espectrofotometria (Ca^{2+} e PO_4^{3-}) ou eletrodo íon-específico (F^-). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de halo de inibição em ágar contendo os seguintes microrganismos: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. A viabilidade celular foi testada em odontoblastos pelo ensaio de MTT em odontoblastos por 24, 48 e 72 horas. Análise estatística foi realizada com nível de significância de 5%. Para a avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais e avaliação da viabilidade celular foi usado ANOVA a dois critérios, seguida do teste de Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$). Para avaliação do teste antimicrobiano foi usado ANOVA a um critério, seguida do teste de Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$). O Fuji II LC apresentou maior liberação de F^- em pH ácido, enquanto o TheraCal LC se destacou na liberação de Ca^{2+} em pH ácido. Não houve liberação de PO_4^{3-} para nenhum dos materiais avaliados. Entre os materiais à base de Ca_2SiO_4 , o TheraCal LC demonstrou maior atividade antimicrobiana contra *A. israelii*, *L. casei* e *C. albicans*. O TheraCal PT não apresentou potencial de inibição. Em relação à viabilidade celular, TheraCal LC e TheraBase mantiveram maior viabilidade após 72 horas, enquanto Fuji II LC foi mais citotóxico. Conclui-se que o TheraCal LC e o TheraBase são materiais promissores para aplicação clínica, pois o TheraCal LC demonstrou elevada liberação de Ca^{2+} , enquanto o TheraBase apresentou liberação tanto de Ca^{2+} quanto de F^- . Ambos os materiais apresentaram atividade antimicrobiana eficaz contra *A. israelii*, *C. albicans* e *L. casei*, além de garantir viabilidade celular satisfatória, superando os outros materiais testados.

Palavras-chave: Capeamento da polpa dentária, Calcareia silicata, Fluoretos, Fósforo.

1. INTRODUÇÃO

Em protocolos de capeamento pulpar, fatores físicos, químicos, biológicos e térmicos são levados em consideração [1, 2]. Dentre os fatores que afetam a saúde da polpa em cavidades profundas, destacam-se a quantidade de espessura de dentina remanescente, tipos de materiais utilizados para o capeamento pulpar e a reação exotérmica durante os protocolos [3]. Em cavidades profundas, nota-se que há presença de toxinas bacterianas, bem como alternância de temperatura, afetando o tecido pulpar [4]. Durante o protocolo, para que se forme uma barreira a fim de proteger o complexo dentino-pulpar e preservar sua vitalidade, é necessário a aplicação de um material dentário para capeamento pulpar [5].

Biomateriais utilizados na proteção do complexo dentino-pulpar devem possuir características específicas que permitem a regeneração da dentina e a preservação da vitalidade pulpar. Dentre essas características, destacam-se a capacidade de induzir a diferenciação celular, promover a formação de tecido mineralizado, e garantir a biocompatibilidade. Materiais como o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e o óxido de cálcio (CaO) têm sido amplamente utilizados em procedimentos de capeamento pulpar direto e indireto devido à sua habilidade em liberar íons hidroxila (OH^-) e cálcio (Ca^{2+}), que desempenham um papel fundamental na formação de dentina secundária e na promoção da regeneração pulpar [6]. Esses materiais, além de promoverem uma ação antimicrobiana, são eficazes em manter um pH alcalino, o que auxilia na defesa contra infecções bacterianas [7].

Ca(OH)_2 destaca-se desvantagens como a baixa resistência mecânica, tornando-se uma condição crítica em capeamentos pulpares e, conseqüentemente, limitando-se principalmente a forramentos cavitários em áreas que não suportam cargas excessivas [9]. O alto grau de solubilidade em água desses materiais pode levar a sua degradação com o tempo, tornando-os vulneráveis ao amolecimento e à infiltração marginal, o que pode comprometer a eficiência do tratamento. É importante destacar a possibilidade de induzir calcificações ectópicas ou a formação de uma barreira mineralizada irregular ou incompleta, maior taxa de falhas na manipulação do material durante o capeamento pulpar, além do tempo de trabalho limitado para a aplicação do cimento de Ca(OH)_2 [9].

Para superar essas limitações e melhorar as propriedades mecânicas e biológicas dos materiais à base de Ca(OH)_2 , têm sido desenvolvidos materiais modificados com resinas, que transportam fontes adicionais de Ca^{2+} , como o silicato de cálcio (Ca_2SiO_4). O Ca_2SiO_4 é uma alternativa ao Ca(OH)_2 , uma vez que não apenas libera íons Ca^{2+} e OH^-

, mas também favorece a remineralização da dentina e estimula a formação de tecidos mineralizados. A utilização de Ca_2SiO_4 ajuda a criar um ambiente favorável à liberação de íons, o que promove a regeneração pulpar e a remineralização das lesões cariosas [10]. Recentemente, o uso de materiais modificados por resina à base de Ca_2SiO_4 tem mostrado um grande potencial, com algumas opções já disponíveis no mercado, como o TheraBase, TheraCal LC e TheraCal PT (Bisco Inc, Schamburg, IL, EUA).

Os materiais TheraBase, TheraCal LC e TheraCal PT, de acordo com o fabricante, apresentam propriedades avançadas que os diferenciam dos materiais tradicionais à base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. O TheraBase é um material autoadesivo fotopolimerizável química e fisicamente, que se liga quimicamente à estrutura dentária, liberando íons Ca^{2+} , favorecendo a durabilidade do tratamento e reduzindo o risco de fraturas em dentes tratados (Bisco Inc, Schamburg, IL, EUA). O TheraCal LC, por sua vez, é fotopolimerizável e indicado para capeamento pulpar direto e indireto, promovendo a alcalinização do ambiente e estimulando a remineralização dentinária por meio da liberação de íons Ca^{2+} e OH^- [8]. Já o TheraCal PT, assim como o TheraBase, é um material fotopolimerizável química e fisicamente, modificado por resina. Destaca-se por sua biocompatibilidade e aplicação em pulpotomias, além de atuar como uma barreira eficaz contra agentes patogênicos, preservando a vitalidade pulpar [11]. Esses materiais possuem vantagens como maior adesão à dentina e resistência mecânica, garantindo sua eficácia em condições clínicas desafiadoras, especialmente em tratamentos que envolvem forças mastigatórias significativas [12].

Materiais de Ca_2SiO_4 têm se mostrado uma alternativa promissora para as terapias conservadoras no contexto de capeamento pulpar. Eles oferecem uma combinação única de propriedades bioativas, que tanto ajudam a preservar a vitalidade do complexo dentino-pulpar, como propriedades mecânicas, que garantem a resistência e durabilidade do tratamento. Entretanto, apesar dos avanços significativos, não existem na literatura estudos avaliando a liberação de íons, atividade antimicrobiana e citotoxicidade. Diante disso, a proposta desse estudo foi avaliar a liberação de íons Ca^{2+} , Fósforo (P) e Fluoreto (F), atividade antimicrobiana e citotoxicidade em odontoblastos dos materiais à base de Ca_2SiO_4 .

Para a comparação dos materiais à base de Ca_2SiO_4 , foi escolhido o Fuji II LC, por ser um biomaterial resinoso. Trata-se de um ionômero de vidro fotopolimerizável que, segundo o fabricante, apresenta adesão à estrutura dentária, capacidade de liberação e reincorporação de flúor, coeficiente de expansão térmica linear semelhante ao do dente e

biocompatibilidade. Além disso, sua aplicação clínica foi ampliada para incluir restaurações oclusais em dentes decíduos, bases e forramentos cavitários, proporcionando maior resistência [6]. A hipótese nula deste estudo é que os materiais à base de Ca_2SiO_4 não apresentariam maior viabilidade celular, potencial antimicrobiano ou capacidade de liberação de íons em relação ao Fuji II LC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais avaliados

Os materiais avaliados foram fornecidos pela BISCO Company (Schaumburg, IL, USA) e estão listados no Quadro 1 com as descrições do nome dos materiais, fabricante, tipo de polimerização, uso e ativos.

Quadro 1. Identificação dos materiais a serem testados

	TheraBase	TheraCal LC	TheraCal PT	Fuji II LC
Fabricante	BISCO Company, Schaumburg, IL, USA	BISCO Company, Schaumburg, IL, USA	BISCO Company, Schaumburg, IL, USA	GC Corporation, Tokyo, JAPAN
Base	Auto-adesivo	Resina modificada	Resina modificada	Ionômero de vidro modificado por resina
Uso	Forrador	Forrador/ Protetor pulpar	Pulpotomia	Forrador/ restaurador
Cura	Polimerização dupla	Fotoativado	Polimerização dupla	Fotoativado
Ativos	Silicato de cálcio Fluoreto	Silicato de cálcio	Silicato de cálcio	Fluoreto

2.2. Confeção dos corpos de prova

Foram confeccionados, para cada material (Quadro 1), 12 corpos-de-prova, os quais foram obtidos a partir de matrizes de policloreto de vinila transparente (PVC, Plásticos Ibirá, Itaquaquecetuba, SP, Brasil) com diâmetro interno de 4,7 mm e altura de 2,5 mm.

O Fuji II LC foi manipulado seguindo as instruções do fabricante: proporção padrão de pó/líquido é de 3,2g / 1,0g (1 colher rasa de pó para 2 gotas de líquido), manipulação realizada em bloco de papel que acompanha o material e espátula de plástico e inserção utilizando espátula nº1 (Golgran, Brasil). Os demais materiais apresentam-se preparados e acondicionados em seringas com bico aplicador. A matriz de PVC foi colocada sobre uma lâmina de vidro e tira de poliéster, e os materiais foram inseridos em um único incremento na cavidade da matriz, com o objetivo de evitar a inclusão de bolhas de ar durante os procedimentos de inserção. A seguir, a superfície do material foi coberta com tira matriz de poliéster, seguida da aplicação de uma lâmina de vidro. Nestas condições, aplicou-se uma carga de 50g durante 1 minuto para que ocorra o extravasamento do excesso do material. A fotopolimerização foi realizada com fotopolimerizador (VALO™ X, Rechargeable Lithium-Ion Battery, Ultradent Products, Inc), por período de fotopolimerização recomendada pelo fabricante, nas superfícies superior e inferior [8, 9]. Após a polimerização, os excessos foram cuidadosamente removidos com auxílio de lâmina de bisturi nº 15C (Medix, Brasil) [13, 14]

2.3. Avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais

Corpos-de-prova (descritos no item 2.2.) foram colocados em tubos de ensaios de polipropileno com tampa contendo 2 mL de água deionizada ou fluido corporal simulado (SBF) com pH 7,0 e pH 4,0 (Quadro 2) baseado na ISO 23317:2014. O pH das soluções foi ajustado com reagentes HCl para pH ácido e NaOH para pH básico, utilizando um eletrodo de pH (Pencil-Thin Epox Body Gel-filled combination electrode, Accumet, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) calibrado com padrões de pH 7,0 e 4,0. Os tubos contendo os corpos-de-prova foram mantidos sob agitação constante com frequência de 120 rpm em incubadora com mesa agitadora (TE-420 Orbital, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) à temperatura de 37° C. Após 24 horas, os corpos-de-prova foram removidos e os tubos foram armazenados a 4° C para posterior leitura de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- liberado nos meios.

Quadro 2. Reagentes para a preparação do fluido corporal simulado (SBF) na ordem de dissolução, em água deionizada, exigida

Ordem	Reagente*	Qtde
1	Cloreto de sódio (NaCl)	8,035 g

2	Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	0,355 g
3	Cloreto de potássio (KCl)	0,225 g
4	Hidrogenofosfato dipotássico tri-hidratado (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	0,231 g
5	Cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0,311 g
6	Ácido clorídrico (HCl 1 mol/L)	39 mL
7	Cloreto de cálcio diidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0,292 g
8	Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄)	0,072 g
9	Tris-hidroximetil aminometano (TRIS - (HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	6,118 g
10	HCl 1 mol/L (para correção do pH)	0 a 5 mL

*Sigma-Aldrich Brazil Ltda., Brazil. ISO 23317:2014. Q.s.p. 1 L.

As concentrações de Ca²⁺ foi determinado através de um espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer EONC, Biotek, Winooski, VT, USA) com comprimento de onda de 650 nm pelo método colorimétrico do Arsenazo III [15]. Alíquotas de 5 µL foram coletadas das amostras e 50 µL de água deionizada e 50 µL de Arsenazo foram adicionados a poços em microplacas de 96 poços (“Fundo chato”, Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil) [16,17]. Foram utilizados padrões contendo 40 a 200 µg Ca/mL para a determinação da curva de calibração e os resultados foram expressos em µg/cm². As concentrações de PO₄³⁻ foram mensurados pelo método colorimétrico do molibdato de amônia com comprimento de onda de 660 nm [18]. Para isto, em 100 µL das amostras e nos padrões de P (1,5; 3; 6; 12 e 24 µg P/mL) foram acrescidos com 50 µL de molibdato de amônia e 20 µL de reativo redutor foram adicionados a poços em microplacas de 96 poços (“Fundo chato”, Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil) [16, 17]. As leituras foram realizadas utilizando um espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer EON, Biotek, USA) e os resultados foram expressos em µg/cm². Para análise de F⁻ foi utilizado eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720A+, Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA). Os eletrodos foram previamente calibrados com padrões contendo 0,125 a 4,00 µg F/mL, nas mesmas condições das amostras. As leituras

foram realizadas com alíquotas de 500 µL dos meios de imersão acrescidas com o mesmo volume de TISAB II [16]. Os resultados foram expressos em µg/cm².

2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

2.4.1 Cepas de microrganismos e condições de crescimento

Para este estudo foram utilizadas as seguintes cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC): *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Actinomyces israeli* (ATCC 12102), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Para *C. albicans*, as colônias previamente cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (SDA; Difco, Le Pont de Claix, França) foram suspensas em 10 mL de caldo Sabouraud dextrose (Difco) e incubadas em condições aeróbicas durante a noite a 120 rpm e 37 °C. Simultaneamente, para bactérias *S. mutans*, *L. casei*, *A. israeli* e *E. faecalis*, colônias previamente cultivadas em ágar infusão cérebro-coração (BHI Agar; Difco) foram suspensas em 10 mL de caldo BHI (Difco) e incubadas por 24 horas em 5% de CO₂ a 37° C. Após a incubação, as células bacterianas e fúngicas foram recuperadas por centrifugação (8000 rpm, 5 min), e seus sedimentos lavados duas vezes com 10 mL de solução salina a 0,85% (NaCl). O número de células de *C. albicans* foi ajustado para 1×10^7 células mL⁻¹ utilizando uma câmara de contagem de Neubauer, enquanto para bactérias, o ajuste foi realizado por meio de espectrofotometria (640 nm), visando uma concentração de 1×10^8 células mL⁻¹ [19].

2.4.2 Determinação de halo de inibição dos materiais

O método de difusão em ágar foi realizado, com modificações [20], de acordo com as normas do *National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS 13 document M2-A8, 2003a.). Cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) foram reativadas em ágar SDA (Sabouraud Dextrose, Difco, Le Pont de Claix, França) e BHI por 48 horas a 37 °C em aerobiose. Enquanto as bactérias *S. mutans* (ATCC25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Actinomyces israeli* (ATCC 12102) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram reativadas em BHI por 48 horas a 37 °C em microaerofilia. Em seguida, as colônias de cada cepa foram inseridas no caldo BHI individualmente e incubadas por 18–24 horas a 37 °C. Uma alíquota de 300 µL de cada suspensão fúngica e bacteriana (densidade óptica de 0,6 e absorção de 550 nm) foi inserida e homogeneizada com 15 mL de ágar BHI a 45 °C. Após a geleificação do meio

de cultura, discos de 5 mm de diâmetro das membranas, previamente esterilizados por radiação ultravioleta, foram colocados na superfície do meio de ágar. Para cada placa foi utilizado como controle positivo, solução de digluconato de clorexidina (CLX) a 0,2%. As placas foram mantidas por 2 h em temperatura ambiente para permitir a difusão dos materiais e em seguida incubadas a 37 °C por 24 horas. Duas medidas de cada halo de inibição foram mensuradas (mm) com o auxílio de paquímetro digital, as quais foram utilizadas para o cálculo da média [21]. Para avaliação do teste antimicrobiano foi usado ANOVA a um critério, seguida do teste de Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$).

2.5. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT

2.5.1 *Cultura de células e ensaio de viabilidade*

Células de linhagem de odontoblastos (MDPC-23) derivados de células de primeiros molares inferiores de camundongos foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, GIBCO Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA), estreptomicina (50g/mL) e 1% de antibiótico / antimicótico cocktail (300 U/mL, estreptomicina 300 µg/mL, anfotericina B 5µg/mL) (GIBCO Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) sob condições de cultura de células padrão (37 °C, 100% de umidade, 95% de ar e 5 % CO₂). As células foram subcultivadas a cada 2 dias até atingir 80% de confluência [22]. Os odontoblastos foram semeados nas placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e incubadas durante 24 horas em atmosfera de ar umidificada de 5% de CO₂ a 37 °C. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) por 24, 48 e 72 horas de exposição das células com os materiais. Os valores da percentagem de redução do MTT baseiam-se no número de células viáveis, ou seja, correlacionam-se com a magnitude da redução do corante sendo expressa como uma percentagem da viabilidade celular [23]. Os corpos de prova foram inseridos nas placas de 96 poços (descritos anteriormente no item 2.2.) e incubadas por 24, 48 e 72 horas em contato com as células. Após esses períodos, o meio de cultura foi removido, as células serão lavadas com PBS diluído 10x e em seguida foram adicionados em cada poço 10 µL da solução de MTT em 90 µL de DMEM sem SBF (1:10) e incubada por 4 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e acrescentado 200 µL de álcool isopropílico que permanecia em agitação por 30 min. Após esse período, 100 µL de cada poço foi colocado em uma nova placa e a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico através de espectrofotometria (Eon Microplate Spectrophotometer; Bio

Tek, Winooski, EUA) com uma absorbância 550 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata [21].

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) ($p < 0,05$). Para a avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais e avaliação da viabilidade celular foi usado ANOVA a dois critérios, seguida do teste de Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$). Para avaliação do teste antimicrobiano foi usado ANOVA a um critério, seguida do teste de Student-Newman-Keuls test ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais

O grupo Fuji II LC apresentou a maior liberação de F^- , especialmente em pH ácido. O TheraBase apresentou uma liberação significativamente menor de F^- quando comparado ao grupo Fuji II LC. Por outro lado, o grupo TheraCal PT e TheraCal LC, apresentaram uma liberação quase nula, independente dos meios. A liberação de Ca^{2+} foi predominante nos materiais à base de Ca_2SiO_4 , com destaque para o TheraCal LC, que apresentou maiores valores de liberação, independente do meio avaliado. Não houve liberação de PO_4^{3-} para nenhum dos grupos avaliados, independente do meio ($p < 0,05$). Resultados negativos representam o processo de incorporação de íons nos materiais testados.

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão (DP) da determinação de F^- , Ca^{2+} e PO_4^{3-} após 24 horas de imersão em água, SBF pH 7,0 e SBF pH 4,0

Materiais	µg/cm²								
	Fluoreto				Cálcio		Fósforo		
	água	SBF pH 7.0	SBF pH 4.0		água	SBF pH 7.0	SBF pH 4.0	água	SBF pH 7.0
Fuji II LC	44.2 ^{aA}	15.3 ^{aB}	71.9 ^{aC}	—	-181.3 ^{aA}	145.2 ^{aB}	-0.2 ^{aA}	-0.3 ^{aA}	-3.5 ^{aB}
	(4.1)	(1.4)	(10.5)		(8.9)	(42.9)	(0.2)	(0.5)	(5.2)
TheraBase	2.0 ^{bA}	2.2 ^{bA}	6.6 ^{bB}	—	-180.3 ^{aA}	110.7 ^{aB}	-0.3 ^{aA}	0.0 ^{aA}	0.9 ^{bA}
	(0.7)	(0.5)	(1.9)		(4.5)	(32.3)	(0.1)	(0.5)	(3.9)
TheraCal LC	0.10 ^{bA}	0.13 ^{bA}	0.14 ^{cA}	407.0 ^{aA}	135.5 ^{bB}	1095.6 ^{bC}	-0.6 ^{aA}	-0.5 ^{aA}	-9.3 ^{cB}

	(0.03)	(0.02)	(0.05)	(43.4)	(24.9)	(27.2)	(0.2)	(0.7)	(5.2)
TheraCal PT	0.47 ^{ba}	0.10 ^{ba}	0.10 ^{ca}	208.6 ^{ba}	-99.0 ^{cb}	421.3 ^{cc}	-0.6 ^{aa}	-0.3 ^{aa}	-2.3 ^{aa}
	(0.08)	(0.06)	(0.03)	(51.1)	(10.9)	(77.1)	(0.2)	(0.3)	(6.2)

(–) não detectável.

SBF: fluído corporal simulado – ISO/FDIS 23317

Ca de SBF = 0,0026 mol/L (Tabela 1 da ISO/FDIS 23317:2007 E = 0,0025 ml/L).

Pi de SBF = 0,0008 mol/L (Tabela 1 da ISO/FDIS 23317:2007 E = 0,001 mol/L).

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os materiais para cada meio de estocagem.

Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os meios para cada material (two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls test, $p < 0.05$), $n = 8$.

3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os materiais a base de Ca_2SiO_4 demonstraram formação de halo de inibição para *A. israeli*, *C. albicans* e *L. casei*. Dentre os materiais a base de Ca_2SiO_4 , o TheraCal LC, obteve maior valores de diâmetro de halo de inibição para a *C. albicans*, superando a CLX. Não houve formação de halo de inibição dos materiais a base de Ca_2SiO_4 para os microrganismos *E. faecalis* e *S. mutans* (figura 1).

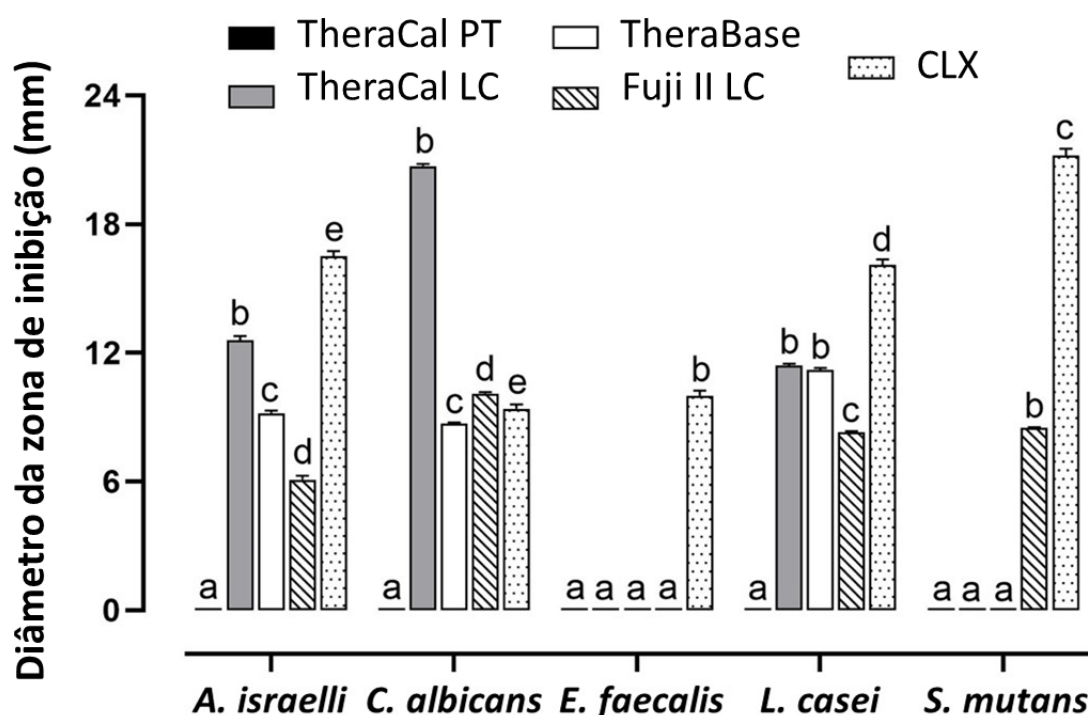


Figura 1. Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição para os diferentes microrganismos de acordo com os materiais testados. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$). Teste de halo de inibição em ágar, $n = 9$ (one-way ANOVA, Student-Newman-Keuls test, $p < 0.05$).

3.3. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT

No tempo de 24 horas, o TheraCal PT apresentou a maior porcentagem de células viáveis ($p<0,001$). Para o tempo de 48 horas, não houve diferença estatística entre os materiais a base de Ca_2SiO_4 ($p<0,05$). No tempo de 72 horas, TheraCal LC e TheraBase apresentaram maiores valores de viabilidade celular quando comparado aos demais materiais, sem diferença estatística entre eles ($p<0,05$). O Fuji II LC, apresentou maior citotoxicidade quando comparados aos outros grupos avaliados, principalmente no tempo de 48 horas.

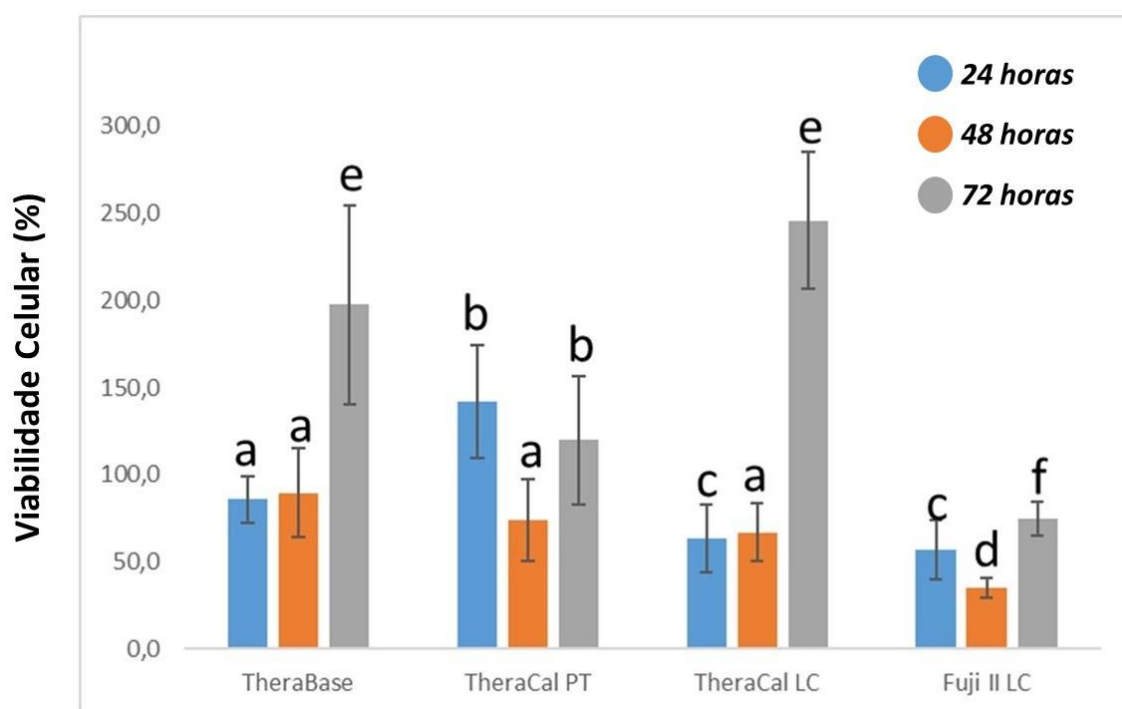


Figura 2. Colunas em azul, laranja e cinza indicam os períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, de exposição de MDPC-23 em contato com os materiais (two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls test ($p<0,05$)), $n=9$. Médias e desvio-padrão (barras) para os diferentes grupos e tempos avaliados. Letras distintas denotam diferença estatística entre os grupos e tempos ($p<0,05$).

4. DISCUSSÃO

Com o objetivo de superar as limitações e aprimorar as propriedades mecânicas e biológicas de materiais à base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, foram desenvolvidos materiais de forramento à base de Ca_2SiO_4 . Esses materiais, além de promoverem a liberação de íons Ca^{2+} e OH^- , facilitam a remineralização da dentina e a formação de tecidos mineralizados, contribuindo para a melhoria do desempenho clínico em procedimentos de capeamento pulpar [5]. A hipótese nula deste estudo foi parcialmente rejeitada, uma vez que o

TheraCal LC demonstrou alta liberação de Ca^{2+} , enquanto o TheraBase apresentou liberação tanto de Ca^{2+} quanto de F^- . Ambos os materiais exibiram atividade antimicrobiana eficaz contra *A. israelii*, *C. albicans* e *L. casei*, além de viabilidade celular satisfatória, superando os demais materiais testados. Esses resultados sugerem que o TheraCal LC e o TheraBase podem ser considerados opções promissoras para aplicação clínica.

Para avaliação da liberação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- dos materiais após 24 horas, independentemente do meio de imersão (água ou SBF), o Fuji II LC demonstrou maiores valores de liberação de F quando comparado aos materiais a base de Ca_2SiO_4 . Hosida et al. [24] demonstrou em seu estudo que o Fuji II LC possui uma capacidade de liberação de íon F^- , principalmente nas primeiras 24 horas devido à rápida dissolução superficial de íons F^- incorporados à matriz do material. Logo após a fotopolimerização, ocorre a dissolução desses íons na sua superfície, o que não acontece com os materiais TheraCal PT e TheraCal LC por não possuírem F^- em sua composição e, devido a isso, não houve liberação desses íons para esses materiais. Além disso, esse comportamento também se repete para a liberação de PO_4^{3-} , devido à ausência desse íon nos materiais avaliados.

Por outro lado, para avaliação da liberação de Ca^{2+} , os materiais a base de Ca_2SiO_4 se mostraram com maiores valores de liberação desse íon quando comparado ao Fuji II LC, exceto para o TheraBase. Dentre os materiais a base de Ca_2SiO_4 , o TheraCal LC obteve maiores valores de liberação, especialmente em condições de pH ácido, em meio SBF. O SBF representou um avanço significativo no desenvolvimento de materiais bioativos, possibilitando a investigação sistemática da formação de apatita em diferentes composições e tipos de materiais. De acordo com Baino & Yamaguchi [25], materiais capazes de induzir a formação de uma camada de apatita em suas superfícies apresentam, em princípio, potencial para se ligar ao tecido ósseo. O SBF possui composição iônica e de pH semelhantes aos do plasma sanguíneo humano [26]. Por se tratar de materiais indicados para capeamento pulpar direto, os quais permanecerão em contato direto com a polpa dentária, torna-se fundamental a utilização do SBF, por reproduzir as condições presentes no meio bucal em contato com a polpa dentária e o sangue.

Neste estudo, o TheraCal LC assim como os demais materiais avaliados, demonstraram expressiva liberação de íons Ca^{2+} em pH ácido. Possivelmente a dissolução desses íons é maior em pH mais baixos, o que favorece a sua aplicabilidade clínica pois, no meio bucal, a redução do pH aumenta significativamente a solubilidade da hidroxiapatita e dos fosfatos de Ca^{2+} , promovendo a dissolução do esmalte devido à

diminuição de fosfato (PO_4^{3-}) e OH^- . [27]. A liberação de íons Ca^{2+} e OH^- promove a redução da permeabilidade dos capilares recém-formados, resultando em um menor extravasamento plasmático e em uma maior captação de Ca^{2+} da circulação sanguínea, o que favorece a resposta mineralizante dos tecidos adjacentes. Além disso, a elevada concentração de Ca^{2+} pode potencializar a atividade da enzima pirofosfatase, dependente desse íon, contribuindo para os processos de defesa e reparo tecidual [4, 28, 29].

A maior disponibilidade de Ca^{2+} ativa canais específicos, permitindo sua entrada passiva no citosol. Enquanto os antiportadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ regulam o transporte de prótons, as bombas de Ca^{2+} usam ATP para manter a homeostase intracelular [30]. Em *C. albicans*, a Ca-ATPase vacuolar armazena o excesso de Ca^{2+} , permitindo o crescimento em ambientes ricos neste íon [31]. No entanto, o acúmulo excessivo de Ca^{2+} pode prejudicar a formação de hifas, reduzindo a virulência do fungo [32], o que possivelmente pode ter acontecido. Dado o papel dos microrganismos na etiologia, progressão da cárie e de lesões pulpares [33], é fundamental que materiais a base de Ca_2SiO_4 apresentem uma ação antimicrobiana eficaz contra os patógenos envolvidos nestes processos. O TheraCal LC promoveu uma maior ação antimicrobiana para as cepas de *C. albicans* e *A. israelii*, sendo que para *C. albicans*, a sua ação foi maior que a CLX, usada como controle positivo devido a sua ampla ação antimicrobiana.

Assim como o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, a atividade antimicrobiana dos materiais a base de Ca_2SiO_4 segue o mesmo princípio. Quando em contato com água ou líquidos contendo água [34], como o fluido de tecidos vivos [35] o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se dissocia em íons Ca^{2+} e OH^- [36] proporcionando um ambiente alcalino. O meio alcalino proporciona um ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano, resultando na atividade antimicrobiana deste material [37]. Neste estudo, os materiais base de Ca_2SiO_4 tiveram uma ação mais efetiva para as bactérias *A. israelii* e o *L. casei*, provavelmente devido ao seu pH alcalino.

O grupo bacteriano considerado mais cariogênico é o dos estreptococos do grupo *mutans*, especialmente *S. mutans* e *S. sobrinus* [38], devido à grande acidogenicidade, aciduricidade e produção de polissacarídeos extracelulares que participam da estrutura do biofilme dental. Ahn et al. [39] descreve em seu estudo que o *S. mutans* sofreu várias mudanças bioquímicas e fenotípicas durante o crescimento aeróbico (incluindo acidogenicidade), mas também concluíram que *S. mutans* é altamente adaptável a diferentes ambientes, o que provavelmente pode ter acontecido neste estudo com os materiais a base de Ca_2SiO_4 . Para o *S. mutans*, apenas o grupo CIV obteve ação antimicrobiana contra esse microrganismo. Essa eficácia é atribuída à liberação de F^- ,

conhecido por atuar predominantemente na dinâmica da cárie dentária ao influenciar os processos de desmineralização e remineralização dos tecidos mineralizados [25]. No entanto, o F^- também possui a capacidade de modificar a fisiologia de microrganismos por inibição direta das enzimas celulares, além de aumentar a permeabilidade das membranas citoplasmáticas [40, 41].

Enterococcus faecalis é considerada uma bactéria predominante, identificada em canais radiculares persistentemente infectados e outras doenças bucais, como cárie dentária, periodontite e peri-implantite [42]. Este microrganismo é uma espécie bacteriana Gram-positiva [43], anaeróbica facultativa [44] e que pode sobreviver sem água e nutrientes por vários meses [45]. Além disso, ela é uma bactéria considerada mais resistente a antimicrobianos comparada com outros microrganismos endodônticos [46]. Neste estudo, nenhum dos materiais avaliados obtiveram ação antimicrobiana contra esse microrganismo, possivelmente pela sua capacidade de adaptação mesmo em ambientes críticos.

Os efeitos antimicrobianos do $Ca(OH)_2$ são atribuídos principalmente ao seu alto pH e à liberação de substâncias difusíveis no meio de crescimento, especialmente no estado recém-misturado [47]. Os materiais avaliados neste estudo possuem matriz resinosa, baixa fluidez e presa rápida, características que podem ter influenciado sua avaliação no teste antimicrobiano. No entanto, já se tem estudos na literatura que o $Ca(OH)_2$ não possui ação antimicrobiana para o *Enterococcus faecalis* [48, 49].

Os dados de viabilidade celular foram avaliados pelo ensaio do MTT. Neste estudo, o TheraCal PT apresentou os maiores valores de viabilidade celular no tempo de 24 horas, quando comparado aos outros grupos avaliados. No entanto, no tempo de 72 horas, TheraCal LC e TheraBase apresentaram os maiores valores de viabilidade celular, sem diferença estatística significativa entre eles, quando comparado aos demais grupos. Na avaliação de liberação de íons, o TheraCal PT se mostrou com valores de liberação de Ca^{2+} maiores em meio aquoso e isso corrobora com os dados de viabilidade celular, pois possivelmente houve uma maior liberação de íons Ca^{2+} no meio, que provavelmente estimulou uma maior adesão e proliferação celular nestas primeiras 24 horas.

Lopez-Cazaux et al. [50] relatam em seu estudo que um ambiente rico em Ca^{2+} estimula tanto a multiplicação quanto a especialização das células de odontoblastos. Possivelmente, o TheraCal LC e o TheraBase possuem uma liberação desses íons de forma mais lenta, expressando-se com resultados mais promissores no tempo de 72 horas. Essa maior quantidade disponível de Ca^{2+} tende a ter um aumento do pH, deixando esse

meio mais básico ou alcalino, o que pode ter estimulado uma maior proliferação dessas células de acordo com o tempo. Esses resultados ressaltam o potencial dos materiais à base de Ca_2SiO_4 para o seu uso em contextos clínicos que requerem alta biocompatibilidade.

Embora os materiais avaliados tenham apresentado resultados promissores, esses achados foram obtidos em protocolos de testes iniciais, conduzidos em condições *in vitro*, o que restringe sua aplicação direta à prática clínica. Portanto, são necessários estudos complementares *in vitro*, utilizando biofilmes mais maduros, bem como investigações *in vivo*, a fim de confirmar esses resultados. Além disso, é essencial avaliar a longevidade dos efeitos remineralizantes, bem como a durabilidade e a eficácia dos materiais em condições bucais reais

5. CONCLUSÃO

Os resultados *in vitro* deste estudo indicaram que o TheraCal LC e o TheraBase são materiais promissores para uso clínico. O TheraCal LC destacou-se pela alta liberação de Ca^{2+} , enquanto o TheraBase liberou tanto Ca^{2+} quanto F^- . Ambos os materiais apresentaram atividade antimicrobiana eficaz contra *A. israelii*, *C. albicans* e *L. casei*, além de viabilidade celular superior aos demais materiais avaliados. Esses achados sugerem que, devido à capacidade de liberar íons essenciais e controlar infecções microbianas, o TheraCal LC e o TheraBase têm grande potencial para aplicação em procedimentos odontológicos, como o capeamento de polpa dentária, favorecendo a regeneração tecidual e a proteção contra patógenos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. K.C. Modena, L.C. Casas-Apayco, Atta MT et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *Journal of Applied Oral Science* 17 (2009) 544–54.
2. K. Langeland. Effect of various procedures on the human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 14 (1961) 210-233.
3. J.C. Wataha, P.E. Lockwood, J.B. Lewis, F.A. Rueggeberg, R.L. Messer. Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater*, 20 (2004) 150-157.
4. P.C. Foreman, I.E. Barnes. Review of calcium hydroxide. *Int Endod J*, 23 (1990) 283-297.
5. European Society of Endodontology (2006) Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *International Endodontic Journal* 39, 921–30.
6. T.C. Dotta, L.P.A. Almeida, M.M. Arnez, R.C.B. Nogueira, A. B. C. E. B. Catirse, Capítulo Materiais Para Proteção Do Complexo Dentino-Pulpar, Manual de Materiais

- Dentários, Universidade De São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Ribeirão Preto (2020) 58 – 79.
7. Z. Mohammadi, P.M.H. Dummer, Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology, *International Endodontic Journal*. 40 (2011) 697–730.
 8. M.G. Gandolfi, F. Siboni e C. Prati, Chemical–physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping, *International Endodontic Journal*, (2012), 45, 571–579.
 9. M.L.T. Lavôr, E.L. da Silva, M.G. Vasconcelos, R.G. Vasconcelos, Uso de Hidróxido de cálcio e MTA na Odontologia: Conceitos, Fundamentos e Aplicação Clínica, *Salusvita*, Bauru. 36 (2017) 99-121.
 10. S. Kang, Mineralization-inducing potentials of calcium silicate-based pulp capping materials in human dental pulp cells, *Yeungnam Univ J Med*. 37 (2020) 217-225.
 11. J.L. Sanz, A. Soler-Doria, S. López-García, D. García-Bernal, F.J. Rodríguez-Lozano, A. Lozano, C. Llena, L. Forner, J. Guerrero-Gironés, M. Melo, Comparative Biological Properties and Mineralization Potential of 3 Endodontic Materials for Vital Pulp Therapy: Theracal PT, Theracal LC, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells, *Journal of Endodontics*. (2021) 0099-2399.
 12. T.L. Gasperi, J.A.C.D. Silveira, T.F. Schmidt, C.D.S. Teixeira, L.D.F.R. Garcia, E.A. Bortoluzzi, Physical-Mechanical Properties of a Resin-Modified Calcium Silicate Material for Pulp Capping, *Braz Dent J*. 31 (2020) 252-256.
 13. K.G. Silva, D. Pedrini, A.C. Delbem, M. Cannon, Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials, *Oper Dent*. 32 (2007) 328-35.
 14. K.G. Silva, D. Pedrini, A.C. Delbem, L. Ferreira, M. Cannon, In situ evaluation of the remineralizing capacity of pit and fissure sealants containing amorphous calcium phosphate and/or fluoride, *Acta Odontol Scand*. 68 (2010) 11-8.
 15. G.L. Vogel, L.C. Chow, W.E. Brown, A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples, *Caries Res*. 17 (1983) 23-31.
 16. J.G. Amaral, J.P. Pessan, J.A.S. Souza, J.C.S. Moraes, A.C.B. Delbem, Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 106 (2018) 2553-64.
 17. L.Q.C. Oliveira, A.C.B. Delbem, L.A. de Moraes, S.C. Gonçalves, J.A.S. Souza, D. Pedrini, In vitro Evaluation of Surface Free Energy of Dentin after Treatment with Sodium Trimetaphosphate Associated or Not with Fluoride, Exposed or Not to Calcium, *Caries Res*. 56 (2022) 81-90.
 18. C.H. Fiske, Y. Subbarow, The colorimetric determination of phosphorus, *Biol Chem*. 66 (1925) 375-400.
 19. V.O.Z. Amarante, A.C.B. Delbem, C. Sampaio, L.A. de Moraes, E.R. de Camargo, D.R. Monteiro, J.P. Pessan, T.Y. Hosida. Activity of Sodium Trimetaphosphate Nanoparticles on Cariogenic-Related Biofilms In Vitro. *Nanomaterials* 30 (2022) 170.
 20. T.Y. Hosida, T.P. Cavazana, M. Henriques, J.P. Pessan, A.C.B. Delbem, D.R. Monteiro. Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: Influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. *Mycoses* 61 (2018) 270–278.
 21. L.A. de Moraes, F.N.d. Souza Neto, T.Y. Hosida, D.M. dos Santos, B.C. de Almeida, E. Oliveira, S.P.C. Filho, D.d.B. Oliveira, E.R. de Camargo, A.C.B. Delbem. Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Antimicrobial Effects and Cytotoxicity of a Novel Nanocomposite Based on Polyamide 6 and Trimetaphosphate Nanoparticles Decorated with Silver Nanoparticles. *Antibiotics* 13 (2024) 340.
 22. K.S. Caiaffa, F.G. Basso, N.A. Santos-Filho, C.A. de Souza-Costa, V.T. Sakai, E.M. Cilli, C. Duque, Effect of analogues of cationic peptides on dentin mineralization markers in odontoblast-like cells, *Arch. Oral Biol*. 103 (2019) 19–25.
 23. B.B.S. Ramin, K.B. Rufato, R.M. Sabino, K.C. Popat, M.J. Kipper, A.F. Martins, E.C. Muniz, Chitosan/iota-carrageenan/curcumin-based materials performed by precipitating

- miscible solutions prepared in ionic liquid, *Journal of Molecular Liquids*. 2019, 290, 111199.
24. T.Y. Hosida, A.C.B. Delbem, L.A. de Moraes, J.C.S. Moraes, C. Duque, J.A.S. Souza, D. Pedrini, Ion release, antimicrobial and physio-mechanical properties of glass ionomer cement containing micro or nanosized hexametaphosphate, and their effect on enamel demineralization, *Clin Oral Investig*. 23 (2018) 2345-2354.
 25. F. Baino, S. Yamaguchi, The Use of Simulated Body Fluid (SBF) for Assessing Materials Bioactivity in the Context of Tissue Engineering: Review and Challenges, *Biomimetics*. 5 (2020) 57.
 26. T. Kokubo, Bioactive glass ceramics: Properties and applications, *Biomaterials*. 12 (1991) 155–163.
 27. M.A.R. Buslaf, J.P. Pessan, H.M. Honório, J.M. Ten Cate, Mechanisms of action of fluoride for caries control, *Monogr Oral Sci*. 22 (2011) 97-114.
 28. V. Chacko, S. Kukirose. Human Pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA) a histologic study. *J Clin Pediatr Dent*. 2006; 30(3):203-10.
 29. D. E. Witherspoon, J. C. Small, G. Z. Harris. Mineral trioxide aggregate pulpotomies – case series outcomes assessment. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137:610-18.
 30. Q. Yu, B. Zhang, B. Yang, J. Chen, H. Wang, C. Jia, X. Ding, N. Xu, Y. Dong, B. Zhang, L. Xing, M. Li, Interaction among the vacuole, the mitochondria, and the oxidative stress response is governed by the transient receptor potential channel in *Candida albicans*, *Free Radic Biol Med*. 77 (2014) 152-67.
 31. M. Lange, E. Peiter, Calcium Transport Proteins in Fungi: The Phylogenetic Diversity of Their Relevance for Growth, Virulence, and Stress Resistance, *Front Microbiol*. 10 (2020) 3100.
 32. S. Sakaguchi, K. Shibuya, H. Iida, Y. Anraku, T. Suzuki, Roles of Ca^{2+} in hyphal and yeast-form growth in *Candida albicans*. Growth regulation by altered extracellular and intracellular free Ca^{2+} concentrations, *Mycoscience*. 38 (1997) 215-225.
 33. G. Conrads, I. About, Pathophysiology of Dental Caries, *Monogr Oral Sci*. 27 (2018) 1-10.
 34. H.W. Roberts, J.M. Toth, D.W. Berzins, D.G. Charlton, Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature, *Dent Mater*. 24 (2008) 149–164.
 35. R. Holland, V. de Souza, M.J. Nery, J.A. Otoboni Filho, P.F. Bernabé, E. Dezan Júnior, Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide, *J Endod*. 3 (1999) 161-6.
 36. M.A. Saghir, J. Orangi, A. Asatourian, J.L. Gutmann, F. Garcia-Godoy, M. Lotfi, N. Sheibani, Calcium silicate-based cements and functional impacts of various constituents, *Dent Mater J*. 36 (2017) 8–18.
 37. C. Estrela, L.L. Bammann, C.R.A. Estrela, R.S. Silva, J.D. Pécora, Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal, *Braz Dent J*. 11 (2000) 3–9.
 38. O. Fejerskov, E. Kidd, *Cárie Dentária, A doença e seu tratamento clínico*, São Paulo: Editora Santos. (2005).
 39. S.J. Ahn, S.J. Ahn, C.M. Browngardt, R.A. Burne, Changes in biochemical and phenotypic properties of *Streptococcus mutans* during growth with aeration, *Appl Environ Microbiol*. 75 (2009) 2517-27.
 40. H. Koo: Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms, *Adv Dent Res*. 20 (2008) 17– 21.
 41. J.M. ten Cate, C. van Loveren, Fluoride mechanisms, *Dent Clin North Am*. 43 (1999) 713– 42, VII.
 42. E.Y. Komiyama, L.S. Lepesqueur, C.G. Yassuda, L.P. Samaranayake, N.B. Parahitiyawa, I. Balducci, C.Y. Koga-Ito, Enterococcus Species in the Oral Cavity:

- Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility, PLoS One. 11 (2016) e0163001.
43. M. Usman, R. Meidyawati and E. Suprastiwi, Antibacterial effects of Bioceramic and mineral trioxide aggregate sealers against *Enterococcus faecalis* clinical isolates, Journal of International Dental and Medical Research. 10 (2017) 981–986.
 44. T. Prathita, N.K.Djauharie, R. Meidyawati, Antimicrobial activity of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide sealer on *Enterococcus faecalis* strain ATCC29212, International Journal of Applied Pharmaceutics. 11 (2019)123–125.
 45. D. Figdor, J.K. Davies, G. Sundqvist, Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum, Oral Microbiology and Immunology. 18 (2003) 234–239.
 46. M. Haapasalo, D. Ørstavik, *In vitro* infection and of dentinal tubules, Journal of Dental Research. 66 (1987) 1375–1379.
 47. M. Parirokh, M. Torabinejad, Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - part I: chemical, physical, and antibacterial Properties, Journal of Endodontics. 36 (2010) 16–27.
 48. H. Sapna, L. Priti Kamlesh, B. Dinesh Rao, A. Shubha, An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials, J Clin Pediatr Dent. 37 (2012) 59-64.
 49. S. Reddy, Y. Ramakrishna, Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: a microbiological study, J Clin Pediatr Dent. 31(2007) 193-198.
 50. S. Lopez-Cazaux, G. Bluteau, D. Magne, B. Lieubeau, J. Guicheux, B. Alliot-Licht, Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note. European Cells & Materials Journal. 11 (2006) 35–42.

FIGURA 1.

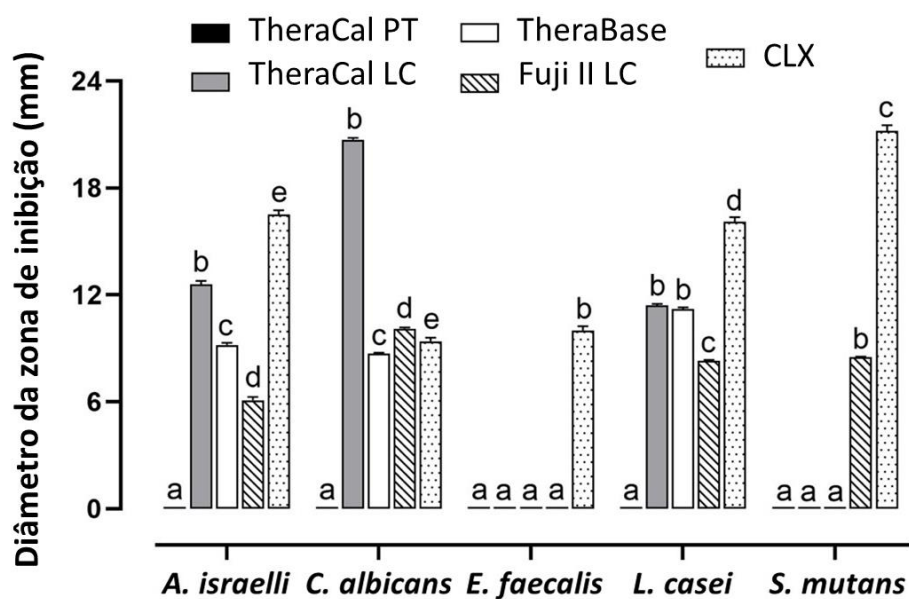
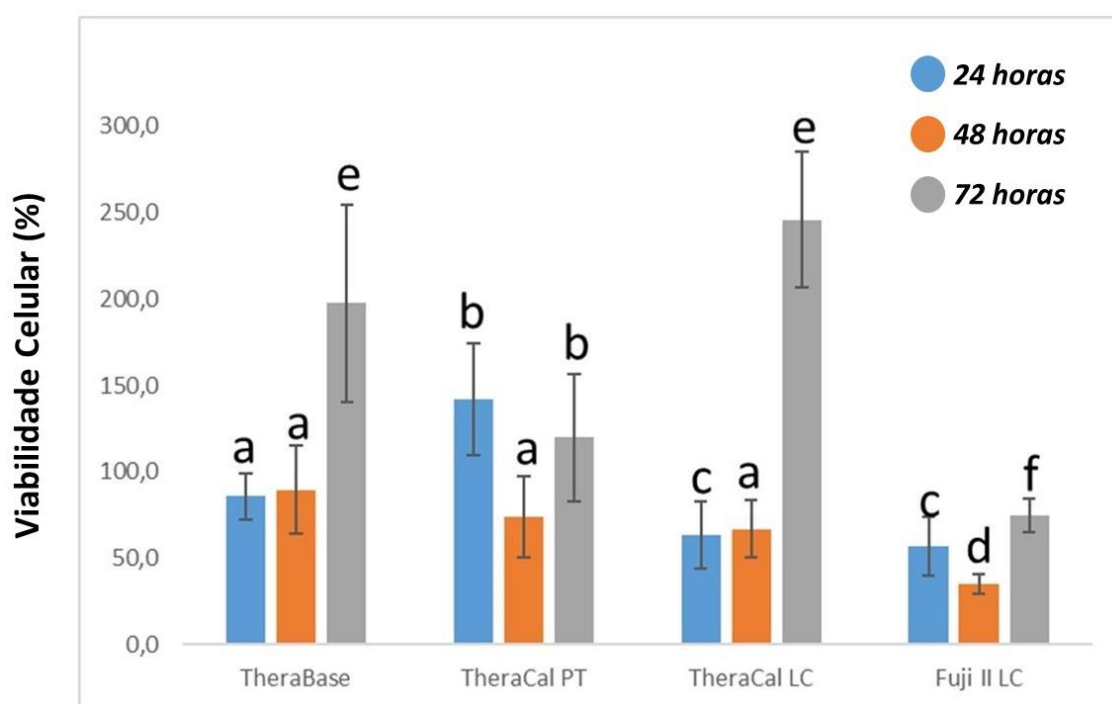


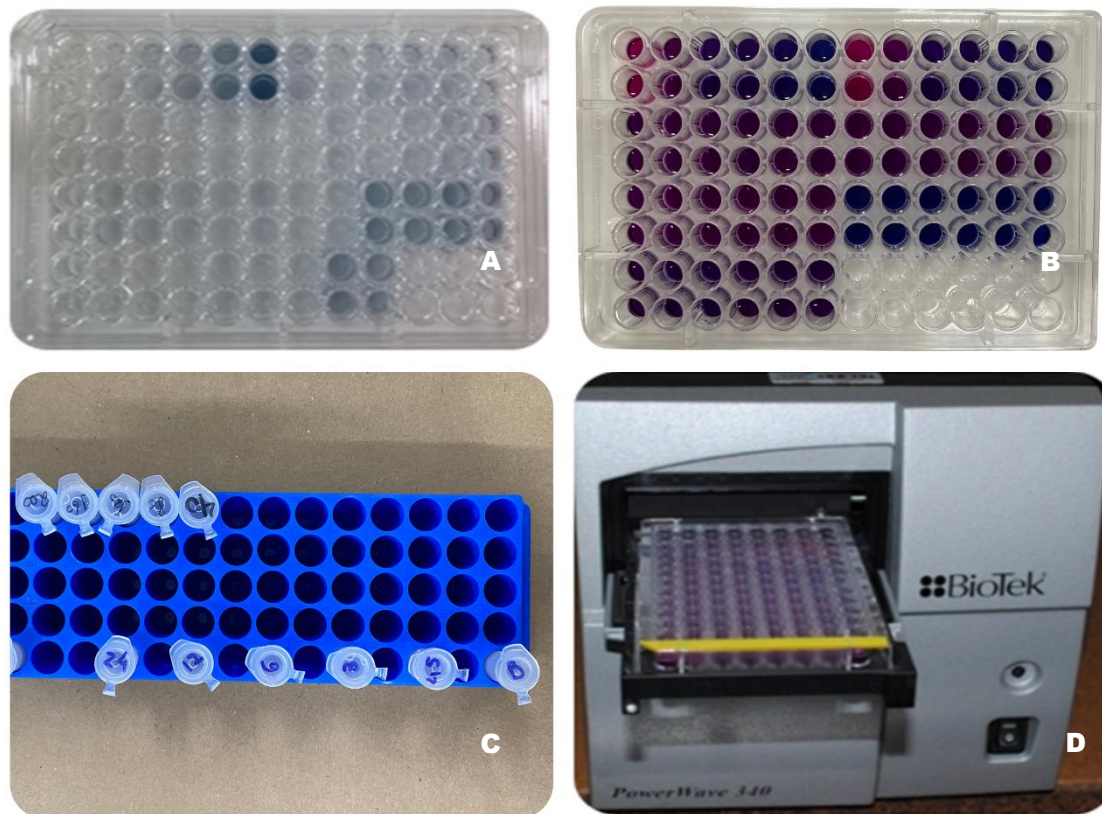
FIGURA 2.



Anexos

Anexo A

Análise da liberação de íons



A) Método colorimétrico: Molibdato de amônia em placas de 96 poços. B) Método colorimétrico: Arsenazo III em placas de 96 poços. C) Padrões utilizados. D) Leitura da placa em espectrofotômetro.

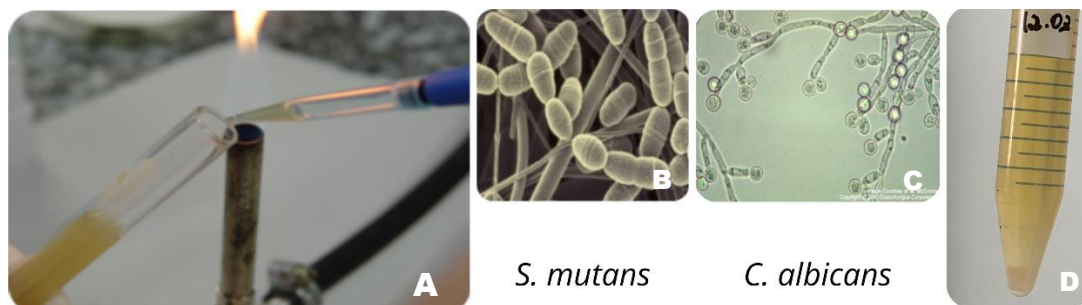
Anexo B
Ilustração esquemática da preparação do inóculo de cepas de *S. mutans* e *C. albicans*



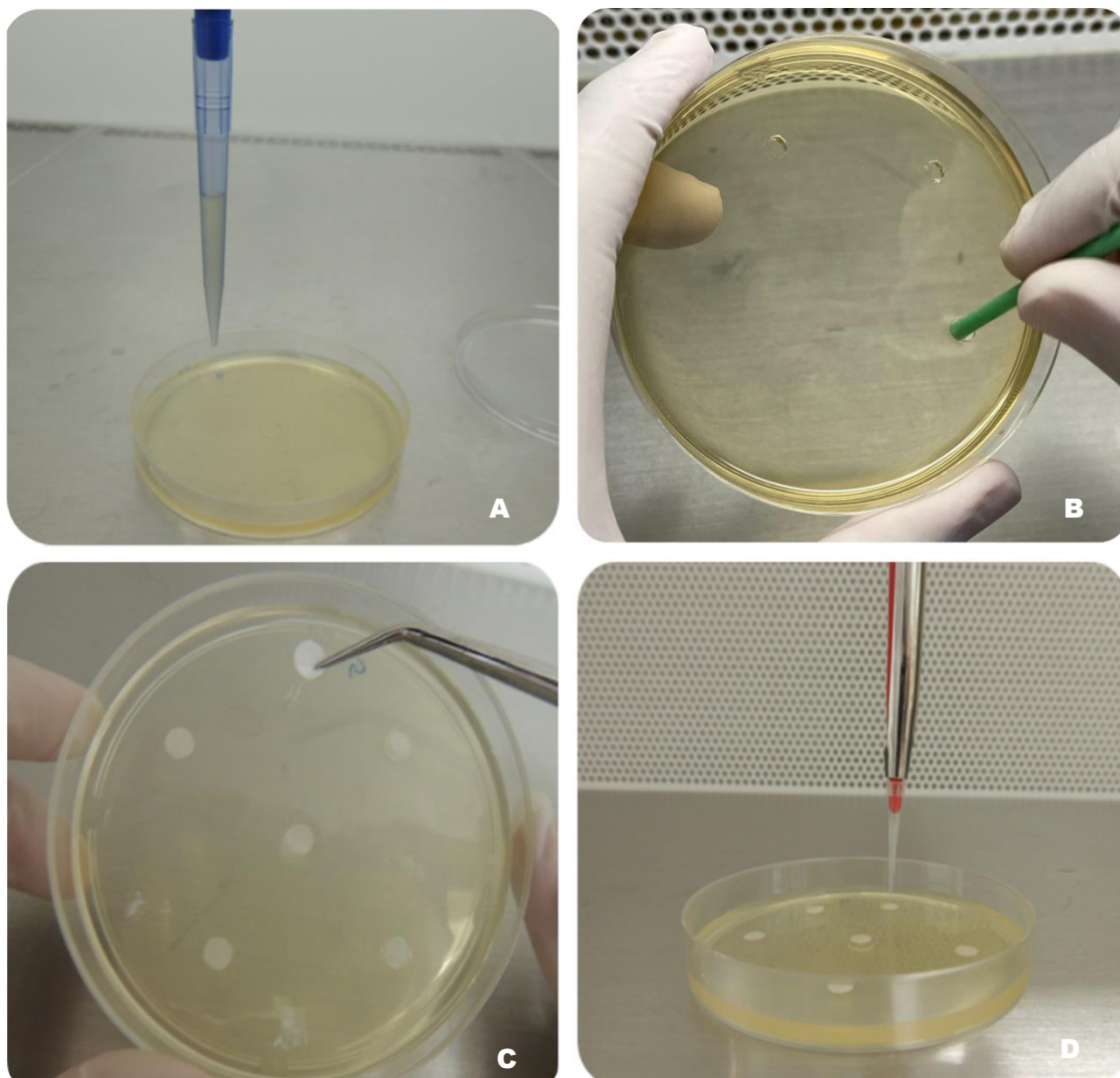
A) Preparação do pré-inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231; B) Inóculo foi centrifugado a 8000 rpm durante 5 min; C) Obtenção do pellet de células e descarte do sobrenadante; D) Homogeneizadas em vórtex; E) Centrifugadas novamente; F) Alíquotas de 200 µl foram adicionadas aos poços de placas de 96 poços e levadas para leitura em espectrofotômetro a 640 nm a fim de ajustar o número de células de *S. mutans* para 10^8 células/mL em BHI caldo. G) O número de células de *C. albicans* foi ajustado para 10^7 células / mL em BHI caldo usando uma câmara de Neubauer.

Anexo C

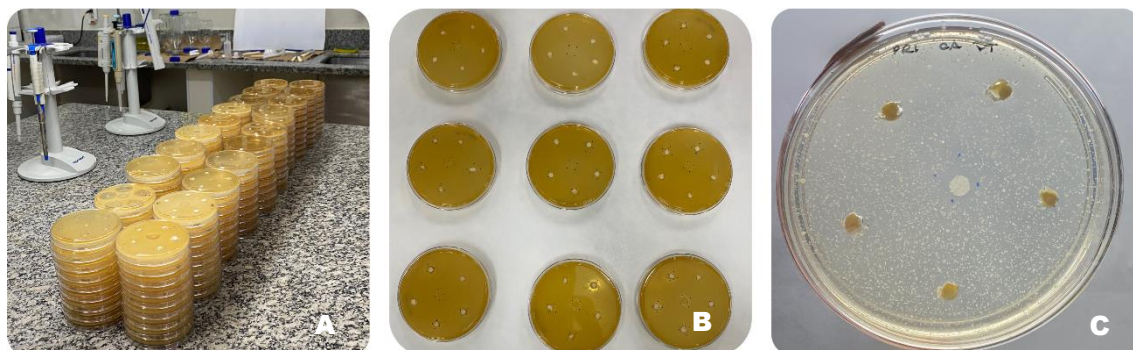
Determinação dos halos de inibição



A) Preparo do inóculo dos microorganismos. B) Cepas de *Streptococcus mutans*. C) Cepas de *Candida albicans*. D) Pré-inóculos em meio de cultura caldo.



A) 300 µl de cada suspensão bacteriana. B) Perfuração do ágar. C) Inserção dos materiais avaliados no ágar. D) pipetagem da clorexidina 0,2% como controle positivo.



Após pipetagem, as placas de Petri são levadas para estufa de CO₂ por 24 horas. Após 24 horas é feita a medição dos halos de inibição com o auxílio de um paquímetro digital.

Anexo D

Análise da viabilidade celular



A) Odontoblastos MDPC-23 vista por microscópio eletrônico. B) Células MDPC-23 congeladas. C) Pellets MDPC-23. D) MDPC-23 subcultivadas em garrafas a cada 2 dias até atingir 80% de confluência. E) MDPC-23 ajustadas a 1×10^4 células por poço. F) MDPC-23 semeadas em placas de 96 poços. G) Leitura realizada em placas de 96 poços utilizando espectrofotômetro.