

PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA E CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS REPARADORES BIOCERÂMICOS.

Data de submissão: 17/03/2024

Data de aceite: 02/05/2024

Carlos Roberto Emerenciano Bueno

Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo
<https://orcid.org/0000-0002-1897-2823>

Leopoldo Cosme-Silva

Universidade Federal de Alagoas,
Faculdade de Odontologia.
Maceió – Alagoas
<https://orcid.org/0000-0002-5755-1933>

Ana Cláudia Rodrigues da Silva

Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo
<https://orcid.org/0000-0002-7570-6126>

Índia Olinta de Azevedo Queiroz

Universidade Federal de Santa Catarina,
Faculdade de Odontologia.
Florianópolis – Santa Catarina.
<https://orcid.org/0000-0001-8214-0880>

Rogério de Castilho Jacinto

Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo
<https://orcid.org/0000-0002-2362-8920>

Sandra Helena Penha de Oliveira

Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo
<https://orcid.org/0000-0003-0805-1120>

Eloi Dezan Junior

Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo
<https://orcid.org/0000-0002-5699-6578>

RESUMO: O agregado de trióxido mineral Flow foi desenvolvido visando melhorias nas propriedades físicas. O objetivo deste estudo foi avaliar citotoxicidade e atividade antimicrobiana do MTA Flow em comparação ao MTA Angelus e ProRoot MTA. Para análise microbiológica, cinco placas contendo ágar BHI receberam 0,1 mL da suspensão bacteriana (1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹) espalhadas em sua superfície. Posteriormente, 4 poços foram confeccionados em pontos equidistantes, um para cada material e um controle positivo com clorexidina 2%. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 h sob condições aeróbicas. Os resultados foram avaliados por zonas de inibição em torno dos poços.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados registados de acordo com o diâmetro médio da zona de inibição. Para citotoxicidade, células indiferenciadas da polpa (OD-21) foram cultivadas e avaliadas usando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), expostas à diluição de extratos seriados em 6, 24, 48h. A citotoxicidade foi analisada por ANOVA two-way e correção de Bonferroni. Na análise microbiológica não houve diferença estatística ($P > .05$) dos cimentos com o controle positivo. Na citotoxicidade, a exposição celular a todos os extratos dos cimentos (não diluído e 1/2) aumentou o metabolismo celular no período 6h ($P < .05$) e diminuiu significativamente em 24h e 48h quando comparado ao grupo Controle ($P < .05$). Comparação entre os extratos dos cimentos na mesma diluição mostrou que, independentemente da diluição (não diluído, 1/2 e 1/4), o extrato MTA Flow promoveu um aumento no metabolismo celular em comparação com o extrato MTA Angelus e ProRoot MTA ($P < .05$). A diluição ProRoot MTA 1/2 estimulou o crescimento celular quando comparada à diluição MTA Angelus 1/2 às 6h ($P < .05$). Os resultados demonstram que os cimentos biocerâmicos reparadores testados apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* em estado planctônico e biocompatibilidade celular, sedimentando sua aplicação clínica na endodontia.

PALAVRAS-CHAVE: Biocompatibilidade, Citotoxicidade, Endodontia.

ANTIBACTERIAL PROPERTY AND CYTOTOXICITY OF BIOCERAMIC REPAIR CEMENTS

ABSTRACT: The mineral trioxide aggregate Flow was developed to improve physical properties. The objective of this study was to evaluate cytotoxicity and antimicrobial activity of MTA Flow in comparison to MTA Angelus and ProRoot MTA. For microbiological analysis, five plates containing BHI agar received 0.1 mL of the bacterial suspension (1.5×10^8 CFU mL⁻¹) spread on their surface. Subsequently, 4 wells were created at equidistant points, one for each material and a positive control with 2% chlorhexidine. All plates were incubated at 37°C for 48 h under aerobic conditions. The results were evaluated according to inhibition zones around the wells. All assays were performed in triplicate and results recorded according to the average diameter of the zone of inhibition. For cytotoxicity, undifferentiated pulp cells (OD-21) were cultured and evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, exposed to dilution of serial extracts in 6, 24, 48h. Cytotoxicity was analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni correction. In the microbiological analysis there was no statistical difference ($P > .05$) between the cements and the positive control. In cytotoxicity, cellular exposure to all cement extracts (undiluted and 1/2) increased cellular metabolism in the 6h period ($P < .05$) and significantly decreased in 24h and 48h when compared to the Control group ($P < .05$). Comparison between cement extracts at the same dilution showed that, regardless of the dilution (undiluted, 1/2 and 1/4), the MTA Flow extract promoted an increase in cellular metabolism compared to the MTA Angelus and ProRoot MTA extracts ($P < .05$). The ProRoot MTA 1/2 dilution stimulated cell growth when compared to the MTA Angelus 1/2 dilution at 6h ($P < .05$). The results demonstrate that the bioceramic repair cements tested showed antimicrobial activity against *E. faecalis* in planktonic state and cellular biocompatibility, confirming their clinical application in endodontics.

KEYWORDS: Biocompatibility, cytotoxicity, Endodontics.

INTRODUÇÃO

O campo da endodontia está em constante evolução graças a avanços nas tecnologias e nos materiais, contribuindo significativamente para o sucesso do tratamento endodôntico.

Perfurações na parede dos canais radiculares e assoalho da câmara pulpar resultam em uma via de comunicação entre o interior do dente e o periodonto, levando ao insucesso do tratamento por ser uma via de contaminação (Ng et al. 2011). Considerada na sua maioria como iatrogenia, esse acidente operatório pode ocorrer durante a abertura coronária, preparo biomecânico ou também como resultado de um processo patológico (cáries dentárias avançadas ou reabsorções radiculares). Fatores podem predispor a ocorrência de perfurações acidentais, por dificultar o acesso aos canais radiculares, sendo estes: presença de nódulos pulpares, calcificação, dente mal posicionado no arco, identificação incorreta do canal radicular (Estrela et al. 2017).

Inicialmente, o MTA foi introduzido em 1993 como cimento para reparar perfurações radiculares (Lee et al. 1993) e como um material de obturação da extremidade da raiz devido às suas propriedades hidráulicas (Torabinejad et al. 1993). O nome MTA refere-se aos três óxidos na constituição do cimento Portland: óxido de cálcio (CaO), dióxido de silício / sílica (SiO₂) e óxido de alumínio / alumina (Al₂O₃), além da adição do pó radiopaco conhecido como óxido de bismuto (Torabinejad et al. 1993, Ha et al. 2017).

Após inúmeras pesquisas provando as excelentes propriedades biológicas, a US Food and Drug Administration (US FDA) liberou o MTA para uso clínico em 1998 (Schwartz et al. 1999), levando a Dentsply (OK, EUA) a lançar oficialmente o MTA no mercado sob o nome de ProRoot MTA® em 1999, enquanto a Angelus (Londrina, BR) introduziu o Angelus MTA® em 2001 (Tawil et al. 2015). Ambos os materiais são comercializados em kit pó e líquido, utilizando a água destilada como veículo (Estrela et al. 2000).

Materiais para uso odontológico devem demonstrar resultados positivos para biocompatibilidade, uma vez que estarão em contato com tecidos vivos e desencadearão uma resposta do hospedeiro. Os testes com cultura celular visam avaliar o comportamento de células isoladas de variações sistêmicas, observando se o material possui potencial para alterar ou não a proliferação celular, após o extrato ser colocado em contato com o material biológico cultivado (Bueno et al. 2023).

As falhas endodônticas podem ser explicadas por diversos fatores, mas principalmente pela persistência da infecção. *Enterococcus faecalis* são cocos anaeróbios gram-positivos normalmente encontrados na cavidade oral humana e podem se adaptar a ambientes com baixos níveis de oxigênio (Tabassum & Khan, 2016). Estudos mostraram que *E. faecalis* é a bactéria mais comumente encontrada em casos de falha do tratamento endodôntico, com alta prevalência de 90% (Singh, 2016). Mesmo com a redução da carga bacteriana a níveis compatíveis com a cicatrização periapical, essas bactérias

remanescentes podem ocorrer devido à irrigação ineficaz, preparo mecânico inadequado com áreas de canal radicular intocadas ou limitações anatômicas (Ricucci & Siqueira, 2010). Portanto, cimentos endodônticos com atividade antimicrobiana podem auxiliar na diminuição de microrganismos residuais ou na prevenção do seu crescimento.

Uma das metodologias utilizadas para avaliar a capacidade antimicrobiana de um material é o teste de difusão em ágar, que avalia a atividade do material testado em contato direto contra bactérias planctônicas, reconhecido como um teste básico e usado por vários anos (Leonardo et al. 2000; Sipert et al. 2005; Arias-Moliz & Camilleri 2016; Poggio et al. 2017; Bueno et al. 2023).

Mesmo com todo o excelente desempenho esperado, os cimentos biocerâmicos reparadores tipo MTA apresentam a desvantagem de difícil manuseio (Silveira et al. 2008, Bogen et al. 2009, Parirokh & Torabinejad 2010). Para minimizar essa desvantagem, a adição de um superplastificante de policarboxilato ao cimento Portland gerou um aumento na fluidez, facilitando a espatulação e inserção no interior dos canais radiculares, mas ainda mantendo a biocompatibilidade (Wongkornchaowalit & Lertchirakarn 2011, Cintra et al. 2017, Bueno et al. 2019).

Um dos MTAs disponíveis no mercado com manuseio aprimorado devido à substituição da água por um hidrogel é o MTA Flow® (Ultradent, Utah, EUA). Segundo o fabricante, o gel proporciona maior plasticidade, permitindo uma característica cremosa e homogênea após a mistura e melhorando o manuseio e sua inserção. Conseqüentemente facilita seu uso em diversos procedimentos: consistência espessa para capeamento pulpar, perfuração da câmara pulpar e pulpotomia; consistência fina para reabsorção, apicificação e tampão apical (Ultradent, 2017).

A fim de complementar lacunas e dados na literatura, esta pesquisa visou avaliar a citotoxicidade em cultura de célula e propriedade antimicrobiana contra bactérias planctônicas *E. faecalis* do cimento biocerâmico reparador MTA Flow em comparação com MTA Angelus e ProRoot MTA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio de viabilidade celular

MTA Flow (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, EUA), MTA Angelus (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) e ProRoot MTA (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foram misturados de acordo com os fabricantes. Os discos de cimento (diâmetro: 5 mm; altura: 3 mm) foram realizados sob condições assépticas e a metodologia de confecção dos extratos dos cimentos foram realizados seguindo pesquisas anteriores (Cintra et al. 2017, Bueno et al. 2023).

Células Saos-2 de osteossarcoma humano (HTB-85, American Type Culture Collection, Manassas, Va, EUA) foram cultivadas com DMEM suplementado com 10% de

FBS, penicilina e estreptomicina sob condições padrão de cultura celular (37°C, 100% de umidade, 95% de ar, e 5% de CO₂) e semeadas em placa de 96 poços a (104 células/poço) e incubadas por 24 horas para fixar as células antes da adição dos extratos de cimentos. Em seguida, as culturas foram expostas à diluição seriada dos extratos (não diluídos, 1/2 e 1/4). Células Saos-2 cultivadas sem extrato foram utilizadas como controle. Após 6, 24 e 48 horas, a viabilidade celular foi examinada usando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Cintra et al. 2017, Bueno et al. 2023). Cada condição foi analisada em triplicata.

Ensaio de atividade antibacteriana: teste de difusão em poço de ágar

Os ensaios microbiológicos foram realizados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299). Os microrganismos foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 37°C por 18 h (Bueno et al. 2023).

Uma suspensão bacteriana foi obtida com solução salina 0,85% para igualar a turbidez equivalente ao tubo padrão McFarland 0,5, correspondendo a 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹. Seis réplicas de placas contendo ágar BHI (Difco Lab., Detroit, MI, EUA) foram espalhadas com 0,1 mL da suspensão bacteriana com auxílio de alça de Drigalsky. Em seguida, foram confeccionados quatro poços de 6 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade (um para cada material), retirando-se o ágar em pontos equidistantes e imediatamente preenchidos com três cimentos (MTA Flow, Angelus MTA, ProRoot MTA) para serem avaliados e clorexidina como controle positivo (Poggio et al. 2017, Bueno et al. 2023). Duas placas não receberam a suspensão bacteriana: uma não recebeu os cimentos visando controlar a esterilização do meio de cultura; a outra placa recebeu os selantes e teve como objetivo controlar sua contaminação. Todas as placas foram mantidas em temperatura ambiente (22°C ±1) por 2 horas para pré-difusão dos materiais e depois incubadas a 37°C por 48 horas em condições aeróbias.

Após o período experimental, cada um dos poços teve sua zona de inibição medida pelo mesmo operador em dois locais perpendiculares com paquímetro digital (Mitutoyo, Absolute Digimatic, Japão). O tamanho da zona de inibição foi calculado da seguinte forma (Poggio et al. 2017, Bueno et al. 2023): tamanho da zona de inibição = (diâmetro do halo – diâmetro da amostra) x 1/2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram registrados com diâmetro médio da zona de inibição.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA bidirecional seguida pela correção de Bonferroni para citotoxicidade e Kruskal-wallis One Way ANOVA no teste microbiológico, utilizando o programa Graph Pad Prism (versão 5.0). O valor de p foi considerado significativo a 5%.

RESULTADOS

Análise de Citotoxicidade

A viabilidade do crescimento de Saos-2 na presença dos diferentes extratos selantes avaliados pelo ensaio MTT às 6, 24 e 48h é mostrada na **Figura 1**. Observou-se que a exposição celular a todos os extratos selantes (não diluído e 1/2) aumentou o metabolismo celular às 6h ($P < .05$) e diminuiu significativamente nas 24h e 48h quando comparado ao grupo Controle ($P < .05$). Porém, para 1/4 diluição, foi identificado aumento às 6h para todos os extratos selantes e redução às 48h para MTA Flow e MTA Angelus quando comparado ao grupo Controle ($P < .05$).

O ensaio MTT revelou que a viabilidade do Saos-2 era dependente da diluição, uma vez que foi encontrado um aumento no metabolismo celular na presença de diluições mais baixas (1/2 e 1/4) para todos os extratos selantes ($p < 0,05$). Curiosamente, a comparação entre os extratos selantes na mesma diluição mostrou que, independentemente da diluição (não diluído, 1/2 e 1/4), o extrato de MTA Flow promoveu um aumento no metabolismo celular em comparação com o extrato de MTA Angelus e ProRoot MTA ($P < .05$), exceto para ProRoot MTA 1/4 diluição que estimulou aumento do metabolismo celular às 48hs quando comparado com MTA Flow 1/4 diluição ($P < .05$). Além disso, a diluição ProRoot MTA 1/2 estimulou o crescimento celular quando comparada à diluição MTA Angelus 1/2 às 6h ($P < .05$); além disso, em relação a 1/4 de diluição, foi identificada diminuição às 6h e aumento às 48h no crescimento celular ($P < .05$).

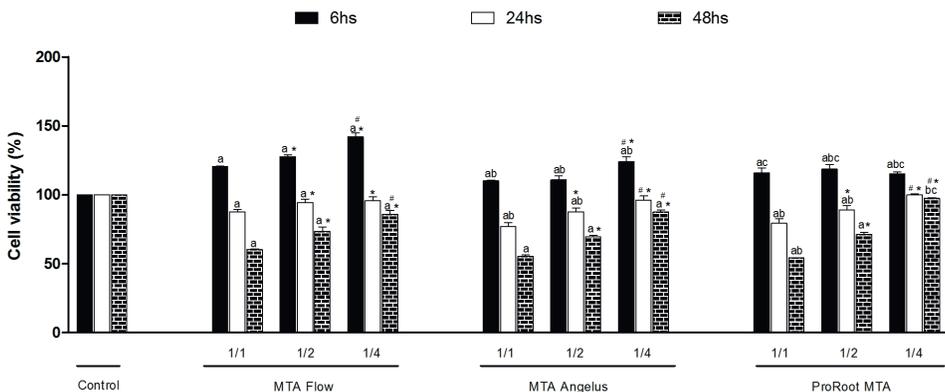


Figura 1: Viabilidade de Saos-2 após estimulação com extratos diluídos em série de MTA Angelus, MTA Flow e ProRoot MTA em 6, 24 e 48h determinada pelo ensaio MTT. As letras indicam diferença estatística observada comparando diferentes materiais na mesma diluição: a: $p < 0,05$ vs. Controle; b: $p < 0,05$ vs. MTA Flow; c: $p < 0,05$ vs. MTA Angelus. Os símbolos indicam diferença estatística observada comparando diferentes diluições de extrato do mesmo material: *: $p < 0,05$ vs. extrato não diluído; #: $p < 0,05$ vs. diluição 1/2.

Análise microbiológica por difusão em Ágar

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise microbiológica. Todos os grupos de cimentos tiveram diâmetros ligeiramente maiores que o grupo controle positivo (clorexidina 2%). MTA Angelus e ProRoot MTA apresentaram maior diâmetro da zona de inibição, observado às 24h e 48h. Porém, todos os grupos experimentais apresentaram diâmetro da zona de inibição significativamente semelhante ao do grupo clorexidina (controle positivo), sem diferença significativa entre eles ($P > .05$).

Grupos	24 horas*	48 horas*
Clorexidina 2%	16.9 ± 0.68 ^a	17.1 ± 0.72 ^a
MTA Flow	15.8 ± 0.02 ^a	17.3 ± 0.09 ^a
MTA Angelus	21.2 ± 1.34 ^a	21.6 ± 1.86 ^a
ProRoot MTA	21.5 ± 0.08 ^a	22.4 ± 0,17 ^a
Valor de P	$P=1,000$	$P=1,000$

*As mesmas letras sobrescritas (a) indicam que não há diferença significativa entre os grupos em qualquer período de análise ($P < .05$)

Tabela 1. Diâmetro médio da zona de inibição (mm) nos grupos às 24 e 48 horas.

DISCUSSÃO

Este estudo investigou o comportamento biológico de cimentos biocerâmicos reparadores endodônticos por meio de toxicidade celular e propriedade antimicrobiana. Com base nos resultados, os cimentos apresentaram resposta biológica positiva e poder antimicrobiano semelhante ao grupo controle positivo.

Atualmente, diversas metodologias são utilizadas para avaliar propriedades de cimentos endodônticos. Ambas as metodologias *in vitro* utilizadas no presente estudo foram baseadas em relatórios anteriores que avaliaram a citotoxicidade (Cintra *et al.* 2017, Cosme-Silva *et al.* 2020, Bueno *et al.* 2023) e o potencial antimicrobiano contra bactérias planctônicas como o *E. faecalis* (Poggio *et al.* 2017, Bueno *et al.* 2023).

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT, anteriormente utilizado para avaliar a biocompatibilidade de cimentos endodônticos, em conformidade com a norma ISO 10993–5:2009 “Avaliação biológica de dispositivos médicos. Parte 5. Teste de citotoxicidade *in vitro*”, que especifica a incubação de células cultivadas em contato direto com extratos.

A metodologia utilizada para avaliar a propriedade antimicrobiana foi o teste de difusão em ágar (*agar diffusion test* - ADT), que avalia a atividade contra bactérias planctônicas (isto é, isolados de células únicas flutuando em meio específico), reconhecido como um teste básico e utilizado há vários anos (Poggio *et al.* 2017, Barbosa *et al.* 2020, Arias-Molz & Camileri 2016, Bueno *et al.* 2023. Al Shwaimi *et al.* (2016) conduziram uma revisão sistemática sobre a eficácia antimicrobiana *in vitro* de cimentos endodônticos

e observaram que, até então, a maioria dos estudos sobre o efeito antimicrobiano dos cimentos endodônticos foram realizados em bactérias planctônicas.

A clorexidina (CHX) foi utilizada como controle positivo devido à sua atividade antimicrobiana (Gomes et al. 2013, Yao et al. 2021). Em nosso estudo, embora tenha diferenças nos tamanhos dos halos de inibição, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Porém, é fundamental salientar que esta metodologia apresenta diversas limitações, como a dependência da difusão dos materiais testados. Além disso, a diferenciação entre zonas de difusão e inibição pode dificultar a análise. Isso pode ser superado com o uso do trifeniltetrazólio, que indica microrganismos viáveis (aparecem na cor vermelha), facilitando a precisão da medição (Tanomaru et al. 2007). Além disso, as bactérias planctônicas podem não simular uma situação clínica, uma vez que, no ambiente bucal, as bactérias são organizadas em forma de biofilme, o que proporciona proteção durante a maturação e estabelecimento do biofilme em um ambiente hostil (Faria0Junior et al. 2013). Ainda assim, é importante obter dados iniciais sobre a atividade antimicrobiana dos cimentos, mas não devem ser tiradas conclusões precipitadas.

Por último, também é importante destacar as limitações da presente pesquisa, uma vez que modelos *in vitro* são considerados estudos preliminares. Além disso, pesquisas antimicrobianas adicionais com modelos de biofilme mais complexos são necessárias para complementar esses resultados.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, todos os cimentos apresentaram biocompatibilidade *in vitro* e todos os cimentos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias planctônicas.

REFERÊNCIAS

AlShwaimi E, Bogari D, Ajaj R, Al-Shahrani S, Almas K, Majeed A. In Vitro Antimicrobial Effectiveness of Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis*: A Systematic Review. **J Endod**, 42:1588– 1597, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.001>

Arias-Moliz MT, Camilleri J. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. **J Dent**, 52:30–36, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.06.008>

Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **J Endod** 2009;35(6):777-790.

Bueno CRE, Benetti F, Cury MTS, *et al.* Biological investigation of resinous endodontic sealers containing calcium hydroxide. **PLoS One**. Jul 17;18(7):e0287890. 2023a.doi: 10.1371/journal.pone.0287890.

Bueno CRE, Vasques AMV, Cury MTS, Sivieri-Araújo G, Jacinto RC, Gomes-Filho JE, Cintra LTA, Dezan-Júnior E. Biocompatibility and biom mineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. **Clin Oral Investig.** 2019 Jan;23(1):169-177.

Cintra LTA, Benetti F, Queiroz IOA, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, Oliveira SHPO, Gomes-Filho JE (2017) Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based end-odontic sealer containing calcium hydroxide. **J Endod** 43:2088–2092

Cosme-Silva L, Santos AFD, Lopes CS, Dal-Fabbro R, Benetti F, Gomes-Filho JE, et al. Cytotoxicity, inflammation, biom mineralization, and immunoexpression of IL-1 β and TNF- α promoted by a new bio-ceramic cement. **J Appl Oral Sci**, 28:e20200033, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0033>

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

Estrela C, Pécora JD, Estrela CRA, Guedes OA, Silva BS, Soares CJ et al. Common operative procedural errors and clinical factors associated with root canal treatment. **Braz Dent J.** 2017 Jan-Apr;28(2):179-90.

Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. **Int Endod J**, 46:755–762, 2013. <https://doi.org/10.1111/iej.12055>

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. **Braz Dent J**, 24:89–102, 2013. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302188>

Ha WN, Nicholson T, Kahler B, Walsh LJ. Mineral Trioxide Aggregate - A Review of Properties and Testing Methodologies. **Materials.** 2017;10(11):1261.

Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **J Endod** 1993;19(11):541–544.

Leonardo MR, da Silva LA, Tonomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. **J Endod**, 26:391–394, 2000. <https://doi.org/10.1097/00004770-200007000-00003>

Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. **Int Endod J** 2011; 44: 583-609.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. **J Endod** 2010;36(3):400-413.

Poggio C, Trovati F Ceci M Colombo M, & Pietrocola G. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. **J Clin Exp Dent.** 2017; 9:e743–e748. <https://doi.org/10.4317/jced.53753>

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. **J Endod**, 36:1–15, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.038>

Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker III WA. Mineral trioxide aggregate: A new material for endodontics. **J Am Dent Assoc** 1999;130(3):967-975.

Silveira CM, Sanchez-Ayala A, Lagravere MO, Pilatti GL, Gomes OM. Repair of furcal perforation with mineral trioxide aggregate: long-term follow-up of 2 cases. **J Can Dent Assoc** 2008;74(8):729–733.

Singh H. Microbiology of endodontic infections. **J Dent Oral Hyg**, 2:1–4, 2016.

Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. **Int Endod J**. 38:539–543, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00984.x>

Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. **Eur J Dent**. 10:144–7, 2016 <https://doi.org/10.4103/1305-7456.175682>

Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. **J Oral Sci**, 49(1):41–45, 2007. <https://doi.org/10.2334/josnusd.49.41>

Tawil PZ, Duggan DJ, Galicia JC. Mineral Trioxide Aggregate (MTA): Its History, Composition, and Clinical Applications. **Compend Contin Educ Dent** 2015;36(4):247-254.

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;19(12):591–595.

Ultradent Products, Inc. Products and Procedures Manual (2017) **Repair Material: MTA Flow** p. 54–57

Wongkornchaowalit N, Lertchirakarn V. Setting time and flowability of accelerated Portland cement mixed with polycarboxylate superplasticizer. **J Endod** 2011;37(3):387–389.

Yao Y, Song K, Chen H, Ding X, Shi Q et al. In vitro and in vivo research of atmosphere pressure non-equilibrium plasmas on root canal disinfection: implication for alternative strategy for irrigation. **Clin Oral Investig**, 5833–5842, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03888-7>