

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

# TAMIRES MELO FRANCATI

# Avaliação *in vivo* da migração local de íons bismuto e silício presentes em cimentos reparadores em contato com tecido conjuntivo e ósseo

Piracicaba 2022

# TAMIRES MELO FRANCATI

# Avaliação *in vivo* da migração local de íons bismuto e silício presentes em cimentos reparadores em contato com tecido conjuntivo e ósseo

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica, na Área de Endodontia.

Orientadora: Marina Angélica Marciano da Silva

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA TAMIRES MELO FRANCATI E ORIENTADA PELO PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARINA ANGÉLICA MARCIANO DA SILVA.

Piracicaba 2022

# Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Marilene Girello - CRB 8/6159

F844a
Francati, Tamires Melo, 1993-Avaliação *in vivo* da migração local de íons bismuto e silício presentes em cimentos reparadores em contato com tecido conjuntivo e ósseo / Tamires Melo Francati. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.
Orientador: Marina Angélica Marciano da Silva. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
1. Biomateriais. 2. Bismuto. 3. Materiais dentários. 4. Silício. I. Marciano,

1. Biomateriais. 2. Bismuto. 3. Materiais dentários. 4. Silício. I. Marciano, Marina Angélica, 1987-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

# Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: In vivo evaluation of the local migration of bismuth and silicon ions present in repair cements in contact with connective tissue and bone

Palavras-chave em inglês: Biomaterials Bismuth Dental materials Silicon Área de concentração: Endodontia Titulação: Mestra em Clínica Odontológica Banca examinadora: Marina Angélica Marciano da Silva [Orientador] Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes Clarissa Teles Rodrigues Data de defesa: 04-08-2022 Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-2567-4859
 Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpg.br/2550601063625823



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 04 de agosto de 2022, considerou a candidata TAMIRES MELO FRANCATI aprovada.

# PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARINA ANGÉLICA MARCIANO DA SILVA

# PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

# PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CLARISSA TELES RODRIGUES

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

# DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico este trabalho a *Deus*, pois sem ele nada seria possível.

Agradeço à minha família o apoio nos momentos difíceis da minha trajetória, em especial a minha vó *Maria Eunice Bernardes Melo*. Este trabalho também é dedicado a eles.

Dedico este projeto a minha mãe *Katia Maria Bernardes Melo Francati* (*in memoriam*) exemplo de uma mulher altruísta e nobre.

À professora *Marina Angélica Marciano da Silva* pela sua atenção dedicada ao longo de todo o projeto.

## AGRADECIMENTOS

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo, nº do processo 2019/04141-4, para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Reitor, *Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles*; à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio da diretoria, *Prof. Dr. Francisco Haiter Neto*, e diretor associado *Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar*; à coordenadoria de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de sua coordenadora, Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Marina Angélica Marciano da Silva**, por ser um exemplo de pessoa paciente, dedicada e competente. Obrigado pelo carinho e atenção de sempre. Você é uma inspiração para mim.

Aos professores da área de endodontia da FOP-Unicamp, que fizeram parte do meu crescimento durante o mestrado: **Profa. Dra. Adriana De Jesus Soares**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia** (*in memoriam*), Pro**fa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Prof. Dr. Caio Cézar Randi Ferraz** e **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**.

Ao professor do Instituto de Química da Unicamp **Ivo Milton Raimundo Júnior** e aos professores do CENA na USP **Hudson Wallace Pereira de Carvalho** e **Francisco José Krug**.

Ao pós-graduando *Lauter Eston Pelepenko Teixeira* que muito ajudou na realização deste trabalho.

Aos meus colegas de turma de mestrado e aos demais colegas da pósgraduação que contribuíram para a minha formação durante o mestrado: *Ana Cristina Janini, Vito Chiarelli Neto, Emelly De Aveiro, Rafaela Casadei Chapola, Eloá*  Cristina Bicego Pereira, Jaqueline Mafra Lazzari, Ezequiel Gabrielli, Maria Eunice da Silva Davidian, Juliana Delatorre Bronzato, Patrícia Almeida da Silva de Macedo, Yanna de Omena Soares, Marina Carvalho Prado, Rodrigo Arruda Vasconcelos, Jéssica Jeuken Teixeira, Natalia Siqueira Lobo, Lidiane Mendes Louzada, Ricardo Honda, Augusto Rodrigues Lima, Diogo Henrique da Silva, Flávia Medeiros Saavedra de Paula e Priscila Amanda Francisco, Érica Mendes Lopes, Andréa Cardoso Pereira, Antonio Airton Leoncio de Moura Filho, Arthur Pimentel Barroso, Ederaldo Pietrafesa de Godoi Junior, Esdras Gabriel Alves e Silva, Fernanda Moura Antonialli, Paulo Henrique Gabriel, Rodolfo Figueiredo de Almeida, Tamares Andrade da Silva, Thiago Bessa Marconato Antunes e Walbert de Andrade Vieira.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba que são de fundamental importância para o funcionamento da instituição, em especial aos funcionários do laboratório de endodontia: *Ana Cristina Do Amaral Godoy, Maicon Ricardo Zieberg Passini, André Fernando dos Santos* e *Maria Helídia Neves Pereira*, ao técnico *Adriano Luis Martins* que auxiliou no uso dos equipamentos para análise de MEV/EDS e a técnica *Maria Aparecida Santiago Varella* no auxílio da obtenção das lâminas histológicas.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

#### RESUMO

O agregado trióxido mineral (MTA) é um cimento utilizado na endodontia em procedimentos reparadores, composto por silicato tricálcio, silicato dicálcio, aluminato tricálcio e o radiopacificador óxido de bismuto. O objetivo deste estudo é avaliar a migração e o acúmulo local de íons bismuto (Bi) após contato com tecido conjuntivo e ósseo. O estudo avaliou também a hipótese de que o mecanismo de migração do bismuto está associado ao silício (Si). Um total de 64 ratos Wistar foram divididos em grupos experimentais de acordo com o tecido de implantação: conjuntivo e ósseo, e com os cimentos implantados: silicato tricálcio (TCS) (n=20), ProRoot MTA (MTA) (n=20), hidroxiapatita com 20% de óxido de bismuto (HAp-Bi) (n=20), e controle negativo, sem implantação (n=4). Os animais foram sacrificados após 30 (n=32) e 180 dias (n=32). As metodologias utilizadas para avaliação da migração do Bi e Si, em ambos os tecidos, foram espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF), espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), caracterização química por meio de espectroscopia Raman e análise histológica da resposta tecidual. A análise estatística dos resultados da avaliação multielementar em ICP-MS e da avaliação histológica, foi realizada considerando o nível de significância de 5% (p < 0,05). A análise XRF demonstrou a migração do Bi do MTA e HAp-Bi em direção ao tecido conjuntivo e ósseo, sugerindo que esta migração ocorre independente do Si, pois o grupo HAp-Bi não apresenta este elemento. Na análise em ICP-MS, para o grupo MTA e Hap-Bi foi possível detectar o bismuto nos tecidos conjuntivo e ósseo em ambos os períodos. Para o tecido conjuntivo, não houve diferença estatística entre os grupos MTA e Hap-Bi, para o bismuto (p > 0,05). O elemento silício foi detectado em todos os grupos, com maior fração de massa no tecido conjuntivo após 30 dias para os grupos TCS e MTA, porém sem diferença estatística entre eles (p > 0,05). A análise Raman mostrou pequenos sinais de alterações para todos os materiais implantados aos 180 dias, independentemente do local de implantação. Histologicamente, foi observada uma elevada inflamação aos 30 dias para todos os grupos experimentais, em ambos os tecidos. Porém aos 180 dias no tecido ósseo, esta inflamação reduziu significativamente (p < 0,05). O contato do cimento ProRoot MTA com os tecidos conjuntivo e ósseo resulta na migração do

bismuto. Entretanto, o mecanismo de migração deste elemento sugere que pode ocorrer de forma independente do silício.

Palavras-chave: Biomateriais; bismuto; materiais dentários; silício.

### ABSTRACT

Mineral trioxide aggregate (MTA) is a cement used in endodontics in reparative procedures, composed of tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminate and the radiopacifier bismuth oxide. The aim of this study is to evaluate the migration and local accumulation of bismuth (Bi) ions after contact with connective tissue and bone. The study also evaluated the hypothesis that the bismuth migration mechanism is associated with silicon (Si). A total of 64 Wistar rats were divided into experimental groups according to the implantation site: connective and bone, and with the implanted cements: tricalcium silicate (TCS) (n=20), ProRoot MTA (MTA) (n=20), hydroxyapatite with 20% bismuth oxide (HAp-Bi) (n=20), and negative control, without implantation (n=4). The animals were sacrificed after 30 (n=32) and 180 days (n=32). The methodologies used to evaluate the migration of Bi and Si in both tissues were X-ray fluorescence spectrometry (XRF), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), chemical characterization by means of Raman spectroscopy and histological analysis of tissue response. Statistical analysis of the results of the multielement evaluation in ICP-MS and of the histological evaluation was performed considering a significance level of 5% (p < 0.05). XRF analysis demonstrated the migration of Bi from MTA and HAp-Bi towards connective tissue and bone, suggesting that this migration occurs independently of Si, as the HAp-Bi group does not present this element. In the ICP-MS analysis, for the MTA and Hap-Bi group, it was possible to detect bismuth in the connective and bone tissues in both periods. For connective tissue, there was no statistical difference between the MTA and Hap-Bi groups for bismuth (p > 0.05). The silicon element was detected in all groups, with a higher mass fraction in the connective tissue after 30 days for the TCS and MTA groups, but with no statistical difference between them (p > 0.05). Raman analysis showed small signs of change for all implanted materials at 180 days, regardless of implantation site. Histologically, elevated inflammation was observed at 30 days for all experimental groups, in both tissues. However, at 180 days in bone tissue, this inflammation significantly reduced (p < 0.05). Contact of ProRoot MTA cement with connective and bone tissue results in bismuth migration. However, the migration mechanism of this element suggests that it can occur independently of silicon.

Keywords: Biomaterials; bismuth; dental materials; silicon.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Delineamento experimental com a divisão dos grupos experimentais
Figura 2	-	Procedimentos cirúrgicos. (A) Associação anestésica utilizada. (B) Anestesia realizada via intramuscular. (C) Tricotomia da região dorsal. (D) Tricotomia da região tibial. (E) Antissepsia para cirurgia em dorso. (F) Antissepsia para cirurgia em tíbia
Figura 3	-	Procedimento cirúrgico no dorso. (A) incisão no dorso. (B) Divulsão do tecido. (C) Inserção do cimento recém espatulado. (D) Sutura das bordas da ferida
Figura 4	-	Procedimento cirúrgico ósseo. (A) Incisão na região da tíbia. (B) Afastamento dos tecidos. (C) Confecção de duas lojas cirúrgicas no osso. (D) Inserção dos cimentos recém espatulados. (E) Sutura das bordas da ferida
Figura 5	-	Análise em espectrometria de fluorescência de raios-X das amostras de tecido conjuntivo aos 30 e aos 180 dias. A linha azul nas imagens representa a interface entre o material (ponto 1) e o tecido (ponto 2) e a detecção do elemento bismuto é expressa no gráfico de forma correspondente a linha. As letras C, F, M e P demonstram os mesmos gráficos em escala logarítmica, na qual o a linha azul representa o bismuto (Bi L $\alpha$ ) e a linha laranja indica o <i>threshold</i> ou o limite de detecção
Figura 6	-	Análise em espectrometria de fluorescência de raios-X das amostras de tecido conjuntivo aos 30 e aos 180 dias. A linha azul nas imagens representa a interface entre o material (ponto 1) e o tecido (ponto 2) e a detecção do elemento bismuto é expressa no gráfico de forma correspondente a linha. As letras C, F e O demonstram os mesmos gráficos em escala logarítmica, na qual o a linha azul representa o bismuto (Bi L $\alpha$ ) e a linha laranja indica o <i>threshold</i> ou o limite de detecção

- Figura 8 Espectros Raman analisados na superfície dos cimentos implantados em tecido conjuntivo, nos períodos de 30 e 180, e sem implantação, denominados como controle.......44
- Figura 9 Espectros Raman analisados na superfície dos cimentos implantados em tecido ósseo, nos períodos de 30 e 180, e sem implantação, denominados como controle......44
- Figura 10 Fotomicrografias de amostras representativas de tecido conjuntivo adjacente aos cimentos implantados, tanto aos 30 quanto aos 180 dias. (Coloração em hematoxilina e eosina – HE, e magnificação de 20X). Em C, a seta verde indica um eosinófilo e a seta azul um macrófago. Em E, a seta vermelha demonstra o cimento encapsulado. Em F, a seta amarela indica um vaso sanguíneo. ......46

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Score da resposta inflamatória dos grupos analisados em tecido
		conjuntivo45
Tabela 2	-	Score da resposta inflamatória dos grupos analisados em tecido
		ósseo47

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.15
2	REVISÃO DE LITERATURA	.18
2.1	Composição dos cimentos à base de silicato de cálcio	.18
2.2	O agente radiopacificador óxido de bismuto	.20
2.3	Migração de elementos dos cimentos à base de silicato de cálcio	.22
2.4	Efeitos deletérios do bismuto	.24
3	OBJETIVOS	.25
3.1	Objetivo geral	.25
3.2	Objetivos específicos	.25
4	MATERIAL E MÉTODOS	.26
4.1	Delineamento experimental	.26
4.2	Procedimentos cirúrgicos	.27
4.3	Análise da migração e acúmulo local de elementos	.31
4.3.1	Espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF)	.31
4.3.2	Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	.32
4.4	Caracterização química	.33
4.5	Avaliação da resposta tecidual	.34
4.6	Análise estatística	.35
5	RESULTADOS	.36
5.1	Análise da migração e acúmulo local de elementos	.36
5.1.1	Espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF)	.36
5.1.2	Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	.38
5.2	Caracterização química	.39
5.3	Avaliação da resposta tecidual	.41
6	DISCUSSÃO	.44
7	CONCLUSÃO	.48
	REFERÊNCIAS	.49
	ANEXO	.58
	ANEXO 1 - Certificado de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais	5
	da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP	.58
	ANEXO 2 – Relatório de similaridade	.60

# 1 INTRODUÇÃO

A Endodontia tem realizado procedimentos reparadores de grande importância para a manutenção de dentes antes considerados comprometidos (Banchs et al., 2004). Especialmente em pacientes jovens, esse tipo de tratamento permite a manutenção de dentes em condições funcionais de contato oclusal normal e com sua inserção óssea saudável (Roig et al., 2011). Os materiais à base de silicato de cálcio são biomateriais amplamente utilizados para procedimentos reparadores em Endodontia (Torabinejad et al., 1999). Foram desenvolvidos com o objetivo de selar perfurações radiculares patológicas ou iatrogênicas (Torabinejad et al., 1993; Lee et al., 1993) e podem ser utilizados também em capeamentos pulpares (Farsi et al., 2006; Linu et al., 2017), apicificações (Simon et al., 2007), retrobturações em cirurgias apicais (Baek et al., 2005) e como barreira cervical em procedimentos regenerativos (Diogenes et al., 2013). O agregado trióxido mineral (MTA) é um cimento à base de silicato de cálcio que tem sido utilizado com estas finalidades apresentando resultados favoráveis desde o seu desenvolvimento na década de 90 (Torabinejad et al., 1995a; Cehreli et al., 2011).

Os materiais à base de silicato de cálcio foram desenvolvidos para serem utilizados em diferentes locais em contato direto com os tecidos conjuntivo e ósseo (Pace et al., 2008; Schembri-Wismayer et al., 2016). Estes materiais interagem com o ambiente no qual são inseridos liberando hidróxido de cálcio e precipitando apatita em sua superfície (Reyes-Carmona et al., 2009; Schembri-Wismayer et al., 2016). Em contato com tecidos orgânicos, esta reação induz a mineralização e o reparo (Cintra et al., 2017). Dentre os materiais à base de silicato de cálcio, o ProRoot MTA (MTA) (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos) é o material com maior tempo de mercado (Torabinejad et al., 1995a) e é amplamente utilizado em diversos países. O ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos) possui em sua formulação aproximadamente 80% de silicato tricálcio, silicato dicálcio e aluminato tricálcio e, o agente radiopacificador óxido de bismuto (Camilleri, 2008a).

O silício é um dos elementos mais abundantes no corpo humano (Jugdaohsingh et al., 2002; Reffitt et al., 1999), presente no cabelo, unha e epiderme

(Smith, 1993; Austin, 1997; Fregert, 1958). Este íon também está envolvido na mineralização óssea, síntese de colágeno e formação do tecido conjuntivo (Eisinger et al., 1993; Lassus, 1993; Schwarz, 1997, 1972; Candy et al., 1985; Gonzalez-Munoz et al., 2008; Carlisle, 1972, 1976,1980a, 1980b). Além de ser um dos principais elementos dos cimentos à base de silicato de cálcio. O óxido de bismuto, adicionado ao MTA como componente radiopacificador apresenta a vantagem de baixos volumes serem suficientes para uma adequada radiopacidade, devido ao seu alto peso molecular. Os radiopacificadores presentes nos cimentos, não devem reagir com a matriz do silicato de cálcio e, dessa forma, baixos volumes destes compostos são benéficos para reduzir possíveis prejuízos às propriedades físicas dos materiais em que se encontram presentes (Camilleri, 2008b; Húngaro-Duarte et al., 2009a; Camilleri et al., 2011; Tanomaru-Filho et al., 2012). Por outro lado, o óxido de bismuto possui como desvantagem a reatividade com compostos orgânicos da dentina e substâncias irrigadoras como o hipoclorito de sódio, ocasionando a alteração de cor e o escurecimento das estruturas dentais (Marciano et al., 2014, Camilleri, 2014).

A utilização do MTA em contato direto com os tecidos, associada a elevada reatividade do óxido de bismuto, levantou a hipótese de que a interação do MTA com os tecidos circundantes não se limitava apenas à liberação do cálcio. Em 2015, Marciano et al., observaram por meio de mapeamento de elementos em microscopia eletrônica de varredura, a presença de bismuto e silício nos túbulos dentinários. Em 2016, Schembri-Wismayer et al., verificaram também por meio de microscopia eletrônica de varredura, que após o implante de ProRoot MTA no tecido subcutâneo de ratos, foi possível detectar o bismuto e o silício nos tecidos adjacentes. A segurança do bismuto, em altas concentrações, tem sido questionada devido ao seu potencial dano às células humanas (Thomas et al., 2011), pois este íon demonstrou ter efeitos citotóxicos nas células pulpares humanas e nas células hepáticas, renais, intestinais e pulmonares (Min et al., 2007; Abudayyak et al., 2017).

Os prováveis efeitos da liberação de bismuto dos materiais à base de silicato de cálcio foram demonstrados na literatura. Em 2013, Khalil et al., observaram a inflamação dos tecidos renais e hepáticos de ratos após a implantação subcutânea do ProRoot MTA e do BioAggregate. Resultados semelhantes foram descritos por Garcia et al., em 2017. Em ambos os estudos, os autores sugeriram que o radiopacificador óxido de bismuto, quando liberado dos materiais à base de silicato de cálcio, poderia

migrar localmente e sistemicamente, sendo o responsável pela referida resposta inflamatória sistêmica.

O mecanismo de migração do bismuto não está esclarecido na literatura. É possível que a liberação e migração do bismuto esteja associada ao silício, presente na matriz dos materiais à base de silicato de cálcio, uma vez que ambos os elementos foram detectados na dentina e em tecidos ao redor da implantação do MTA (Marciano et al., 2015; Schembri-Wismayer et al., 2016). Outro importante fator a ser considerado sobre o mecanismo de liberação do bismuto está relacionado ao local de aplicação. Não se tem conhecimento da liberação e acúmulo de elementos quando estes materiais são aplicados em contato com tecido conjuntivo e ósseo, bem como após curto e longo prazo de contato. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a liberação local de íons bismuto associado a materiais à base de silicato de cálcio ou não, avaliando como hipótese nula que este elemento é liberado apenas quando associado ao silício.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 Composição dos cimentos à base de silicato de cálcio

O ProRoot MTA (Tulsa Dental Products, Tulsa, Oklahoma, EUA) foi o primeiro cimento à base de silicato de cálcio a ser disponibilizado comercialmente, tendo sido desenvolvido pelo Prof. Mahmoud Torabinejad na década de 90 na Universidade de Loma Linda (EUA) (Torabinejad et al., 1995b; Camilleri et al., 2010a). Um dos primeiros estudos a demonstrar o uso do MTA foi publicado em 1993. Neste estudo, Lee, Monsef e Torabinejad demonstraram por meio de metodologia *in vitro*, que o MTA promovia menor infiltração marginal no selamento de perfurações em comparação com o amálgama e o IRM (Lee et al., 1993). Também em 1993, Torabinejad et al. avaliaram o uso do MTA como material obturador para uso em retrocavidades em cirurgias apicais e os resultados mostraram uma menor infiltração em comparação com o amálgama e o Super-EBA (Torabinejad et al., 1993). Em 1995, Torabinejad et al. encontraram resultados semelhantes com o MTA apresentando resultados superiores na adaptação marginal em retrocavidades em comparação com o amálgama, Super-EBA e IRM, além de um maior tempo para a ocorrência de infiltração bacteriana (Torabinejad et al., 1995c, d).

Embora a literatura apontasse que o MTA era um material promissor quanto a capacidade de selamento, foi o seu desempenho biológico que sinalizou ser um material com potencial para aplicabilidade clínica. Em 1995e, Torabinejad et al., avaliaram a resposta do tecido perirradicular de cães após o uso de MTA e amálgama como materiais retro-obturadores. Os resultados mostraram menor inflamação perirradicular e mais cápsulas fibrosas adjacentes ao MTA, em comparação com o amálgama. Além disso, a presença de cemento na superfície do MTA foi um achado frequente. Resultados semelhantes foram reportados por Torabinejad et al., em 1997 em modelo de estudo de macacos, reforçando os achados anteriores sobre a resposta tecidual do MTA em comparação ao amálgama como um material retro-obturador (Torabinejad et al., 1997). Após os achados dos estudos *in vivo*, a aplicabilidade clínica do MTA em diferentes procedimentos foi demonstrada. Em 1999, Torabinejad et al., apresentaram uma série de casos clínicos nos quais o MTA havia sido utilizado

em procedimentos de capeamento pulpar, apicificação, selamento de perfurações radiculares não cirúrgica e cirurgicamente, bem como seu uso como material obturador retrógrado. Em todos os casos apresentados houve o sucesso com o uso do material, com o reparo tecidual obtido.

Após os primeiros estudos, inúmeros outros avaliaram o MTA em diferentes terapias e, atualmente, a literatura é vasta demonstrando a capacidade do MTA em promover o reparo tecidual. Dentre os estudos clínicos recentes, em 2019 von Arx et al., avaliaram o resultado a longo prazo (até 10 anos) de dentes tratados com cirurgia apical e que receberam o MTA como material obturador retrógrado. Os resultados mostraram que de 119 dentes disponíveis para a análise de 10 anos, 97 dentes foram classificados como cicatrizados (81,5%). Outros estudos com longo período de proservação reportam também elevados índices de sucesso com o uso do MTA (Cardoso-Silva et al., 2011; Roig et al., 2011; Çaliskan et al., 2016).

Para compreender o mecanismo pelo qual o MTA promove o reparo tecidual, é fundamental analisar a sua estrutura química. Em 1995a, Torabinejad et al., avaliaram a composição química do MTA, e identificaram os principais componentes presentes no material. Os elementos verificados foram o óxido de cálcio, dióxido de silício e óxido de alumínio. Estas matérias-primas, submetidas à altas temperaturas em um forno, produzem principalmente o silicato dicálcio, silicato tricálcio e o aluminato tricálcio. Em 2005, Camilleri et al., verificaram que o MTA, na forma não hidratada (pó), era composto principalmente por íons cálcio, silício e bismuto, sendo que o MTA cinza apresentava, também, traços de ferro em sua composição. O MTA inicia a reação de presa após o contato com água ou umidade (Camilleri et al., 2008b), produzindo silicato de cálcio hidratado e liberando hidróxido de cálcio (Camilleri, 2007). Devido a esta reação ser dependente da água, os materiais à base de silicato de cálcio como o MTA e o Portland são considerados cimentos hidráulicos (Camilleri, 2007)

Diversos estudos reportam uma semelhança química entre o MTA e o cimento Portland (Estrela et al., 2000; Funteas et al., 2003; Song et al., 2006). Também são reportadas semelhanças em relação às propriedades físicas (Islam et al., 2006) e biológicas (Saidon et al., 2003; De-Deus et al., 2005). Entretanto, para permitir o uso odontológico, algumas propriedades do MTA são aprimoradas. No MTA as partículas são menores e mais uniformes, há um controle de qualidade das matérias-primas para a eliminação de metais pesados, e é adicionado um agente radiopacificador para permitir a sua visualização radiográfica (Dammaschke et al., 2005; Camilleri et al., 2005). Em 2005, Dammaschke et al., avaliaram a composição química do MTA e de dois tipos diferentes de Portland e verificaram que no ProRoot MTA há uma menor concentração de metais pesados e alumínio. Além disso, o ProRoot MTA possui em sua composição, o radiopacificador óxido de bismuto.

O óxido de bismuto, adicionado à composição dos materiais à base de silicato de cálcio, não atua como uma substância inerte durante o processo de hidratação. Este composto pode ser detectado tanto como parte da estrutura de hidrato de silicato de cálcio, quanto não reagido juntamente com o hidróxido de cálcio formado durante a hidratação dos silicatos de cálcio (Camilleri, 2008b). Assim, a presença do óxido de bismuto reduz a precipitação de hidróxido de cálcio no MTA em comparação com o Portland sem este elemento (Camilleri, 2007). Além disso, este composto afeta negativamente às propriedades mecânicas desses cimentos e sua microestrutura, tornando o material menos resistente às forças de compressão em comparação ao Portland (Camilleri, 2007; Coomaraswamy et al., 2007; Saliba et al., 2009).

#### 2.2 O agente radiopacificador óxido de bismuto

No tratamento endodôntico, a visualização radiográfica é fundamental para identificar a extensão, a localização e eventuais falhas na condensação dos materiais no interior dos canais radiculares (Tagger et al., 2004). Dessa forma, compostos com propriedades radiopacificadoras são adicionados aos materiais à base de silicato de cálcio. O óxido de bismuto está presente na composição do ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos) e do MTA Flow cinza (Ultradent Products, Inc., Utah, Estados Unidos), enquanto o óxido de zircônio e o tungstato de cálcio estão presentes no cimento AH Plus (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos) (Húngaro-Duarte et al., 2009b).

A norma ISO 6876/2012 especifica que a radiopacidade dos cimentos endodônticos deve ter, no mínimo, 3 milímetros de alumínio. No ProRoot MTA, a proporção de óxido de bismuto presente é de 20% (Torabinejad et al., 1995b).

Estudos mostram que o óxido de bismuto fornece uma radiopacidade de aproximadamente 7 milímetros de alumínio ao ProRoot MTA (Torabinejad et al., 1995d; Laghios et al., 2000; Danesh et al., 2006; Islam et al., 2006; Kim et al., 2008; Camilleri et al., 2010a).

O óxido de bismuto tem como vantagem o alto peso molecular, que permite com que um volume menor de radiopacificador seja capaz de promover uma elevada radiopacidade. Porém alguns aspectos podem contraindicar o seu uso em materiais à base de silicato de cálcio. Diversos estudos têm apontado que o óxido de bismuto pode interferir no processo de hidratação do MTA, aumentando a porosidade e reduzindo a resistência à força de compressão (Coomaraswamy, et al., 2007; Camilleri, 2007).

Em 2007, Coomaraswamy et al., avaliaram o efeito da adição do óxido de bismuto nas propriedades do cimento Portland. Os resultados mostraram que houve uma redução na resistência mecânica de acordo com o aumento na proporção do óxido de bismuto no material. Um aumento de óxido de bismuto de 0 para 10% em peso resultou em uma deterioração da resistência mecânica de 82 para 40 MPa, respectivamente. O aumento do óxido de bismuto também aumentou gradualmente a porosidade do material. Resultados semelhantes foram reportados por Tanomaru-Filho et al., em 2012. Os autores avaliaram a resistência à compressão do MTA e do cimento Portland associado ao óxido de bismuto, óxido de zircônio, tungstato de cálcio ou carbonato de estrôncio. Os resultados mostraram que o óxido de bismuto reduziu significativamente a resistência à compressão entre todos os radiopacificadores avaliados, sugerindo um efeito deletério com o seu uso.

Também foi demonstrado que o óxido de bismuto na composição do ProRoot MTA, é capaz de causar alteração de cor dental (Vallés et al., 2013; Marciano et al., 2014; Camilleri, 2014). Inicialmente, apenas o ProRoot MTA cinza era disponível comercialmente, sendo que a coloração acinzentada limitava o seu uso em áreas estéticas (Bortoluzzi et al., 2007). Para solucionar o problema, o ProRoot MTA branco foi introduzido no mercado. A sua formulação apresenta uma redução na proporção de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO e FeO, sendo a redução do ferro a principal responsável pela alteração de cor do material (Akbari et al., 2012). Embora o MTA branco tenha sido desenvolvido para solucionar o problema do escurecimento dentário promovido pelo MTA cinza, os

estudos relataram haver escurecimento dental tardio (Boutsioukis et al., 2008; Akbari et al., 2012; Lenherr et al., 2012; Felman et al., 2013; Vallés et al., 2013; Bortoluzzi et al., 2007; Jacobovitz et al., 2009; Belobrov et al., 2011). Com isso, mesmo a formulação branca se tornou limitada para áreas estéticas (Akbari et al., 2012). Diferentes hipóteses buscaram explicar o escurecimento verificado para o ProRoot MTA branco. Dentre as suposições, a literatura apontou que o radiopacificador óxido de bismuto era o responsável pela alteração de cor tardia. A desestabilização da molécula de bismuto, quando em contato com um agente oxidante forte, resulta na formação de carbonato de bismuto, que é um precipitado preto (Camilleri et al., 2013; Marciano et al., 2014). Esta teoria foi corroborada por estudos que demonstraram que outros materiais, que também apresentavam o óxido de bismuto na composição, como o cimento AH 26, ocasionam o escurecimento dentário semelhante (Van-der-Burgt et al., 1985; Davis et al., 2002).

A literatura aponta que o óxido de bismuto é quimicamente instável e reativo, por isso, ele interage com diferentes substâncias. Em 2014, Marciano et al., avaliaram a alteração da cor dental e a interação química do óxido de bismuto com os principais componentes presentes na resina composta (metacrilato) e na dentina (colágeno). O estudo revelou que a cor do MTA branco foi alterada em contato com as estruturas dentárias e que o colágeno, presente na matriz dentinária, reagiu com o óxido de bismuto, resultando em uma descoloração acinzentada. No mesmo ano, Camilleri et al., verificaram o mesmo efeito de alteração de cor quando o óxido de bismuto, isoladamente ou na matriz do MTA branco, entra em contato com o hipoclorito de sódio. Estes resultados foram confirmados por Marciano et al. 2015. No estudo, os autores verificaram que, além de interagir com o hipoclorito de sódio e alterar a cor, o bismuto é capaz de migrar em direção aos túbulos dentinários.

#### 2.3 Migração de elementos dos cimentos à base de silicato de cálcio

A reatividade dos componentes liberados pelo MTA é uma de suas principais características. O material é capaz de interagir com o ambiente ao qual é inserido estimulando o reparo tecidual. Durante a reação de hidratação, o MTA libera hidróxido de cálcio e promove a precipitação de fosfato de cálcio em sua superfície, fenômeno

denominado bioatividade (Reyes-Carmona et al., 2009; Schembri-Wismayer et al., 2016). Porém, a literatura tem sugerido que o MTA promove não apenas a liberação de hidróxido de cálcio, mas também de outros elementos químicos nos tecidos aos quais entra em contato (Simsek et al., 2016). Em 2016, Schembri-Wismayer et al., demonstraram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que após a implantação do ProRoot MTA no tecido subcutâneo de ratos, o bismuto foi detectado nos tecidos adjacentes. Os resultados sugeriram que houve a migração de bismuto do material e o seu acúmulo nos tecidos locais.

A análise da liberação e migração de elementos provenientes do MTA em direção aos tecidos foi também avaliada por Simsek et al., em 2016, por meio de espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os autores avaliaram a migração de magnésio, alumínio, cálcio, cromo, arsênio, berílio e chumbo, de diferentes materiais à base de silicato tricálcio, como o Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França), BioAggregate (DiaDent, Burnaby, Canada) e Micro-Mega MTA (Coltene, Besançon, França). Os resultados mostraram que o cromo foi detectado em amostras de cérebro e rim, enquanto o magnésio foi encontrado em amostras de rim e fígado de ratos após 45 dias de implantação dos cimentos no tecido subcutâneo dos animais (Simsek et al., 2016).

Além da liberação de elementos dos cimentos à base de silicato de cálcio, um tema que tem sido abordado é em relação aos possíveis efeitos sistêmicos. Em 2013, Khalil et al., observaram a inflamação dos tecidos renais e hepáticos de ratos após a implantação subcutânea do ProRoot MTA cinza e do BioAggregate. Resultados semelhantes foram descritos por Garcia et al., em 2017. Em ambos os estudos, os autores sugerem que o radiopacificador óxido de bismuto pode ser o responsável pela referida resposta inflamatória sistêmica, porém indicam que mais estudos são necessários para avaliar a hipótese e identificar o mecanismo de migração deste elemento. O padrão de migração relacionado ao tempo de contato do material com os tecidos biológicos também é desconhecido. Isso pode ser uma preocupação, uma vez que após sua aplicação clínica esse tipo de material permanece por um período prolongado e, na maioria das vezes, por toda a vida do paciente.

#### 2.4 Efeitos deletérios do bismuto

Considerando as diversas aplicações clínicas dos materiais à base de silicato tricálcio, é possível que a migração sistêmica de bismuto seja elevada. A inserção destes materiais em contato direto com o tecido ósseo com considerável aporte sanguíneo permite supor que haja uma migração sistêmica do elemento bismuto e seu acúmulo em diferentes órgãos. A migração sistêmica do bismuto pode ser uma séria preocupação devido à sua citotoxicidade. Além de seu uso na odontologia, o óxido de bismuto também é utilizado em produtos farmacêuticos como complemento ao tratamento contra a bactéria *Helicobacter pylori*, patógeno associado a úlcera gástrica. No entanto, a segurança do bismuto tem sido questionada devido ao seu potencial para causar dano às células humanas (Thomas et al., 2011). O bismuto demonstrou ter efeitos citotóxicos às células pulpares humanas bem como às células hepáticas, renais, intestinais e pulmonares (Min et al., 2007; Abudayyak et al., 2017).

Localmente, após a inserção do cimento à base de silicato de cálcio, Marciano et al., em 2015, mostraram a presença de bismuto nos túbulos dentinários, indicando sua migração e ocasionando a alteração de cor e escurecimento tardio das estruturas dentais (Marciano et al., 2014, Camilleri, 2014). Outro efeito deletério do óxido de bismuto refere-se à diminuição da resistência às forças de compressão dos cimentos de silicato de cálcio, após hidratação, alterando sua microestrutura (Camilleri, 2007; Coomaraswamy et al., 2007; Saliba et al., 2009), e diminuindo a liberação de hidróxido de cálcio local (Camilleri, 2008b).

# **3 OBJETIVOS**

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a migração e acúmulo de íons bismuto (Bi) e silício (Si), em períodos distintos, após contato com tecido conjuntivo e ósseo de diferentes cimentos endodônticos reparadores por meio de um modelo *in vivo*, em ratos *Wistar*. Além de testar a hipótese nula de que o bismuto migra localmente apenas quando associado a íons silício.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar a migração e acúmulo de elementos no tecido adjacente aos implantes por meio de espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) e espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS);
- Caracterizar os materiais e identificar alterações decorrentes do contato com os tecidos por meio de espectroscopia Raman;
- Avaliar a resposta tecidual frente ao contato dos materiais com os tecidos por meio de análise histológica.

# **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Delineamento experimental

O estudo foi previamente submetido à análise no Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Protocolo de Aprovação CEUA, FOP/UNICAMP: 5034-1/2018). Os animais foram obtidos junto ao CEMIB/UNICAMP e mantidos em gaiolas plásticas coletivas higienizadas durante todo o período experimental. Foram acondicionados 4 (quatro) animais por gaiola, mantidos em temperatura ambiente e alimentados com ração sólida comercial balanceada e água *ad libitum*. O tamanho da amostra foi calculado no software Gpower 3.0 (Camilleri et al., 2005), considerando poder do teste de 0.80, nível de significância de 5% para um tamanho de efeito médio segundo Cohen 1988 (Estrela et al., 2000), resultando em um total de 64 ratos. O tamanho da amostra foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos de estudo similar (Schembri-Wismayer et al., 2016).

Foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), com peso de aproximadamente 300g, divididos em grupos de acordo com o tempo experimental (30 e 180 dias), local de implantação (tecido conjuntivo ou ósseo) e material implantado. A divisão dos grupos está representada na Figura 1.

Os materiais utilizados foram:

- ProRoot MTA (MTA) (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos). Este material foi utilizado para análise da migração do complexo bismuto e silício (Bi-Si). É composto por 75% de cimento Portland, 20% de óxido de bismuto, 5% de gesso e água destilada como veículo. Foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante;
- Silicato tricálcio (TCS) (TCS-SARL Mineral Research Processing, Garnier, França). Foi utilizado para análise da migração do íon silício (Si) isoladamente. Foi preparado com 100% de silicato tricálcio e água destilada como veículo na proporção pó/líquido de 0,35;

 Hidroxiapatita (Hap-Bi) (Merck, Darmstadt, Alemanha) substituída por óxido de bismuto (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foi utilizada para análise da migração do íon bismuto (Bi) isoladamente. Foi preparada na proporção de 80% de hidroxiapatita, 20% de óxido de bismuto em peso, e manipulada com água destilada como veículo na proporção pó/líquido de 0,25.



Figura 5 - Delineamento experimental com a divisão dos grupos experimentais.

#### 4.2 Procedimentos cirúrgicos

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de Ketamina (Dopalen, Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, São Paulo, Brasil) (80 mg/kg), solução anestésica, e cloridrato de Xilasina (Anasedan, Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, São Paulo, Brasil) (10 mg/kg), solução sedativa e relaxante muscular, por via intramuscular. Em seguida, foi realizada tricotomia da região em que o cimento seria implantado e antissepsia local com iodopovidona (PVPI, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), como mostrado na Figura 2.



**Figura 6 -** Procedimentos cirúrgicos. (A) Associação anestésica utilizada. (B) Anestesia realizada via intramuscular. (C) Tricotomia da região dorsal. (D) Tricotomia da região tibial. (E) Antissepsia para cirurgia em dorso. (F) Antissepsia para cirurgia em tíbia.

Para os implantes subcutâneos, realizou-se duas incisões longitudinais na região do dorso de cada animal com lâmina de bisturi nº 15 (Lamedid Comercial e Serviços Ltda, Barueri, São Paulo, Brasil) e divulsão do tecido cutâneo com tesoura de ponta romba (Meirelles Produtos Médicos Odontológicos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Cada animal recebeu dois implantes de um mesmo material. Para os implantes no tecido conjuntivo, foram utilizados moldes metálicos circulares esterilizados de 2 mm de espessura e 4 mm de diâmetro interno. Os materiais recém espatulados, de acordo com cada grupo, foram depositados nos moldes em contato com o tecido para permitir a padronização do material implantado (0,05g de cada material). Em seguida os moldes foram removidos. Para evitar expulsão durante a mobilidade do animal, os moldes foram posicionados a 10 mm da incisão. As bordas das incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda, São Paulo, Brasil) (Figura 3).



Figura 7 - Procedimento cirúrgico no dorso. (A) incisão no dorso. (B) Divulsão do tecido. (C) Inserção do cimento recém espatulado. (D) Sutura das bordas da ferida.

Para a cirurgia no tecido ósseo, foi realizada uma incisão longitudinal na região da tíbia, com lâmina de bisturi nº 15 (Lamedid Comercial e Serviços Ltda, Barueri, São Paulo, Brasil). Os tecidos foram separados por camadas até o periósteo, onde incisouse novamente para a confecção de duas lojas cirúrgicas na superfície cortical da tíbia, realizadas com ponta diamantada esférica 1016 FG (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil) acoplada em caneta de alta rotação, sob irrigação constante de cloreto de sódio 0,9% (Equiplex, Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil). As cavidades, de 2 mm de espessura e 4 mm de diâmetro interno, foram preenchidas com os cimentos recém espatulados (0,05 g de cada material), totalizando 2 implantes do mesmo cimento por animal. As bordas das incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda, São Paulo, Brasil) (Figura 4). O grupo controle não recebeu nenhum procedimento cirúrgico.



Figura 8 - Procedimento cirúrgico ósseo. (A) Incisão na região da tíbia. (B) Afastamento dos tecidos. (C) Confecção de duas lojas cirúrgicas no osso. (D) Inserção dos cimentos recém espatulados. (E) Sutura das bordas da ferida.

Os ratos foram identificados com marcações nas orelhas, utilizando perfurador de dique de borracha Ainsworth (Golgran Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico, São Paulo, Brasil). Após o procedimento cirúrgico foi administrado analgésico, dipirona 500mg (Sanofi, São Paulo, Brasil), na dosagem de 100 mg/kg, por via intramuscular.

Após os períodos experimentais de 30 e 180 dias, os animais foram sacrificados com uma dose de cloridrato de Ketamina (Dopalen) (240 mg/kg), associada a cloridrato de Xilasina (Anasedan) (30 mg/kg), injetada via intramuscular. A eutanásia foi realizada em sala reservada com baixa luminosidade, limpa, livre de ruídos e longe de outros animais para evitar estresse. A confirmação da morte do animal foi realizada observando-se a ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal.

Imediatamente após a eutanásia, um dos implantes foi removido e o tecido conjuntivo ou ósseo adjacente a ele foi coletado para realização da análise histológica e espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Parte do tecido foi fixado em formaldeído a 10% (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) para preparo histológico e a segunda parte foi armazenada em eppendorf e congelada a - 20°C para caracterização multielementar. O cimento coletado do tecido foi armazenado em eppendorf e mantido em dissecador à vácuo contendo cal sodada (Merck, Darmstadt, Alemanha) para análise em espectroscopia Raman. O outro cimento implantado foi removido juntamente com o tecido ao redor para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectrometria de energia dispersiva (EDS) e espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF). As amostras foram fixadas em álcool 70% (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) para posterior preparo (Figura 5).

#### 4.3 Análise da migração e acúmulo local de elementos

#### 4.3.1 Espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF)

Para avaliação da migração do elemento bismuto do cimento em direção aos tecidos ao redor dos implantes, foi realizada análise em espectrômetro de fluorescência de raios-X. Para as amostras do tecido conjuntivo, foi necessário realizar o procedimento de ponto crítico, com o objetivo de manter a altura e formato da amostra. O tecido ósseo não necessitou de ponto crítico, por se tratar de tecido ósseo, por isso apenas foi deixado 12 horas em dissecador a vácuo contendo cal sodada (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Logo após a remoção do tecido conjuntivo juntamente com o implante realizouse a fixação e desidratação em álcool 70% (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil). As amostras foram em seguida desidratadas em álcool 80%, 90% e 100% 2 vezes por 20 minutos cada. Os espécimes foram inseridos em tubos de plástico imersos em álcool 100% para a fase de secagem na câmara do equipamento Denton Vaccum DCP-1 (Corporate Headquarters Denton Vacuum, LLC, New Jersey – Estados Unidos da América). Com a câmara isolada, em etanol absoluto, injetou-se o gás carbono líquido, fazendo-se várias substituições até a remoção total do álcool, que ocorreu entre 0 e 5°C. As amostras permaneceram imersas na fase líquida. Elevou-se a temperatura dentro da câmara entre 40 e 45 °C, diminuindo a densidade da fase líquida. O aumento da pressão (de aproximadamente 73 atm) causou o aumento da densidade na fase gasosa, pois devido ao aumento gradual da temperatura, as moléculas adquirem energia cinética e se convertem em gás, o que aumenta a pressão interna na câmara. Logo, quando o ponto crítico foi excedido, as fases gasosa e líquida apresentaram a mesma densidade, garantindo que a temperatura estivesse em torno de um valor crítico em que não há limites entre as fases, ou seja, o menisco de transição de fases desaparecesse. Nesta situação, a tensão superficial é igual a zero e todo o líquido se converteu em gás. A câmara foi, então, despressurizada até a pressão atmosférica e a amostra removida (Dedavid et al., 2007).

As amostras foram avaliadas por meio de espectrômetro de fluorescência de raios-X modelo EDX-720 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão). Esta análise foi realizada na Central Multiusuário de Análises Químicas (CMAQ), do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo. Para a análise foram utilizados os seguintes parâmetros: 45kv, 500µA, filtro de ródio (Rh) 45, 100µm, 32 pontos, 120000msp, comprimento de 1mm, sem vácuo. Foi realizada análise linear para identificação do elemento bismuto presente na interface cimento/tecido.

# 4.3.2 Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Para a quantificação dos elementos bismuto e silício nos tecidos ao redor dos implantes, foi realizada a análise em ICP-MS. Foi coletado o tecido circundante ao cimento e congelado à -20°C até o momento da digestão. A quantificação da análise foi realizada através de balança de precisão (Gehaka AND-GR-202, Tóquio, Japão), sendo a amostra inserida no tubo de digestão do sistema Ultrawave Milestone (Milestone, Shelton, Connecticut, Estados Unidos) com 6 mL de ácido nítrico P.A. 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha) redestilado por processo de *sub-boiling* e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha) para digestão ácida. O ciclo do sistema de micro-ondas apresentava uma potência de 1000 W, 20 bar (em todas as etapas) e tempos de ciclagens de 5 minutos a 160°C de temperatura, depois

2 minutos a 160°C, seguido de 5 minutos a 170°C e por fim 15 minutos a 170°C. Durante o ciclo de digestão, tubos brancos sem amostra biológica (*blanks*) foram obtidos sob as mesmas condições de ciclagem e com os mesmos reagentes para assegurar o padrão de qualidade específico daquela rodada de amostra.

Após a digestão, as amostras foram identificadas, com seus respectivos *blanks*, e armazenadas em tubos falcon de 15 mL, garantindo selamento e volume de solução adequados. As amostras foram analisadas em espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Optima 8000, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). A análise foi realizada na Universidade de Birmingham, Reino Unido.

Foi realizada a caracterização multielementar dos íons bismuto (Bi) e silício (Si), para todas as amostras, sendo os valores de fração de massa (ng/g) obtidos em partes por bilhão (ppb) e expressos em função do tempo de exposição do animal e de acordo com o material implantado.

#### 4.4 Caracterização química

Para esta análise, apenas o cimento implantado foi removido, sem tecido circundante. Os cimentos coletados do tecido foram armazenados em eppendorf e mantidos em dissecador à vácuo contendo cal sodada (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os controles foram preparados nas mesmas proporções e dimensões dos cimentos implantados, porém sem a inserção em nenhum animal, e mantidos em dissecador à vácuo por 28 dias para a presa final (Islam et al., 2006).

O espectroscópio Raman do Instituto de Química da Unicamp (IQ - UNICAMP) foi construído pelo Instituto, contendo um laser de frequência única de largura de linha estreita com emissão a 785 nm da marca Cobolt 08 série 0785-08-11-0500-200 usado para excitação do espalhamento de Raman, com potência variável de 1 a 500 mW controlada por software; um conjunto de filtros BHF ASE, de densidade óptica 4, e outro conjunto de filtros BHF do tipo *notch*; diversos dispositivos ópticos como lentes, espelhos e fibra óptica; além de um monocromador acoplado a uma câmera CCD (Andor / Oxford iDUS 416 - DU416A-LDC-DD) usada para detectar sinal espectral,

com uma matriz de sensor de 256x2.000 pixels e eficiência quântica máxima de 95% a 750 nm. As especificações utilizadas no equipamento foram: distância focal Raman de 18,1cm; potência de 500mW; tempo de exposição de 10 segundos; número de acumulação 5; ciclo de 10,0528Hz; feixe do laser de 785nm; comprimento focal de 500mm; pixels: 2000x256; resolução: 2cm<sup>-1</sup>; faixa espectral: 100 a 1400cm<sup>-1</sup>; velocidade de 32,25; rate 50Khz at 16-bit; e pré-amplificação de 1,7x. Os dados dos espectros foram plotados por meio do software Origin Data Analysis (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, Estados Unidos).

#### 4.5 Avaliação da resposta tecidual

Para avaliação da resposta tecidual frente a implantação dos materiais, apenas o tecido circundante ao cimento foi removido e imediatamente fixado em solução de formaldeído 10% (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil). Para o tecido ósseo, logo após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 3 dias, seguido da descalcificação em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil), com trocas da solução a cada 48 horas por 3 meses, para evitar danos ao tecido que a descalcificação por ácidos pode gerar (Dammaschke et al., 2005).

Para obtenção das lâminas, todas as amostras foram lavadas por 24 horas em água, desidratadas em sequência crescente de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%) (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) e diafanizadas por xilol (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil). As peças obtidas foram impregnadas em parafina (Leica, Milão, Itália) a 60°C e seccionadas em cortes de 5 µm por meio de um micrótomo (Leica RM 2155, Nussloch, Alemanha). As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas foram analisadas utilizando um microscópio óptico Leica DM 5000 B (Leica, Milão, Itália) acoplado a uma câmera Leica DC 300 F (Leica, Milão, Itália). As imagens analisadas foram capturadas no aumento de 20x. O infiltrado inflamatório no tecido subcutâneo e ósseo foi avaliado de forma descritiva e os escores referentes a extensão e intensidade da resposta inflamatória foram avaliados. Para análise por escores, a metodologia utilizada foi baseada em estudos anteriores (Yaltirik et al., 2004; Costa et al., 2000; Federation Dentaire International, 1980; Gomes-Filho et al., 2008), sendo classificado em score (0) a ausência de células inflamatórias: resposta inflamatória ausente; (1) de 1 a menos de 25 células: resposta inflamatória leve; (2) de 25 a 125 células: resposta moderada; (3) mais que 125 células: resposta intensa. Os escores de cada grupo foi comparado estatisticamente.

#### 4.6 Análise estatística

O software GraphPad (versão 9.3.1) (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos) foi utilizado para a análise estatística. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para as avaliações paramétricas seguido pelo teste One-way Anova com múltiplas comparações de Tukey (para dados paramétricos) ou o teste de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações de Dunn (para dados não paramétricos) para avaliar as diferenças entre os grupos. Para comparações independentes entre dois grupos, foi utilizado o teste T não pareado ou Mann-Whitney bicaudal de acordo com a distribuição dos dados. Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5% (p < 0,05).

## **5 RESULTADOS**

#### 5.1 Análise da migração e acúmulo local de elementos

#### 5.1.1 Espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF)

As imagens das amostras de tecido conjuntivo avaliadas em XRF e os resultados da análise linear estão representados na Figura 5. Para o cimento MTA, aos 30 dias, foi possível a detecção do elemento Bi na região do cimento e, em menor intensidade no tecido adjacente ao implante. Já para o MTA aos 180 dias, houve uma presença maior de Bi na área correspondente ao tecido, sugerindo a migração do elemento. O mesmo ocorreu com o grupo Hap-Bi aos 180 dias, no qual o Bi foi detectado no tecido. Aos 30 dias, para o grupo Hap-Bi, foi verificada a presença do Bi com maior intensidade no cimento. Houve um pequeno aumento do período de 30 para 180 dias, na concentração de Bi nos grupos MTA e Hap-Bi. Para os grupos controle e TCS, aos 30 e 180 dias, a presença de Bi esteve abaixo do limiar de detecção (*threshold*), indicando a ausência deste elemento nas amostras avaliadas.



**Figura 5 –** Análise em espectrometria de fluorescência de raios-X das amostras de tecido conjuntivo aos 30 e aos 180 dias. A linha azul nas imagens representa a interface entre o material (ponto 1) e o tecido (ponto 2) e a detecção do elemento bismuto é expressa no gráfico de forma correspondente a linha. As letras C, F, M e P demonstram os mesmos gráficos em escala logarítmica, na qual o a linha azul representa o bismuto (Bi Lα) e a linha laranja indica o *threshold* ou o limite de detecção.

As imagens das amostras de tecido ósseo avaliadas por espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) e os resultados da análise linear estão representados na Figura 6. Para o cimento MTA, aos 30 e 180 dias, foi possível a detecção do elemento bismuto (Bi) na região do cimento e, em menor intensidade no tecido adjacente ao implante. O mesmo fenômeno foi observado para o cimento Hap-Bi aos 30 e 180 dias. Para os grupos MTA e Hap-Bi, foi evidente a redução na concentração do íon detectado de 30 para 180 dias, sugerindo que houve um processo de redução na presença do elemento. Para os grupos controle e TCS, aos 30 e 180 dias, a presença de Bi esteve abaixo do limiar de detecção, indicando a ausência deste elemento nas amostras avaliadas.



**Figura 6** - Análise em espectrometria de fluorescência de raios-X das amostras de tecido conjuntivo aos 30 e aos 180 dias. A linha azul nas imagens representa a interface entre o material (ponto 1) e o tecido (ponto 2) e a detecção do elemento bismuto é expressa no gráfico de forma correspondente a linha. As letras C, F e O demonstram os mesmos gráficos em escala logarítmica, na qual o a linha azul representa o bismuto (Bi L $\alpha$ ) e a linha laranja indica o *threshold* ou o limite de detecção.

#### 5.1.2 Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Os gráficos correspondentes à fração de massa (ng/g) dos elementos bismuto e silício detectados nos tecidos conjuntivo e ósseo adjacentes aos materiais implantados estão representados na Figura 7. Para o grupo MTA e Hap-Bi foi possível detectar o bismuto nos tecidos conjuntivo e ósseo em ambos os períodos. A fração de massa de bismuto detectada no tecido conjuntivo foi significativamente menor no período de 30 dias, comparando-se aos 180 dias (p < 0,05). Não houve diferença estatística entre os grupos MTA e Hap-Bi, para o bismuto (p > 0,05). Nos grupos TCS e controle, o bismuto não foi detectado. O elemento silício foi detectado em todos os grupos, com maior fração de massa no tecido conjuntivo após 30 dias para os grupos TCS e MTA, porém sem diferença estatística entre eles (p > 0,05). Para todos os grupos a fração de massa de silício foi menor no tecido ósseo em comparação com o tecido conjuntivo.



**Figura 7 -** Concentração da fração de massa (ng/g) dos elementos bismuto e silício dos grupos analisados, sendo eles, MTA, Controle, Hap-Bi e TCS, nos tecidos conjuntivo e ósseo, nos períodos de 30 e 180 dias.

#### 5.2 Caracterização química

Os espectros Raman correspondentes aos materiais após contato ou não com o tecido conjuntivo e ósseo estão representados nas Figuras 8 e 9. Após a implantação no tecido subcutâneo, os picos de óxido de bismuto (Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (103-211, 315 e 412-446 cm<sup>-1</sup>) após 30 e 180 dias eram evidentes para os grupos MTA e Hap-Bi. Os picos verificados para o MTA foram semelhantes entre o material exposto ou não ao contato com o tecido. Para o grupo TCS, um pico de carbonatação (CaCO<sub>3</sub>) foi encontrado em 1100 cm<sup>-1</sup> após o período de 180 dias. As amostras de Hap-Bi exibiram um pico adicional correspondente ao fosfato (PO<sub>4</sub>) em 958 cm<sup>-1</sup> após contato com o tecido, no entanto, este pico não foi observado no mesmo material não implantado. A implantação no tecido ósseo do Hap-Bi resultou em intensa alteração nos picos entre 0 e 500 cm<sup>-1</sup> em comparação com as amostras não implantadas; ao contrário, o implante deste material no tecido subcutâneo apresentou um padrão semelhante nesta faixa espectral quando comparado com as amostras não implantadas.



**Figura 8 -** Espectros Raman analisados na superfície dos cimentos implantados em tecido conjuntivo, nos períodos de 30 e 180, e sem implantação, denominados como controle.



Figura 9 - Espectros Raman analisados na superfície dos cimentos implantados em tecido ósseo, nos períodos de 30 e 180, e sem implantação, denominados como controle.

#### 5.3 Avaliação da resposta tecidual

As imagens microscópicas representativas do tecido conjuntivo circunjacente aos cimentos implantados estão representadas na Figura 10. Os escores correspondentes a resposta inflamatória do tecido conjuntivo dos grupos avaliados, estão indicados na Tabela 1. É possível observar a presença de infiltrado inflamatório moderado a intenso nas amostras dos grupos MTA, Hap-Bi e TCS aos 30 dias. Notase a presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas. Aos 180 dias, foi possível observar uma resposta inflamatória crônica ao redor dos cimentos MTA e Hap-Bi. Para o grupo TCS houve uma significativa redução no processo inflamatório de 30 para 180 dias (p < 0,05), enquanto para os demais grupos não houve diferença estatística (p > 0,05). Para o grupo controle, por não ter sido realizado nenhum procedimento, pôde-se observar infiltrado inflamatório leve ou ausente em ambos os períodos avaliados.

Material		SCORE				
		0	1	2	3	
	MTA	0/5	0/5	3/5	2/5	
20 dias	Controle	0/3	3/3	0/3	0/3	
30 uias	Hap-Bi	0/5	0/5	5/5	5/5	
	TCS	0/5	0/5	1/5	4/5	
	МТА	0/5	1/5	1/5	3/5	
	Controle	2/3	1/3	0/3	0/3	
180 dias	Hap-Bi	0/5	0/5	3/5	2/5	
	TCS	1/5	1/5	2/5	1/5	

Tabela 1 - Score da resposta inflamatória dos grupos analisados em tecido conjuntivo.



**Figura 10 -** Fotomicrografias de amostras representativas de tecido conjuntivo adjacente aos cimentos implantados, tanto aos 30 quanto aos 180 dias. (Coloração em hematoxilina e eosina – HE, e magnificação de 20X). Em C, a seta verde indica um eosinófilo e a seta azul um macrófago. Em E, a seta vermelha demonstra o cimento encapsulado. Em F, a seta amarela indica um vaso sanguíneo.

As imagens microscópicas representativas da região tecidual óssea circunjacente aos cimentos implantados estão apresentadas na Figura 11. Os escores correspondentes a resposta inflamatória do tecido ósseo dos grupos avaliados está indicada na Tabela 2. É possível observar a presença de infiltrado inflamatório moderado nas amostras dos grupos MTA, Hap-Bi e TCS aos 30 dias. Nota-se a presença de macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares, bem como a presença de pequenos grânulos escurecidos, correspondentes ao material. Aos 180 dias, como esperado, foi possível observar o completo reparo da loja óssea com a neoformação tecidual e uma significativa redução nos escores de inflamação para todos os grupos (p < 0,05). Para alguns animais, aos 180 dias não foi possível verificar a presença do material, indicando que houve a formação óssea ao redor e/ou reabsorção do mesmo. Para o grupo controle, por não ter sido realizado nenhum procedimento, pôde-se observar ausência de infiltrado inflamatório em ambos os períodos avaliados.

Material		SCORE			
		0	1	2	3
	MTA	0/5	0/5	0/5	5/5
20 diaa	Controle	3/3	0/3	0/3	0/3
su dias	Hap-Bi	0/5	0/5	0/5	5/5
	TCS	0/5	0/5	1/5	4/5
	ΜΤΑ	3/5	2/5	0/5	0/5
	Controle	3/3	0/3	0/3	0/3
180 dias	Hap-Bi	0/5	5/5	0/5	0/5
	TCS	0/5	2/5	3/5	0/5

 Tabela 2 - Score da resposta inflamatória dos grupos analisados em tecido ósseo.



**Figura 11 -** Fotomicrografias de amostras representativas de tecido ósseo adjacente aos cimentos implantados, tanto aos 30 quanto aos 180 dias. (Coloração em hematoxilina e eosina – HE, e magnificação de 20X). Em A, a seta amarela indica uma célula gigante multinucleada e a vermelha o cimento enegrecido. É possível visualizar um vaso sanguíneo indicado em B pela seta azul, assim como um osteócito indicado pela seta verde. Em F, a seta branca indica um osteoclasto.

# 6 DISCUSSÃO

O objetivo do estudo foi avaliar, por meio de modelo experimental in vivo, o mecanismo de migração local do elemento bismuto do cimento MTA após implantação em tecido conjuntivo subcutâneo e tecido ósseo. Avaliou-se também a hipótese de que a migração de bismuto ocorre de forma integrada a migração de silício. O bismuto está presente na composição do material à base de silicato de cálcio ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos), material este amplamente utilizado desde a década de 90 na Europa e Estados Unidos. O bismuto tem se mostrado um elemento altamente reativo, com capacidade de induzir a alteração de cor quando presente na composição do MTA (Camilleri, 2014; Marciano et al., 2014). A literatura demonstra que quando o MTA entra em contato com a estrutura dentinária, o bismuto pode ser detectado em profundidade nos túbulos e reage com componentes orgânicos da dentina (Marciano et al., 2014; Marciano et al., 2015). O estudo de Schembri-Wismayer et al., 2016 demonstra também que o MTA é capaz de liberar bismuto quando em contato com o tecido conjuntivo. A preocupação quanto a este fenômeno está relacionada ao potencial citotóxico do bismuto quando em contato com as células pulpares, hepáticas, renais, intestinais e pulmonares (Min et al., 2007; Abudayyak et al., 2017).

Para testar a hipótese de que a migração do bismuto é dependente do silício, o bismuto foi implantado associado a um material que não contém silício, a hidroxiapatita. A associação de hidroxiapatita com 20% de bismuto teve como objetivo permitir uma proporção próxima a presente no ProRoot MTA, simulando uma condição clínica (Camilleri, 2008a). A implantação de bismuto em sua forma pura não permitiria obter uma proporção que representasse a condição real, bem como não seria capaz de promover a presa do material. Por fim, o silicato tricálcio foi utilizado para avaliar apenas o silício isoladamente.

A análise proposta pelo presente estudo foi realizada *in vivo* utilizando um modelo animal com metabolismo complexo. Foram utilizados períodos experimentais de 30 e 180 dias com o intuito de avaliar o contato entre os materiais e os tecidos, simulando as condições clínicas. Dessa forma, foram utilizados animais de 12

semanas, o que corresponde em humanos a uma idade jovem (9 anos). A implantação de 30 dias foi realizada correspondendo a 3 anos em humanos e a implantação de 180 dias correspondendo a aproximadamente 19 anos (Sengupta, 2013).

Para a análise da interface material-tecido e avaliação da migração de elementos do material para os tecidos subcutâneos e para o tecido ósseo, foi utilizada a espectrometria de fluorescência de raios-X (m-XRF). Embora o a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) seja uma metodologia reportada na literatura na identificação de elementos químicos, ela apresenta limitação quanto ao limiar de detecção (Schembri-Wismayer et al., 2016; Marciano et al., 2014; Duarte et al., 2003). Por este motivo foi utilizado no estudo a avaliação por meio de espectrometria de fluorescência de raios-X (m-XRF). Esta metodologia permite a detecção de concentrações menores, o que fornece maior confiabilidade a análise (Silva et al., 2004). Para complementar as análises químicas, os tecidos circundantes ao implante também foram processados para avaliação por meio de espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Esta metodologia permite uma quantificação dos elementos e uma análise química multielementar, com um limiar de detecção extremamente sensível (Bozzola, et al., 1999).

Todos os métodos utilizados no estudo confirmaram a migração local do bismuto para ambos os tecidos investigados, independentemente do período de implantação. Os resultados demonstraram que o mecanismo de migração do bismuto é independente da base do material. O bismuto foi detectado em tecidos locais, mesmo em amostras não contendo silício, rejeitando assim a hipótese nula. Embora não hajam estudos na literatura que tenham avaliado a migração do bismuto nos tecidos e permitam uma comparação com o presente estudo, alguns relatos podem estar corroborando com os achados. Estudos mostram a migração do bismuto na dentina, interagindo com o colágeno presente nesta estrutura e sendo a causa do escurecimento dental observado quando o MTA está em contato com a dentina (Marciano et al., 2014 e 2015). O estudo de Schembri-Wismayer et al., 2016, também sugere que haja uma interação entre o material e os tecidos, levando a uma solubilização local e migração de partículas contendo bismuto. Outros estudos com abordagem sistêmica sugerem haver uma migração de elementos do MTA e o acúmulo em órgãos (Simsek et al., 2016).

Um dado interessante observado por meio de XRF, foi a redução na concentração de bismuto detectado no tecido ósseo de 30 para 180 dias, e um aumento na concentração no tecido subcutâneo. A redução ocorrida na concentração no tecido ósseo pode ser explicada pela presença de maior aporte de irrigação sanguínea neste tecido, o que pode levar a uma maior solubilização do material no local de implantação, situação esta descrita na literatura como *wash-out* (Martin, 2013). Os resultados corroboram com os achados da análise em XRF, na qual o bismuto foi detectado no tecido ósseo. Por outro lado, o aumento na concentração deste elemento no cimento, quando em contato com o tecido subcutâneo do período de 30 para 180 dias, deve ser melhor investigado para que seja possível identificar o fenômeno. A análise química dos materiais implantados por meio de espectroscopia Raman mostrou pequenos sinais de alterações para todos os materiais implantados, independentemente do local de implantação.

No estudo foi também adicionada a análise histológica para avaliação da resposta inflamatória frente a implantação dos materiais. Por meio de análise descritiva dos fenômenos observados, pôde-se verificar que aos 30 dias houve resposta inflamatória moderada para os cimentos MTA, Hap-Bi e TCS tanto para o tecido ósseo quanto para o tecido conjuntivo. Resultados semelhantes são relatados na literatura (Nielsen, et al., 1974; Carlisle, 1981). Aos 180 dias, para o tecido ósseo observou-se o completo reparo, sendo que em alguns animais não foi localizado o material. Este achado sugere que houve a reabsorção/solubilização do cimento nas cavidades, como possível resultado de *wash-out*, como descrito em um relato de caso clínico por Asgary & Ehsani em 2012. Ao contrário, para o tecido subcutâneo, no período de 180 dias, observou-se a presença de um infiltrado inflamatório crônico, sugerindo que a presença do material perpetuou uma resposta inflamatória (Carlisle, 1981).

Sugestões remover óxido de bismuto substituí-lo para 0 е por radiopacificadores alternativos foram previamente propostas, especialmente considerando o potencial de manchamento das estruturas dentárias causado pelo bismuto (Gandolfi, et al., 2009; Martin, 2013; Nielsen, et al., 1974; Carlisle, 1981; Sarkar, et al., 2005). Os resultados obtidos no presente estudo in vivo corroboraram com essa falta de estabilidade química do ProRoot MTA representada pela migração local do bismuto para os tecidos circundantes independentemente do local de implantação. O estudo sugere que a irrigação sanguínea exerce um papel neste processo de migração e a futura avaliação da migração sistêmica poderá complementar os resultados e permitir uma conclusão mais aprofundada acerca de como ocorre este processo e as suas consequências. Além das análises da migração sistêmica, avaliações quantitativas utilizando outras metodologias poderão esclarecer a exata concentração dos íons bismuto e silício presentes nos tecidos adjacentes.

# 7 CONCLUSÃO

É possível concluir que o elemento bismuto, presente na composição do cimento ProRoot MTA, pode migrar e se acumular localmente nos tecidos conjuntivo e ósseo, por meio de um mecanismo independente do silício.

# REFERÊNCIAS

Abudayyak M, Öztaş E, Arici M, Özhan G. Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines. *Chemosphere*. 2017;169:117-123. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.11.018

Akbari M, Rouhani A, Samiee S, Jafarzadeh H. Effect of dentin bonding agent on the prevention of tooth discoloration produced by mineral trioxide aggregate. *Int J Dent.* 2012;2012:563203. doi:10.1155/2012/563203

Austin JH. Silicon levels in human tissues. In: *Biochemistry of Silicon and Related Problems*. Springer US; 1978:255-268. doi:10.1007/978-1-4613-4018-8\_11

Baek SH, Plenk H Jr, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod*. 2005;31(6):444-449. doi:10.1097/01.don.0000148145.81366.a5

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol?. *J Endod*. 2004;30(4):196-200. doi:10.1097/00004770-200404000-00003

Belobrov I, Parashos P. Treatment of tooth discoloration after the use of white mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2011;37(7):1017-1020. doi:10.1016/j.joen.2011.04.003

Bortoluzzi EA, Araújo GS, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Marginal gingiva discoloration by gray MTA: A case report. *J Endod*. 2007;33(3):325-327. doi:10.1016/j.joen.2006.09.012

Boutsioukis C, Noula G, Lambrianidis T. Ex vivo study of the efficiency of two techniques for the removal of mineral trioxide aggregate used as a root canal filling material. *J Endod*. 2008;34(10):1239-1242. doi:10.1016/j.joen.2008.07.018

BOZZOLA JJ, RUSSEL LD. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. 2<sup>a</sup> ed. *Sudbury: MA Jones and Bartlett*, 1999

Çalışkan MK, Tekin U, Kaval ME, Solmaz MC. The outcome of apical microsurgery using MTA as the root-end filling material: 2- to 6-year follow-up study. *Int Endod J.* 2016;49(3):245-254. doi:10.1111/iej.12451

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

Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005;21(4):297-303. doi:10.1016/j.dental.2004.05.010

Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013;29(5):580-593. doi:10.1016/j.dental.2013.03.007

Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater.* 2011;27(8):836-844. doi:10.1016/j.dental.2011.04.010

Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2008b;41(5):408-417. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01370.x

Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007;40(6):462-470. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01248.x

Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J.* 2008a;41(2):151-157. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01330.x

Camilleri J. Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *Journal of Endodontics*. 2014;40(3):436-440. doi:10.1016/j.joen.2013.09.040

Candy JM, Edwardson JA, Klinowski J, Oakley AE, Perry EK, Perry RH. Co-Localization of aluminium and silicon in senile plaques: Implications for the neurochemical pathology of alzheimer's disease. In: *Advances in Applied Neurological Sciences*. Springer Berlin Heidelberg; 1985:183-197. doi:10.1007/978-3-642-70644-8\_15

Cardoso-Silva C, Barbería E, Maroto M, García-Godoy F. Clinical study of mineral trioxide aggregate in primary molars. Comparison between Grey and White MTA--a long term follow-up (84 months). *J Dent*. 2011;39(2):187-193. doi:10.1016/j.jdent.2010.11.010

Carlisle EM. Silicon: A requirement in bone formation independent of vitamin D1. Calcif Tissue Int. 1981;33:27–34.

Carlisle EM. Silicon: An essential element for the chick. *Science*. 1972;178(4061):619-621. doi:10.1126/science.178.4061.619

Carlisle EM. A silicon requirement for normal skull formation in chicks. *The Journal of Nutrition*. 1980b;110(2):352-359. doi:10.1093/jn/110.2.352

Carlisle EM. Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *The Journal of Nutrition*. 1980a;110(5):1046-1056. doi:10.1093/jn/110.5.1046

Carlisle EM. In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. *The Journal of Nutrition*. 1976;106(4):478-484. doi:10.1093/jn/106.4.478

Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod*. 2011;37(9):1327-1330. doi:10.1016/j.joen.2011.05.033

Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod*. 2017;43(5):774-778. doi:10.1016/j.joen.2016.12.018

Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod*. 2007;33(3):295-298. doi:10.1016/j.joen.2006.11.018

Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod*. 2000;26(9):512-516. doi:10.1097/00004770-200009000-00006

Dammaschke T, Gerth HU, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater*. 2005;21(8):731-738. doi:10.1016/j.dental.2005.01.019

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;39(3):213-219. doi:10.1111/j.1365-2591.2006.01076.x

Davis M, Walton R, Rivera E. Sealer distribution in coronal dentin. *Journal of Endodontics*. 2002;28(6):464-466. doi:10.1097/00004770-200206000-00012

Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.* EDIPUCRS; 2007. Acedido em 6 de março de 2013.

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;38(9):604-609. doi:10.1111/j.1365-2591.2005.00987.x

Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics*. 2013;28(1):2-23. doi:10.1111/etp.12040

Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(3):345-347. doi:10.1067/moe.2003.12

Eisinger J, Clairet D. Effects of silicon, fluoride, etidronate and magnesium on bone mineral density: a retrospective study. *Magnes Res.* 1993;6(3):247-249.

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.

Farsi N, Alamoudi N, Balto K, Al Mushayt A. Clinical assessment of mineral trioxide aggregate (MTA) as direct pulp capping in young permanent teeth. *J Clin Pediatr Dent*. 2006;31(2):72-76. doi:10.17796/jcpd.31.2.n462281458372u64

Federation Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials: FDI Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Part 4.1: subcutaneous implantation test. *Int Dent J* 1980;30:140 – 88

Felman D, Parashos P. Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013;39(4):484-487. doi:10.1016/j.joen.2012.11.053

Fregert S. Studies on silicon in tissues with special reference to skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1958;31(2):95-96. doi:10.1038/jid.1958.86

Funteas UR, Wallace JA, Fochtman EW. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Aust Endod J.* 2003;29(1):43-44. doi:10.1111/j.1747-4477.2003.tb00498.x

Gandolfi MG, Iacono F, Agee K, et al. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:e39–45.

Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J.* 2010;43(10):917-929. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01768.x

Garcia LDFR, Huck C, Magalhães FAC, Souza PPC, Souza Costa CA. Systemic effect of mineral aggregate-based cements: Histopathological analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2017;25(6):620-630. doi:10.1590/1678-7757-2016-0634

Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, et al. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod*. 2008;34(1):62-65. doi:10.1016/j.joen.2007.09.018

Gonzalez-Muñoz MJ, Meseguer I, Sanchez-Reus MI et al. Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminum toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(3):1111-1118. doi:10.1016/j.fct.2007.11.006

Húngaro-Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009a;35(5):737-740. doi:10.1016/j.joen.2009.02.006

Húngaro-Duarte MA, Midena RZ, Zeferino MA et al. Evaluation of ph and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *Journal of Endodontics*. 2009b;35(9):1274-1277. doi:10.1016/j.joen.2009.05.009

Ibarrondo I, Balziskueta U, Martínez-Arkarazo I et al. Portable Raman can be the new hammer for architects restoring 20th-century built heritage elements made of reinforced concrete. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2020. doi:10.1002/jrs.5959

Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod*. 2006;32(3):193-197. doi:10.1016/j.joen.2005.10.043

Jacobovitz M, de Pontes Lima RK. The use of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on apexification of a replanted tooth: A case report. *Dent Traumatol.* 2009;25(3):e32-e36. doi:10.1111/j.1600-9657.2008.00745.x

Jugdaohsingh R, Anderson SH, Tucker KL, et al. Dietary silicon intake and absorption. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(5):887-893. doi:10.1093/ajcn/75.5.887

Khalil WA, Eid NF. Biocompatibility of BioAggregate and mineral trioxide aggregate on the liver and kidney. *Int Endod J.* 2013;46(8):730-737. doi:10.1111/iej.12050

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;105(1):e54-e57. doi:10.1016/j.tripleo.2007.08.001

KRUG, F. J., ed., *III Workshop sobre preparo de amostras - Métodos de decomposição de amostras*, São Carlos, 23-27/10/2000. 149 pg

Laghios CD, Benson BW, Gutmann JL, Cutler CW. Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials. *Int Endod J.* 2000;33(4):311-315. doi:10.1046/j.1365-2591.2000.00281.x

Lassus A. Colloidal silicic acid for oral and topical treatment of aged skin, fragile hair and brittle nails in females. *J Int Med Res.* 1993;21(4):209-215. doi:10.1177/030006059302100406

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. doi:10.1016/S0099-2399(06)81282-3

Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: A laboratory study. *Int Endod J*. 2012;45(10):942-949. doi:10.1111/j.1365-2591.2012.02053.x

Linu S, Lekshmi MS, Varunkumar VS, Sam Joseph VG. Treatment outcome following direct pulp capping using bioceramic materials in mature permanent teeth with carious exposure: A pilot retrospective Study. *J Endod*. 2017;43(10):1635-1639. doi:10.1016/j.joen.2017.06.017

Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimarães BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod*. 2014;40(8):1235-1240. doi:10.1016/j.joen.2014.01.044

Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investig.* 2015;19(9):2201-2209. doi:10.1007/s00784-015-1466-8

Martin K.R. Silicon: The health benefits of a metalloid. Met. Ions Life Sci. 2013;13:451–473.

Min KS, Chang HS, Bae JM, Park SH, Hong CU, Kim EC. The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. *J Endod*. 2007;33(11):1342-1346. doi:10.1016/j.joen.2007.07.012

Nielsen FH, Sandstead HH. Are nickel, vanadium, silicon, fluorine, and tin essential for man? Am J Clin Nutr. 1974;27:515–520.

Pace R, Giuliani V, Pagavino G. Mineral trioxide aggregate as repair material for furcal perforation: Case series. *J Endod*. 2008;34(9):1130-1133. doi:10.1016/j.joen.2008.05.019

Paiva EM, Ribessi RL, Pereira CF, Rohwedder JJR. Low-frequency Raman spectrophotometer with wide laser illumination on the sample: A tool for pharmaceutical analytical analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020;228:117798. doi:10.1016/j.saa.2019.117798

Reffitt DM, Jugdaohsingh R, Thompson RP, Powell JJ. Silicic acid: Its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. *J Inorg Biochem.* 1999;76(2):141-147. doi:10.1016/s0162-0134(99)00126-9

Reyes-Carmona JF, Felippe MS, Felippe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod*. 2009;35(5):731-736. doi:10.1016/j.joen.2009.02.011

Roig M, Espona J, Mercadé M, Duran-Sindreu F. Horizontal root fracture treated with MTA, a case report with a 10-year follow-up. *Dent Traumatol.* 2011;27(6):460-463. doi:10.1111/j.1600-9657.2011.01018.x

Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(4):483-489. doi:10.1067/moe.2003.20

Saliba E, Abbassi-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper S, Camilleri J. Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. *International Endodontic Journal*. 2009;42(4):322-328. doi:10.1111/j.1365-2591.2008.01512.x

Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. J Endod. 2005;31:97–100.

Schembri-Wismayer P, Lung CY, Rappa F, Cappello F, Camilleri J. Assessment of the interaction of Portland cement-based materials with blood and tissue fluids using an animal model. *Scientific Reports*. 2016;6(1). doi:10.1038/srep34547

Schwarz K, Milne DB. Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature*. 1972;239(5371):333-334. doi:10.1038/239333a0

Schwarz K. Silicon, fibre, and atherosclerosis. *The Lancet*. 1977;309(8009):454-457. doi:10.1016/s0140-6736(77)91945-6

Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. Int J Prev Med. 2013;4(6):624-630.

Silva RMC, Filho VFN, Appoloni CR. Fluorescência de raios x por dispersão em energia. *Eduardo Galliano*, Londrina. 2004;(8). ISSN 2178-4507

Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in onevisit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J.* 2007;40(3):186-197. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01214.x

Simsek N, Bulut ET, Ahmetoğlu F, Alan H. Determination of trace elements in rat organs implanted with endodontic repair materials by ICP-MS. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27(3):46. doi:10.1007/s10856-015-5663-4

Smith BL. Analysis of hair element levels by age, sex, race, and hair color. In: Anke M, Meissner D, Mills CF (eds) Trace elements in man and animals, TEMA Kluwer, New York, 1993, pp. 1091-1093.

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;102(6):809-815. doi:10.1016/j.tripleo.2005.11.034

Tagger M, Katz A. A standard for radiopacity of root-end (retrograde) filling materials is urgently needed. *International Endodontic Journal*. 2004;37(4):260-264. doi:10.1111/j.0143-2885.2004.00787.x

Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, et al. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012;2012:898051. doi:10.5402/2012/898051

Thomas F, Bialek B, Hensel R. Medical use of bismuth: the two sides of the coin. *Journal of Clinical Toxicology*. 2011;s3(01). doi:10.4172/2161-0495.s3-004

Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 1999;25(3):197-205. doi:10.1016/S0099-2399(99)80142-3

Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod*. 1995e;21(12):603-608. doi:10.1016/S0099-2399(06)81112-X

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995a;21(7):349-353. doi:10.1016/S0099-2399(06)80967-2

Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod*. 1997;23(4):225-228. doi:10.1016/S0099-2399(97)80051-9

Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod*. 1995d;21(3):109-112. doi:10.1016/s0099-2399(06)80433-4

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*. 1995c;21(6):295-299. doi:10.1016/S0099-2399(06)81004-6

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. doi:10.1016/S0099-2399(06)80271-2

Torabinejad M, White DJ. Tooth filling material and method of use. US patent 5415547. May 16, 1995b

Vallés M, Mercadé M, Duran-Sindreu F, Bourdelande JL, Roig M. Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. *J Endod*. 2013;39(4):525-528. doi:10.1016/j.joen.2012.12.021

Van-der-Burgt TP, Plasschaert AJ. Tooth discoloration induced by dental materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60(6):666-669. doi:10.1016/0030-4220(85)90373-1

von Arx T, Jensen SS, Janner SFM, Hänni S, Bornstein MM. A 10-year follow-up study of 119 teeth treated with apical surgery and root-end filling with mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2019;45(4):394-401. doi:10.1016/j.joen.2018.12.015

Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod*. 2004;30(2):95-99. doi:10.1097/00004770-200402000-00008

#### ANEXOS

**ANEXO 1 –** Certificado de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP.

CERTIFICADO CEUA nº 159/2022





#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>Avaliação in vivo da migração de íons bismuto e silício presentes</u> <u>em cimentos reparadores</u>, registrada com o nº <u>5034-1(A)/2019</u>, sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr.</u> <u>Marina Angélica Marciano da Silva e Lauter Eston Pelepenko Teixeira, Tamires Melo Francati, Thiago</u> <u>Bessa Marconato Antunes</u>, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas -CEUA/UNICAMP, em reunião de 18/03/2019

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica			
Vigência do projeto:	01/02/2019 a 01/02/2022			
Vigência da autorização para	18/03/2019 a 01/02/2022			
manipulação animal:				
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH			
No. de animais:	5			
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas			
Sexo:	5 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH			
No. de animais:	5			
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas			
Sexo:	5 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH			
No. de animais:	5			
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas			
Sexo:	5 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH			
No. de animais:	5			
ldade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas			
Sexo:	5 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH			
No. de animais:	5			
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas			
Sexo:	5 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH			
No. de animais:	5			
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas			
Sexo:	5 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH			
No. de animais:	2			
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas			
Sexo:	2 Machos			

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica Informar código 3277684E 7F7F4797 8180E868 178CA5F4 CERTIFICADO CEUA nº 159/2022

Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH
No. de animais:	2
ldade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	2 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH
No. de animais:	5
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH
No. de animais:	5
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH
No. de animais:	5
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH
No. de animais:	5
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH
No. de animais:	5
ldade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH
No. de animais:	5
Idade/Peso:	9.00 Semanas / 300.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
	na Área da Ciência em Animais de Laboratório - UNICAMP)
Biotério onde serão mantidos	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP
os animais <sup>.</sup>	

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA,SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 14 de junho de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente Rosangela dos Santos

Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se

disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica Informar código 3277684E 7F7F4797 8180E868 178CA5F4



ANEXO 2 – Relatório de similaridade.

Avaliação in vivo da migração local de íons bismuto e silício presentes em cimentos reparadores em contato com tecido conjuntivo e ósseo

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



Fonte da Internet

Excluir citações E Excluir bibliografia E

Em Em < 3%

# turnitin

# Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por Turnitin. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material:	Tamires Melo Francati
Título do Trabalho:	Avaliação in vivo da migração local de íons bismuto e silício
Título do envio:	Avaliação in vivo da migração local de íons bismuto e silício
Nome do arquivo:	DISSERTAC_A_O_TAMIRES_MELO_FRANCATI.docx
Tamanho de arquivo:	41.54M
Contagem de páginas:	73
Contagem de palavras:	14,874
Contagem de caracteres:	86,088
Data de envio:	25-mai-2022 01:38PM (UTC-0300)
Identificação do Envio:	1844045282

