University of Mosul

College of Dentistry

Preparation and Evaluation of Glutamic Acid - Calcium Oxide Based Endodontic Sealer

A Dissertation Submitted

By

Raghad Adnan Rashid Al-Askary

To

The Council of the College of Dentistry

Mosul University

as a Partial Fulfillment of Requirements

for the Degree of Philosophy Doctorate

In

Dental Sciences

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Sawsan Hameed Ahmed

٢٠٢٢ A.D ١٤٤٣ A

ABSTRACT

Aims: The aim of this study, is to prepare firstly: calcium oxide nanopowder (CaO) from natural cowrie seashell and secondly: to prepare a new endodontic Glutamic acid-calcium oxide based nanosealer and confirm its hydration setting reaction using the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD) analyses, followed by evaluation its physical, chemical, biological and clinical properties, and comparing the results with biocaramic based sealer (BioRoot).

Materials and Methods: The CaO nanopowder was prepared from calcinated cowrie seashell that grounded and sieved to obtain ٢٥μm size fine powder. After that this resultant micronized CaO was firstly milled with high energy ball milling machine and then underwent further size reduction using high intensity ultrasonic machine after preparation calcium hydroxide ($Ca(OH)_{٢}$) suspension from the milled powder. The resulted suspension was further diluted with deionized water and then filtered with ٠,٢٠ μm and then with ٠,١٠ μm pore size filter membranes using vacuum filtration system. Then the filtered $Ca(OH)_{٢}$ suspension was centrifuge and the supernatant aqueous medium was discarded. The remaining suspension was dried using freeze drying by firstly freeze the suspension at (-٨٠) ºC, and then drying at low pressure using Lyophiliyzer. The freeze dried powder was then calcinated at ١٠٠٠ ºC for ٢hrs. The obtained CaO nanopowder was characterized using field emission scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray (FESEM/ EDX) and XRD.

The prepared CaO was used as the main component to prepare the experimental nanosealer powder. Then after several pilot studies, the final formula for the prepared sealer was being as the following. The powder

part consists mainly of nano CaO (٤٤٪), Glutamic amino acid (٢٠٪), nano zirconium oxide (٢٣٪), and nano silica oxide (١٣٪), while the liquid part consists of distilled water (٨٢٪) and propylene glycol (١٨٪).

The hydration setting reaction of the prepared sealer was confirmed by FTIR and XRD analyses. The prepared nanosealer was subjected to evaluate its physical, chemical, biological and clinical properties, and comparing the results with BioRoot sealer.

The physical-chemical properties were evaluated by testing the working and setting times, flow ability, film thickness, solubility, and radiopacity according to the ANSI/ADA specifications No. ٥٧ and the ISO ٦٨٧٦ for root canal sealing material.

The biological properties were evaluated by testing the Arsenic content; in addition to the pH level at (٣hrs) and (١, ٣, ٧, ١٤, ٢٨) days. While the biocompatibility was conducted according to the ANSI/ ADA No. ٤١ and ISO ١٠٩٩٣-٦ (Tests for local effects after implantation) using subcutaneous implantation in the dorsal of albino rabbits.

The bioactivity of the sealer was assessed according to the ISO ٢٣٣١٧ (Implants for surgery - *In vitro* evaluation for apatite-forming ability of implant materials) using the FESEM/EDX and XRD analyses to evaluate the apatite deposits on the sealers' surface after immersion in phosphate buffer saline (PBS) for ٢٨ days.

The clinical properties were evaluated through testing the apical microleakage by measuring the linear coronal extension of methylene blue dye in mm using the digital stereomicroscope. While the interfacial adaptation of sealer to root canal dentin was assessed using FESEM analysis and then by measuring the dentin-sealer interfacial gaps in

micrometer using image processing software. In addition the antibacterial activity was evaluated using agar diffusion test against *E. faecalis* and *E faecium* by measuring the diameters of inhibition zones in mm.

Results: The FTIR and XRD spectrums confirmed the hydration setting reaction between the CaO and Glutamic acid by formation of calcium diglutamate complex and other byproducts calcium carbonate ($CaCO_{٣}$), calcium hydroxide ($Ca(OH)_{٢}$), dicalcium silicate ($C_{٢}S$), tricalcium silicate ($C_{٣}S$), calcium silicate hydrate (CSH).

The working and setting times, flowability, film thickness, solubility and radiopacity of the experimental nanosealer were fulfilled the requirements of ANSI/ADA Specifications No.٥٧ and ISO ٦٨٧٦ for dental root canal sealing materials.

The experimental and BioRoot sealers were free from arsenic content and they have high alkaline pH exceeding the ١٢ at ٣hrs after mixing that decrease with time but still alkaline (٩,٣٨) at ٢٨ days after mixing. The experimental sealer yielded a satisfactory and faster tissue reaction and healing than that for BioRoot sealer.

The experimental nanosealer had good *in vitro* bioactivity and comparable to that for BioRoot sealer. The experimental sealer has sufficient apical seal and interfacial adaptation to root canal dentin than that for BioRoot.

The experimental nanosealer showed the highest antimicrobial activity against *E. faecalis* and *E. faecium* than that for BioRoot sealer at all observation times. However the antibacterial efficacy of both sealers was decreased with time but still found at ٧ days after incubation.

Conclusions: The prepared nanosealer has physical properties fulfilled the requirements of ANSI/ADA Specification No.٥٧ and ISO ٦٨٧٦ for dental root canal sealing materials. The experimental nanosealer was devoid from arsenic content and showed alkaline pH even at ٢٨ days of incubation; and has good biocompatibility with acceptable inflammatory tissues reaction. In addition, the experimental nanosealer shows considerable apatite formation on its surface and higher antibacterial activity against *E.faecalis* and *E.faecium*. Accordingly the experimental nanosealer offered satisfies properties that enable it to be used as a root canal sealer.

جامعة الموصل

كلية طب الأسنان

تحضير وتقييم سدادة لبية من حامض الكلوتاميك و اوكسيد الكالسيوم

أطروحة تقدمت بها

رغد عدنان رشيد العسكري

إلى

مجلس كلية طب الأسنان

جامعة الموصل

كجزء من متطلبات نيل شهادة

دكتوراه فلسفة في علوم طب الاسنان

بإشراف

الاستاذ المساعد

الدكتوره سوسن حميد احمد

١٤٤٣هـ ٢٠٢٢ م

الخلاصة

الأهداف: هدفت هذه الدراسة أولا: الى تحضير مسحوق اوكسيد الكالسيوم النانوي من الصدف الطبيعي وثانياً: لتحضير مادة سداده نانوية مانعة للتسرب ومكونة من حامض الكلوتاميك و اوكسيد الكالسيوم النانوي المحضر ومن ثم تأكيد حدوث تفاعل التصلب المائي للمادة باستخدام تحاليل فورييه بالاشعة تحت الحمراء (FTIR) و حيود الاشعة السينية (XRD) ومن ثم تقييم الخصائص الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية والسريرية للمادة المصنعة، ومقارنة النتائج مع مادة السداده المانعة للتسرب الحيوية (BioRoot).

المواد وطرق العمل: تم تحضير مسحوق اوكسيد الكالسيوم النانوي من صدف البحر المكلس الذي تم طحنه ونخله للحصول على مسحوق ناعم بحجم ٢٥ ميكرون. بعد ذلك تم طحن هذا المسحوق المايكروي أولاً باستخدام آلة طحن بالكرة عالية الطاقة ثم خضع لمزيد من تصغير حجم جزيئاته باستخدام آلة الموجات فوق الصوتية عالية الكثافة بعد تحضير معلق هايدروكسيد الكالسيوم (Ca(OH)٢) من المسحوق المطحون. ثم تم تخفيف المعلق الناتج بشكل اضافي باستخدام الماء المنزوع الايونات وبعد ذلك ترشيح المعلق المخفف باستخدام أغشية ترشيح بحجم مسام ٠,٢٠ ميكرومتر ثم بحجم مسام ٠,١٠ ميكرومتر باستخدام نظام الترشيح الشافط. بعد ذلك تم فصل المعلق الناتج باستخدام جهاز طرد مركزي للتخلص من الوسط المائي الطافي. ثم تم تجفيف المعلق المتبقي باستخدام التجفيف بالتجميد وذلك بتجميد المعلق عند(-٨٠) درجة مئوية، ثم التجفيف عند ضغط منخفض باستخدام جهاز التجفيد (Lyophiliyzer). ثم بعد ذلك تم حرق مسحوق هايدروكسيد الكالسيوم المجفف بالتجميد عند ١٠٠٠ درجة مئوية لمدة ساعتين للحصول على مسحوق اوكسيد الكالسيوم النانوي والذي تم فحصه وتشخيصه باستخدام المجهر الالكتروني الماسح للانبعاثات الميدانية/مطيافية تشتت الطاقة بالاشعة السينية (FESEM/EDX) و XRD.

بعد ذلك تم استخدام اوكسيد الكالسيوم النانوي المحضر كمكون رئيسي لتحضير مسحوق مادة السداده المانعة للتسرب النانوية التجريبية. و بعد عدة محاولات تجريبية، كانت الصيغة النهائية لمادة السدادة المحضرة على النحو التالي. يتكون جزء المسحوق من اوكسيد الكالسيوم النانوي (٤٤٪)، والحمض الأميني جلوتاميك (٢٠٪)، و اوكسيد الزركونيوم النانوي (٢٣٪)، و

اوكسيد السيليكا النانوي (١٣٪)، بينما يتكون الجزء السائل من الماء المقطر (٨٢٪) والبروبيلين جلايكول (١٨٪). كانت نسبة المسحوق / السائل ١ جم من المسحوق إلى ٠,٣ مل سائل ووقت الخلط كان ٣٨ ثانية. وقد تم تأكيد تفاعل التصلب المائي لمادة السدادة المحضرة بواسطة فحوصات FTIR و XRD.

وبعد ذلك تم اخضاع مادة السدادة النانوية التجريبية المحضرة لتقييم خواصها الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية والسريرية ، ومقارنة النتائج مع BioRoot sealer.

بالنسبة للخواص الفيزيائية والكيميائية تم تقييمها من خلال اختبار أوقات العمل والتلصب، والقدرة على التدفق ، وسمك الشريحة، والذوبانية ، والسعة الإشعاعية وفقًا لمواصفات ANSI/ADA رقم٥٧ و ISO ٦٨٧٦ لمواد ختم قناة جذر الأسنان.

بالنسبة للخصائص البيولوجية فقد تم تقييمها عن طريق اختبار محتوى الزرنيخ (السمية). بالإضافة إلى مستوى الحموضة (الاس الهايدروجيني) عند (٣ ساعات و١، ٣، ٧، ١٤، ٢٨) يوم. بينما تم إجراء التوافق الحيوي (تقييم رد فعل النسيج) وفقًا لـ ANSI/ADA رقم ٤١ و ISO ١٠٩٩٣-٦ (اختبارات التأثيرات الموضعية بعد الزرع) باستخدام الزرع تحت الجلد في ظهر الأرانب البيضاء المختبرية.

بالإضافة إلى تقييم النشاط الحيوي لمادة السداده المانعة للتسرب النانوية التجريبية الذي تم تقييمه وفقًا لمعيار ISO ٢٣٣١٧ (غرسات للجراحة – التقييم في المختبر لقدرة مواد الزرع على تكوين الأباتيت) باستخدام تحليلات FESEM/EDX و XRD لتقييم رواسب الأباتيت على سطح المواد المانعة للتسرب بعد الغمر في محلول الفوسفات الدارئ لمدة ٢٨ يومًا.

بالنسبة للخواص السريرية فقد تم تقييمها من خلال اختبار التسرب المجهري القمي بقياس الامتداد التاجي الخطي لصبغة الميثيلين الزرقاء بالمليميتر باستخدام المجهر الرقمي المجسم. بينما تم تقييم التكيف البيني بين مادة السدادة المانعة للتسرب وبين عاج قناة الجذر باستخدام تحليل FESEM ثم عن طريق قياس الفجوات البينية بين السدادة والعاج بالميكرومتر باستخدام برنامج معالجة الصور. بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام

اختبار انتشار الأجار ضد بكتريا *E.faecalis* و *E.faecium* عن طريق قياس أقطار مناطق التثبيط بالملليمتر.

النتائج: أكدت أطياف FTIR و XRD على حدوث تفاعل التصلب المائي بين اوكسيد الكالسيوم وحمض الجلوتاميك عن طريق تكوين مركب calcium diglutamate complex ومنتجات ثانوية أخرى مثل كاربزنات الكالسيوم، هيدروكسيد الكالسيوم، سليكات ثنائي الكالسيوم، سليكات ثلاثي الكالسيوم، سيليكات الكالسيوم الجيلاتيني.

تم استيفاء شروط أوقات العمل والتصلب، وقابلية التدفق، وسماكة الشريحة، وقابلية الذوبان، والعتمة الإشعاعية لمادة السدادة المانعة للتسرب النانوية التجريبية لمتطلبات مواصفات ANSI/ADA رقم ٥٧ و ISO ٦٨٧٦ لمواد ختم قناة جذر الأسنان. كانت كل من مادة السدادة النانوية التجريبية وBioRoot sealer خالية من محتوى الزرنيخ ولديهما درجة حموضة قلوية عالية تتجاوز ١٢ عند ٣ ساعات اختبار بعد الخلط والتي تقل بمرور الوقت ولكنها لا تزال قلوية عند فحصها بعد ٢٨ يومًا من الخلط. أسفر السداد النانوي التجريبي عن تفاعل وشفاء مُرضٍ وأسرع للأنسجة من منتج BioRoot sealer. كانت مادة السدادة النانوية التجريبية جيدة في النشاط الحيوي في المختبر وقابلة للمقارنة مع مادة BioRoot sealer. يمتلك السداد النانوي التجريبي ختم قمي كافٍ وتكيف بيني مع عاج قناة الجذر أكثر من تلك الموجودة في BioRoot sealer. كما وأظهر السداد النانوي التجريبي مضاد بكتيري عالي ضد *E.faecalis* و *E.faecium* مقارنة مع BioRoot sealer في جميع أوقات المراقبة. ومع ذلك، فإن فعالية كل من السدادات انخفضت بمرور الوقت ولكنها لا تزال موجودة في فحص ال ٧ أيام بعد الحضانة.

الاستنتاجات: السداد النانوي التجريبي المانع للتسرب المحضر له خصائص فيزيائية تفي بمتطلبات مواصفات ANSI/ADA رقم ٥٧ و ISO ٦٨٧٦ لمواد ختم قناة جذر الأسنان. وقد كان السداد التجريبي خاليًا من محتوى الزرنيخ وأنه مازال لديه الأس الهيدروجيني القلوي حتى بعد ٢٨ يومًا من الخزن بالاضافة الى امتلاكه توافق حيوي جيد وتفاعل مقبول للأنسجة الضامة. وايضا قد أظهر السداد النانوي التجريبي تكوينًا كبيرًا للأباتيت على سطحه ونشاطًا

مضادًا عاليا ضد *E.faecalis* و *E.faecium*. ووفقًا لذلك، فإن مادة السدادة النانوية التجريبية توفر خصائص مرضية يمكنها من استخدامها كمادة مانعة للتسرب لقناة الجذر.