



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernando Antonio Vázquez García

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
MECÂNICAS E ANTIMICROBIANAS DO MTA E CIMENTO
PORTLAND ASSOCIADO A SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA**

Araraquara

2014



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernando Antonio Vázquez García

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
MECÂNICAS E ANTIMICROBIANAS DO MTA E CIMENTO
PORTLAND ASSOCIADO A SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2014

Vázquez Garcia, Fernando Antonio

Avaliação de propriedades físico-químicas, mecânicas e antimicrobianas do MTA e Cimento Portland associado a solução de nanopartículas de prata / Fernando Antonio Vázquez Garcia.-- Araraquara: [s.n.], 2014.

64 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Nanopartículas metálicas 2. Materiais dentários 3. Propriedades físicas 5. Endodontia I. Título

FERNANDO ANTONIO VÁZQUEZ GARCÍA

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
MECÂNICAS E ANTIMICROBIANAS DO MTA E CIMENTO
PORTLAND ASSOCIADO A SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

3º examinador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

Araraquara, 25 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

FERNANDO ANTONIO VÁZQUEZ GARCÍA

NASCIMENTO 26/07/1986

Tijuana, Baja California, México

FILIAÇÃO Jose Antonio Vázquez Fernandez

Maria Hortencia García Esquivel

2004 – 2008 Curso de Graduação em Odontologia

Universidad Autonoma de Baja California- UABC

2009 – 2010 Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia

Colegio Nacional de Cirujanos Dentistas, A.C

2010 – 2011 Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia com maestros
Brasileiros

Ocean Orthodontics S.C

2010 – 2011 Curso de Aperfeiçoamento em Periodontia

Universidad Autonoma de Guerrero y Standard Dental Institute

2012 – 2014

Curso de Especialização em Endodontia

Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia –
FAEPO

2012 – 2014

Curso de Mestrado em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

A Deus primeiramente, que me deu a oportunidade de poder viver uma experiência inesquecível tanto na parte humana como profissionalmente, sem a ajuda dele não seria capaz de estar aqui no dia de hoje.

Aos meus pais, Antonio Vázquez e Hortencia García, o meu exemplo a seguir, por ter me dado a vida, por me ensinar desde pequeno que para ganhar algo é necessário lutar sem parar. Meus pais que são o melhor exemplo disso, sempre lutando, trabalhando dia a dia para poder nos dar o melhor, me apoiando sempre em todos os meus projetos, me deixando viver todas as experiências, como foi este sonho e aventura de realizar uma pós-graduação no Brasil. Obrigado, Pais, porque mesmo tão longe dos seus carinhos, amor, apoio econômico e moral sempre esteve presente dia a dia. Amo muito vocês.

As minhas irmãs Areli Vázquez e Carolina Vázquez, as quais o destino me deu a oportunidade de conviver. Sempre amigas, confidentes, e desde a adolescência deram um grande exemplo para mim, pois estudaram e trabalharam na adolescência, ainda atualmente são profissionais de excelente qualidade. Obrigado pela força e conselhos. Amo muito vocês.

Ao Ethan, meu primeiro sobrinho, que nasceu um pouco depois da minha chegada ao Brasil. Ainda, mesmo essa distância, é uma das melhores coisas que já aconteceram na minha vida, pois faz meu dia muito feliz só de olhar seu sorriso na foto.

Posso dizer que tenho a melhor família do mundo, e que em todos os momentos de trabalho, saudade, stresse, simplesmente, falar com vocês já é um remédio enorme que me recarrega as forças para poder seguir em frente. Uma família sinônimo de conforto, união, amor e felicidade. Amo muito todos vocês. E este triunfo também é de vocês.

Ao Arturo Aranda, meu professor, grande amigo e irmão que conheci há quatro anos em um curso em Tijuana, e desde esse dia formamos uma amizade inquebrantável . Um dia, depois de saber que ele começara a cursar seu doutorado na FOAR, levou aos professores brasileiros ao curso de Tijuana, eu decidi fazer algo diferente e pedi para ele a oportunidade de fazer o meu mestrado no Brasil, ele acreditou em mim e me abriu as portas a esta grande experiência que acaba no dia de hoje, sabendo o quanto é difícil mudar-se para um país diferente e começar do zero, ele me ajudou tornando as coisas mais simples quando cheguei. Agradeço muito tua amizade e obrigado por todos os ensinamentos, por me orientar e aconselhar.

Agradecimentos

Em especial aos meus queridos amigos e professores minha Orientadora Juliane Maria Guerreiro Tanomaru e Co-orientador Mario Tanomaru Filho, os quais tive a oportunidade de conhecer antes de vir ao Brasil, eu escrevia para vocês desde Tijuana para perguntar sobre como estudar com vocês e sempre obtive uma resposta em cada e-mail, sem dúvida vocês também são parte fundamental de que hoje eu esteja aqui, desde o dia que conheci vocês naquela aula em Tijuana, com um espanhol excelente. Aprendi muito com vocês, obrigado por todo o ensino e ajuda nos meus trabalhos, para mim teria sido muito difícil desfrutar tudo isto sem sua ajuda. No começo eu não tinha ideia de o que era um projeto de pesquisa, como escrever, não conhecia a parte microbiológica, tudo era novo para mim e com o decorrer do tempo as orientações, conselhos e ensinamentos de cada um de vocês fizeram com que eu pegasse um gosto muito grande pela pesquisa. Admiro muito o trabalho de vocês, sempre pesquisando e publicando, obrigado também por demonstrar a grande amizade dia a dia, gostei muito de compartilhar momentos tanto dentro quanto fora da faculdade. Admiro sua grande dedicação já que para mim são grandes profissionais assim como grandes atletas, sentirei muita falta de vocês.

Ao professor Renato de Toledo Leonardo, o primeiro professor brasileiro com o qual tive contato no México, o qual se tornou um grande amigo e irmão, sempre feliz, atencioso comigo, perguntando se fazia falta alguma coisa, dando dicas de o que fazer no Brasil, extraordinário senso de humor, me proporcionando material para trabalhar, me aconselhando. Eu e minha família, que tivemos o prazer de conhecê-lo, somos muito gratos a você. A minha admiração por ser tão trabalhador, sempre viajando, tentando levar a sua filosofia a muitos países do mundo e admiração também pelo ser humano e profissional que você é, um grande abraço para você e sua linda família.

Ao professor Idomeo Bonneti Filho, um grande pesquisador, uma pessoa que nunca vi bravo, todos os dias com um sorriso e de um bom humor, excelente clínico, sempre resolvendo meus problemas clínicos tanto na especialização assim como no mestrado, um prazer tê-lo conhecido junto com a sua esposa também antes de eu chegar ao Brasil.

Ao professor Fabio Luiz Camargo Vilella Berbert, que sempre esteve disposto para qualquer coisa, uma pessoa com a qual compartilhei momentos também fora da faculdade, jogando bola com você e seus filhos, agradeço também todos os ensinamentos dados na especialização e no mestrado, sendo parte importante da minha formação.

Aos professores Gisele Faria e Milton Carlos Kuga, sempre fazendo as minhas tardes felizes contando piadas e dando risadas nas suas salas. Foi um prazer ter convivido com vocês nestes 2 anos, professores pesquisadores de grande qualidade humana e humildade. Obrigado também pela amizade e ensinamentos.

Enfim, todos foram parte importante para eu poder chegar aqui o dia de hoje, nunca passou pela minha cabeça ser aluno de pessoas tão importantes internacionalmente na área de Endodontia, mas agora é uma realidade, fiz o mestrado junto aos maiores pesquisadores do mundo. Agradeço infinitamente por todos os conhecimentos, espero poder seguir seus passos pouco a pouco, e torço para que nossa amizade possa seguir para sempre. Espero-os novamente em Tijuana. Tenham a certeza de que os receberei com muito carinho.

Aos meus amigos

A Adriana Cabrera, minha amiga Mexicana, com a qual compartilhei 2 anos de amizade, não nos conhecíamos e conseguimos ter uma amizade muito grande. Mais do

que uma amizade considero-a uma irmã. Momentos de saudade sempre aconselhando, muitas saídas, viagens conhecendo o Brasil juntos, sempre era bom ter alguém em quem confiar e poder falar espanhol todos os dias. Obrigado, Adriana, por esta amizade.

Aos meus amigos de Mestrado, Adinael Trindade que foi parte importante, já que sem ele também teria sido difícil terminar meus experimentos, sempre me ajudando com os trabalhos, traduções e tempo, muito obrigado Adina. Tiago Fonseca, também outro dos meus tradutores e companheiro nas férias, a gente sempre ficava em Araraquara porque era meio longe voltar para nossas cidades. Obrigado pela ajuda em tudo e pelos momentos agradáveis. Gisselle Chávez, minha amiga Peruana, aquela com que eu podia falar em espanhol na salinha da endo, obrigado por estar sempre preocupada com meu bem-estar desde que cheguei, me ajudando também com meus trabalhos, e pela tua amizade, admiro você por estar tão longe do seu país por muito tempo e mesmo assim ser uma grande profissional e mãe ao mesmo tempo. Roberta Bosso, minha enciclopédia de MTA, obrigado por me ajudar nos trabalhos, qualquer dúvida que eu tinha de MTA você me respondia, eu sempre escutava todos falarem nas dissertações que há um anjo na endodontia, e é verdade você é uma pessoa muito gente boa, sempre com um sorriso e com vontade de ajudar a todos, obrigado pela amizade. Raqueli, uma pessoa que me surpreendeu muito no momento do seu intercâmbio, trabalhando muito, pesquisando muito, e até apresentando trabalhos em inglês na SBPqO, obrigado Raqueli pela amizade sua e do Fabio. Bernardo, sempre bom falar com você na sala da endo, fora da faculdade, trocar ideias, foi pouco tempo o que eu conheci você, mas pudemos fazer uma excelente amizade. Camila Espir e Leticia Mestieri, amigas da especialização e mestrado, sempre me ensinando palavras novas em português, compartilhando momentos de clínica, obrigado pelo carinho e amizade. Miriam Magro e Carol Venção, amigas muito boas da endo, sempre dando risada com

vocês, me divertindo, foi bom estudar com vocês e conhecê-las. Arielle Rabello, também uma pessoa muito gente boa, obrigado também pela ajuda nos meus trabalhos, e obrigado também pelos ensinamentos quando atendíamos pacientes juntos. Natalia Kalatzis, pessoa trabalhadora, a qual tive a oportunidade de trabalhar em conjunto por causa de Arturo quando eu cheguei, agradeço a sua amizade. Ana Livia e Elisandra, sempre trabalhadoras com as células, foi um prazer conhecer vocês, obrigado pela amizade. Camila Almeida, obrigado pela amizade e pelos momentos em que convivemos juntos. A todos meus outros colegas da endo, Paula, Carolina, Juliana, Guilherme, Alana, Katia, Kennia, agradeço também a vocês pelo convívio e carinho demonstrado neste tempo.

Bruna Batista, por sua amizade e carinho que fizeram estes últimos meses muito felizes e especiais. Jose Paulo de Pizzol, Jessica Hayakawa, Bruna Maitan, Jaquelyne Versiani, Kamila Figueiredo, Natalie Fernandes, Raphael Ferreira, Roberto Junior, Cassio Rocha, Vinicius Paiva, Vinicius Ibiapina sempre foi bom compartilhar momentos juntos fora da faculdade, obrigado por ser tão legais e demonstrarem sua amizade. Aos meus Parceiros Matheus Franco, Fausto Frizzera, meus amigos que simplesmente era dar uma ligada para poder se desestressar ou sair para se distrair um pouco.

Ao meu amigo Conrado Nogueira, que sem dúvida foi uma das melhores amizades que eu fiz aqui no Brasil, cada mês de especialização sempre tornando o ambiente mais legal, compartilhando clínica, falando de futebol, conhecendo novos amigos, me levando a conhecer Santos, conhecer sua família, conhecer o carnaval em Rio, foi muito bom tê-lo conhecido, obrigado por esta grande amizade e por fazer com que estes dois anos de mestrado e especialização fossem mais agradáveis e divertidos.

Professora Elaine Sgavioli, por sempre me receber com um sorriso, pelo afeto e as atenções recebidas por vc. Marinho, me ajudando sempre e com toda a disponibilidade na área do laboratório no 4º andar, na especialização e sobretudo pela amizade. Priscila, sempre marcando meus pacientes na especialização e no mestrado, obrigado pela paciência e amizade. Dona Cida, na área de clínica sempre me proporcionando todas as coisas que eu precisava, sempre com um sorriso. Creusa, obrigado por todos os favores que fazia para mim, pelo apoio e pela amizade em todo momento.

Ao Instituto Mexicano del Seguro Social, por dar-me a licença e as facilidades para estudar fora do meu país.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Mara, Alexandre, Sergio, Fábio, pela ajuda, paciência e simpatia.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado, pois sem ela teria sido mais difícil para mim e minha família concluir esta etapa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do meu mestrado.

Brasil, esse país tão lindo e maravilhoso, por ter me ensinado na minha estadia o carinho da tua gente, tua cultura, tua língua. Obrigado por fazer destes dois anos uma etapa inesquecível, incomparável... e a melhor da minha vida.

Vázquez-García FA. Avaliação de propriedades físico-químicas, mecânicas e antimicrobianas do MTA e Cimento portland associado a solução de nanopartículas de prata [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Resumo

A substituição do óxido de bismuto por óxido de zircônio (ZrO_2) e a adição de nanopartículas de prata (NPsAg) pode favorecer as propriedades físico-químicas mecânicas e antimicrobianas. **Capítulo 1:** Foram avaliados pH, solubilidade, tempo de presa, radiopacidade e resistência à compressão. Grupos: **G1** – MTA Angelus; **G2** – CP/ ZrO_2 ; **G3** – MTA/NPsAg; **G4** – CP/ ZrO_2 /NPsAg. O pH foi analisado em pHmetro digital, a solubilidade pela perda de massa e o tempo de presa pelo teste de Gilmore. A resistência à compressão foi avaliada em ensaio mecânico. Para análise da radiopacidade, as amostras foram radiografadas com uma escala de alumínio. Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). O G3 apresentou aumento de pH e diminuição da solubilidade e tempo do presa inicial e final. O G4 apresentou diminuição da solubilidade e aumento da resistência à compressão. A radiopacidade dos materiais foi superior a 4 mmAl. As associações G3 e G4 apresentam propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas. **Capítulo 2:** Bactérias na forma planctônica foram colocadas sobre o cimento fresco e a análise foi realizada em espectrofotômetro. Na avaliação antibiofilme, os materiais foram colocados em contato com biofilme de *E. faecalis* formado sobre blocos de dentina e analisados pela contagem de unidades formadoras de colônia. Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Na forma planctônica, melhores resultados foram encontrados no G2 e G4. Maior redução de biofilme foi apresentada pelos G3 e G4. A incorporação de NPsAg ao CP e MTA, melhora a atividade antibacteriana e antibiofilme dos materiais à base de silicato de cálcio.

Palavras Chave: Nanopartículas metálicas, Materiais dentários, Propriedades físicas, Endodontia

Vázquez-García FA. Evaluation of physico-chemical, mechanical and antimicrobial properties of MTA and Portland cement associated with silver nanoparticles solution [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Abstract

The bismuth oxide replacement by zirconium oxide (ZrO_2) and the addition of silver nanoparticles may improve the physicochemical, mechanic and antimicrobial properties.

Chapter I: It was evaluated pH, solubility, setting time, radiopacity and compressive strength. Groups: **G1**-MTA Angelus; **G2**-PC/ ZrO_2 , **G3**-MTA/NPsAg, **G4**-PC/ ZrO_2 /NPsAg. The pH was measured with a digital pH meter, the solubility by the weight loss and the setting time was evaluated by Gilmore needle. Compressive strength was tested in universal testing machine. For radiopacity analysis material samples were radiographed alongside an aluminium step-wedge. The results were submitted to ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). The G3 showed a pH increase and a decrease of solubility and initial and final setting time. The G4 showed a decrease in solubility and an increase of compressive strength. All materials presented radiopacity greater than 4 mmAl. The G3 and G4 associations showed good physicochemical and mechanical properties. **Chapter 2:** For the first test bacterias in planktonic form were placed over fresh cement, and the analysis was performed in spectrophotometer. Also for the antibiofilm test, the samples were placed in direct contact with *E. faecalis* biofilm previously induced on bovine dentine and analysed by the counting of colony-forming units. The results were submitted to ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). On the planktonic form, the best results were showed by G2 and G4. The greater reduction of biofilm were showed by G3 and G4. The incorporation of NPsAg to PC and MTA improves the antibacterial and antibiofilm activity of calcium silicate cements.

Keywords: Metal nanoparticles, Dental materials, Physical properties, Endodontics

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 CAPÍTULO 1 Propriedades físico-químicas e mecânicas do mta e cimento portland associado a óxido de zircônio e nanopartículas de prata.....	17
3 CAPITULO 2 Efeito da adição de nanopartículas de prata na propriedade antimicrobiana do mta e cimento portland associado ao óxido de zircônio.....	37
4 DISCUSSÃO.....	54
5 CONCLUSÃO.....	58
6 REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O Mineral de Trióxido Agregado (MTA) foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Califórnia, USA) (Torabinejad et al.³⁶, 1995), sendo composto por Cimento Portland (CP) associado ao radiopacificador Óxido de Bismuto (Bi_2O_3) (Camilleri et al.¹⁰, 2005). MTA é um pó composto de partículas hidrofílicas que toma presa na presença de umidade (Torabinejad et al.³⁶, 1995). A hidratação do pó resulta em um gel coloidal que se converte em estrutura sólida (Torabinejad et al.³⁵, 1999).

MTA apresenta um pH de 12.5 após presa, similar ao hidróxido de cálcio (Torabinejad et al.³⁶, 1995). A baixa solubilidade (Torabinejad et al.³⁶, 1995) e uma radiopacidade superior à da dentina radicular (Shah et al.³², 1996) foram demonstradas. O MTA foi desenvolvido inicialmente para o selamento de perfurações e obturação retrógrada (Camilleri et al.⁸, 2013). O MTA branco (Dentsply Endodontics, Tulsa, OK, USA) foi introduzido visando melhor propriedade estética (Torabinejad et al.³⁸, 1995).

A biocompatibilidade do CP foi avaliada por meio de implantes subcutâneos (Holland et al.²¹, 2001), em células humanas (Saidon et al.³⁰, 2003), e em procedimentos de capeamento pulpar direto (Holland et al.²⁰, 2001), com resultados similares aos apresentados pelo MTA.

A avaliação do efeito do MTA sobre bactérias anaeróbicas facultativas e estritas mostrou que o MTA tem um efeito antibacteriano sobre algumas bactérias facultativas, porém não demonstrou efeitos sobre as espécies anaeróbias estritas (Torabinejad et al.³⁷, 1995).

A principal diferença entre o CP e o MTA é a presença de óxido de bismuto (Camilleri et al.⁹, 2005). No entanto, foi observado que a adição do Bi_2O_3 como

radiopacificador ao MTA reduz a liberação de íons de cálcio, aumenta a solubilidade e causa deterioração da estabilidade dimensional do material (Camilleri et al.⁷, 2011).

Novos radiopacificadores têm sido avaliados como alternativas ao Bi_2O_3 , como o óxido de zircônio (ZrO_2) que incorporado ao CP resulta em cimentos com radiopacidade superior à da dentina (Hungaro Duarte et al.²², 2009) e acima do valor mínimo recomendado pela especificação 57 da ANSI/ADA. Além disso, Gomes Cornélio et al.¹⁸ (2011) mostraram que esta associação não é citotóxica.

Nanotecnologia é um novo campo da ciência com aplicação em diversas disciplinas como a nanomedicina (Bhattacharyya et al.⁴, 2009). Nanopartículas de prata (NPsAg) são descritas como não citotóxicas e são efetivas sobre bactérias, vírus e outros microrganismos eucarióticos, sem efeitos colaterais (Jeong, Yi²⁴, 2005). O efeito bactericida das nanopartículas de prata depende do seu tamanho, sendo que as que apresentam maior ação antimicrobiana apresentam um diâmetro de 1-10nm (Morones et al.²⁷, 2005). Nanopartículas de prata se aderem à superfície da célula, alteram as propriedades físicas e químicas da membrana e parede celular, e produzem importantes distúrbios nas funções tais como a permeabilidade, osmose, transporte de elétrons e respiração celular (Sondi et al.³³, 2004).

Fujieda et al.¹⁷ (2013) incorporaram as nanopartículas de prata à porcelana dental, e os resultados mostraram que aumentou a dureza e maior resistência à fratura. As nanopartículas de prata também foram incorporadas ao ionômero de vidro (Swift³⁴, 1986) melhorando a sua propriedade de adesão à dentina.

Morones et al.²⁷ (2005) demonstraram que as nanopartículas de prata apresentam efeito bactericida sobre bactérias gram-negativas. Ahn et al.¹ (2009) demonstraram que a incorporação de nanopartículas de prata ao adesivo ortodôntico inibiu a adesão e

crescimento bacteriano nas superfícies onde foi aplicado e melhorou as propriedades físicas do adesivo.

Desta forma, parece oportuna a avaliação da influência nas propriedades físico-químicas, mecânicas e antimicrobianas da associação da solução de NPsAg ao MTA e CP.

2 CAPÍTULO 1

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS DO MTA E CIMENTO
PORTLAND ASSOCIADO A ÓXIDO DE ZIRCÔNIO E NANOPARTÍCULAS
DE PRATA.***

*Artigo será submetido para publicação no periódico International Endodontic Journal

Resumo

Objetivo: Avaliar propriedades físico-químicas, mecânicas da associação do MTA (Angelus) e do Cimento Portland (CP) com diferentes associações.

Metodologia: Os materiais avaliados foram: **G1** – MTA Branco (Angelus, Brasil); **G2** – CP 70% + ZrO₂ 30%; **G3** - MTA + NPsAg; **G4** – CP 70% + ZrO₂ 30% + NPsAg. O pH e a solubilidade foram avaliados após imersão das amostras em água destilada por 5 e 15 horas, após 2 e 7 dias de manipulação. O pH foi avaliado por meio de pHmetro digital e a solubilidade pela porcentagem da massa perdida. O tempo de presa foi analisado pelo teste padrão com agulha Gilmore. Para o teste de resistência a compressão, corpos-de-prova dos diferentes materiais foram submetidos ao teste mecânico. Para análise da radiopacidade foram realizadas radiografias juntamente com uma escala de alumínio (Al). Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey com 5% de significância.

Resultados: A adição de NPsAg ao MTA aumentou o pH e diminuiu a solubilidade e tempo de presa inicial e final do material. Para o CP/ZrO₂ a adição de de NPsAg manteve o pH, diminuiu a solubilidade e aumentou tempo de presa e resistência à compressão do material. A radiopacidade de todos os materiais foi maior a 4 mm de Al.

Conclusão: A associação de nanopartículas de prata ao MTA e ao CP/Óxido de zircônio favorece as propriedades físico-químicas e mecânicas dos materiais. Estudos adicionais de biocompatibilidade e atividade antimicrobiana são necessários.

Palavras-Chave: Endodontia, Materiais Dentários, Propriedades Físicas.

Introdução

Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um pó composto de partículas hidrofílicas que tomam presa na presença de umidade (Torabinejad *et al.* 1995). MTA consiste de Cimento Portland acrescido do radiopacificador óxido de bismuto (Al-Hezaimi *et al.* 2009). O MTA branco apresenta tamanho de partículas menores que o MTA cinza, sendo atualmente o mais indicado (Duarte *et al.* 2003). Apesar da ampla indicação, o MTA apresenta algumas desvantagens como prolongado tempo de presa, dificuldade de manipulação, e limitada ação antimicrobiana (Camilleri 2009).

Vários estudos têm demonstrado que as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas do MTA e Cimento Portland (CP) são semelhantes (Estrela *et al.* 2000, Islam *et al.* 2006). O uso do CP é sugerido como alternativa ao MTA (Tanomaru-Filho *et al.* 2012). O Bi_2O_3 é adicionado ao CP no MTA para proporcionar radiopacidade (Al-Hezaimi *et al.* 2009). No entanto, a adição deste elemento causa mudanças nas propriedades físico-químicas e mecânicas do cimento, como força de compressão, pH, solubilidade e tempo de presa (Coomaraswamy *et al.* 2007).

O óxido de zircônio (ZrO_2) tem sido proposto como alternativa ao Bi_2O_3 , demonstrando não ser citotóxico (Gomes Cornelio *et al.* 2011), e promovendo radiopacidade acima do valor mínimo recomendado pela especificação 57 da ANSI/ADA (Weckwerth *et al.* 2012). O material retro-obturador ideal deve promover regeneração dos tecidos perirradiculares, ser dimensionalmente estável, não ser reabsorvível, ter radiopacidade e apresentar ação antimicrobiana (Torabinejad *et al.* 1995).

A nanotecnologia possibilita a prevenção e combate de doenças utilizando materiais de escala nanométrica. Entre os nanomateriais com propriedades

antibacterianas estão as nanopartículas metálicas, que mostram uma elevada atividade devido a sua ampla área superficial, alta eficácia antibacteriana (Morones *et al.* 2005) e baixa toxicidade em humanos (Foldbjerg *et al.* 2009, Oukarroum *et al.* 2012). As nanopartículas de prata (NPsAg) têm sido estudadas em varias aplicações odontológicas como material restaurador dentário (Jia H 2008), cimento retro-obturador (Pissiotis & Spangberg 2000) e implantes dentários (Sheikh *et al.* 2010). A alta eficiência antibacteriana das NPsAg ocorre devido à capacidade de destruição da membrana e passagem através do corpo microbiano danificando a estrutura intracelular (You *et al.* 2012).

A prata tem sido incorporada nos cimentos de ionômero de vidro para melhorar a resistência à compressão, e tensão (Swift 1986). Partículas de prata também são utilizadas como radiopacificadores alternativos para obtenção de radiopacidade necessária nos cimentos de silicato de cálcio e avaliar a pureza dos agentes radiopacificadores (Camilleri & Gandolfi 2010). Samiei *et al.* (2013) avaliaram a efetividade antibacteriana do MTA Angelus misturado com 1% de NPsAg contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Candida albicans* e os resultados mostraram que a associação de MTA/NPsAg aumentou o efeito antibacteriano.

Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar propriedades físico-químicas e mecânicas das associações de MTA e CP/ZrO₂ com solução de nanopartículas de prata.

Material e métodos

Os materiais experimentais e proporção pó-líquido utilizada estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais, respectiva procedência, e proporção pó-líquido

Grupo	Material	Proporção Pó (g)/ Líquido (μ L)
1. MTA/Água	MTA Angelus (MTA) + Água destilada	1/330
2. CP/ZrO ₂ /Água	CP 70% +ZrO ₂ 30% + Água Destilada	1/330
3. MTA/NPsAg	MTA + NPsAg (53 mg/L)	1/440
4. CP/ZrO ₂ /NPsAg	PC 70% + ZrO ₂ 30% + NPsAg (53 mg/L)	1/330

MTA: Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil

CP: Cimento Portland: CP - CPB-40 estrutural Votoran, Votorantin cimentos, Camargo Correa Cimentos S.A., Pedro Leopoldo, MG)

ZrO₂: Óxido de Zircônio: Sigma AldrichCorp. St. Louis, MO, Estados Unidos da América

NPsAg: Instituto de Física de São Carlos-USP

Nanopartículas de prata foram sintetizadas pela redução de nitrato de prata (AgNO₃) com o polímero poli vinil álcool (PVA) como estabilizante químico. Partículas de 5-10nm de tamanho foram obtidas e a concentração da solução foi de 53 mg/L.

Radiopacidade

A análise da radiopacidade (n=6) foi realizada segundo Tanomaru-Filho *et al.* (2007). Foram utilizados moldes com dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm altura, sendo confeccionados 6 espécimes para cada material. Após a manipulação, os materiais foram colocados nos moldes, que permaneceram a 37°C e 100% de umidade, por 48 horas. Após esse período, um corpo-de-prova de cada material e uma escala de alumínio, com variação de 2 a 16 mm em espessura, foram posicionados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) e foram radiografados. As radiografias foram realizadas em aparelho de raios-X GE 1000 (General Electric, Milwaukee, WI) operando a 60 kV, 7 mA e 18 pulsos por segundo, com distância focal de 30 cm. Os filmes foram processados com solução nova em reveladora automática, digitalizados e avaliados usando o programa ImageJ, onde foram selecionadas as áreas de cada degrau da escala de alumínio e dos cimentos para determinar a equivalência da radiopacidade dos cimentos em milímetros de alumínio, de maneira similar à realizada por (Vivan *et al.* 2009), usando a seguinte equação:

$$\frac{A \times 2}{B} = \text{mm Al imediatamente anterior DRM}$$

Onde A = densidade radiográfica do material (DRM) – densidade radiográfica do incremento de alumínio imediatamente anterior a DRM;

B = densidade radiográfica do incremento de alumínio imediatamente posterior a DRM - densidade radiográfica do incremento de alumínio imediatamente anterior a DRM;

2 = 2 mm de incremento da escala de alumínio.

Tempo de presa

Para determinar o tempo de presa (n=10) foram utilizados anéis metálicos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura, sendo confeccionados 6 espécimes para cada material. Antes de iniciar os testes, os moldes foram mantidos na estufa a 37°C por 24 horas. A avaliação do tempo de presa seguiu a metodologia adotada por (Bortoluzzi *et al.* 2008), com medições a cada 3 minutos durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e a cada 15 minutos desse período em diante. Ao atingir a presa inicial as medições continuaram sendo realizadas até a presa final. Para determinar a presa inicial foi utilizada agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm apoiada sobre a superfície do cimento. Os materiais foram mantidos na estufa durante a análise e a agulha foi limpa entre os ensaios. Para determinar a presa final, após o período de presa inicial, repetiu-se o mesmo procedimento usando a agulha de Gilmore de $456 \pm 0,5$ g de massa e $1 \pm 0,1$ mm de diâmetro na ponta. Os tempos de presa foram determinados como a média de tempo entre a manipulação e o tempo demorado para que cada agulha não produzisse marcas nos cimentos.

Resistência à compressão

Para o teste de resistência à compressão, os corpos-de-prova (n=6) foram confeccionados de acordo com Islam *et al.* (2006). Os cimentos foram colocados dentro de um molde de teflon com forma cilíndrica com 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro. O conjunto foi mantido na estufa por 3 horas, quando as amostras foram removidas do molde e a superfície plana de cada amostra foi delicadamente lixada com uma lixa de papel de granulometria 600. As amostras permaneceram na estufa (37°C e 100% umidade) até o período de 24 horas ou 21 dias, quando foram submetidas ao teste

de compressão em uma máquina de ensaios Emic DL 2000 (Emic Equipamentos e Sistemas de Ensaio, São José dos Pinhais – PR, Brasil) com célula de carga de 5 kN a uma velocidade de 0,5 mm/minuto. A tensão máxima suportada em N/mm^2 foi calculada (N/mm^2) usando a força máxima suportada e o diâmetro dos cilindros ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/1 m}^2$).

pH

O teste de pH (n=10) foi realizado segundo Faria-Junior *et al.* (2013), onde amostras com dimensões de 7 mm de diâmetro e 1 mm de altura foram confeccionados, tendo o valor do pH avaliados 2 e 7 dias após a o tempo de presa. Os discos foram imersos em frascos plásticos contendo 10 mL de água deionizada cujo pH foi aferido previamente (6,5). Os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 37°C. As mensurações de pH foram realizadas após 5 h e 15 h da imersão dos discos com o pHmetro previamente calibrado. Após cada mensuração, que foram feitas em triplicata, a média do pH de cada grupo em cada período experimental foi calculada.

Solubilidade

Também de acordo com Faria-Junior *et al.* (2013), a confecção dos discos (n=10) para cada período, foi semelhante à utilizada no teste de pH, diferenciado pela colocação em uma das extremidades de um pedaço de 5 cm de fio dental no cimento durante a inserção do material no molde. Decorridos os períodos pós-manipulação de 2 e 7 dias, as amostras foram removidas da matriz e após a remoção dos resíduos ou partículas soltas, foram colocadas em um dessecador com sílica. Após uma hora, os

discos juntamente com o fio dental foram pesados em balança de precisão modelo BL 210S para a obtenção da massa inicial.

Cada um dos espécimes foi suspenso pelo fio dental e colocado no interior de um recipiente plástico contendo 10 mL de água deionizada, não permitindo qualquer contato entre a amostra e a superfície interna do recipiente. As amostras foram mantidas em estufa a 37°C, permanecendo por 15 h. Após esse período, os cimentos foram retirados dos recipientes e enxaguados com água destilada e deionizada.

O excesso de água foi removido com auxílio de papel absorvente. As amostras foram colocadas em um dessecador com sílica por 24 h para realização de nova pesagem para obtenção da massa final. A estabilização da massa de cada amostra foi constatada após um novo ciclo de 24 h no dessecador com sílica. Foram utilizados 10 discos de cada cimento para cada um dos dois períodos pós-manipulação. A solubilidade dos cimentos correspondeu à perda de massa identificada pela massa de cada amostra, expressa como porcentagem da massa original.

Para todos os testes, os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade, e posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA e ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com 5% de significância.

Resultados

Radiopacidade

A maior radiopacidade foi apresentada pelo grupo do MTA com água, sendo estatisticamente igual quando comparado aos grupos de CP/ZrO₂ e MTA/NPsAg, e a menor radiopacidade foi apresentado pelo grupo de CP/ZrO₂/NPsAg, conforme tabela 4.

Tabela 4. Valores médios (mm Al) e desvio-padrão dos diferentes cimentos referentes à radiopacidade

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	MTA/ NPsAg	CP/ZrO ₂ / NPsAg
Radiopacidade (mm Al)	4,841 ^a	4,749 ^a	4,464 ^{ac}	4,195 ^{bc}
Desvio Padrão	(± 0,2624)	(± 0,2814)	(± 0,3478)	(± 0,3503)

Letras iguais indicam semelhança estatística (p>0,05).

Tempo de presa

O menor tempo de presa inicial e final foi apresentado pelo grupo de MTA/NPsAg sendo estatisticamente diferentes aos demais grupos, e o maior tempo foi apresentado pelo grupo de CP/ZrO₂/NPsAg, conforme tabela 5.

Tabela 5. Valores médios (minutos) e desvio-padrão dos diferentes cimentos para tempo de presa inicial e final

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	MTA/NPsAg	CP/ ZrO ₂ /NPsAg
Tempo de Presa Inicial	25,17 ^b	43,17 ^c	21,67 ^a	90,67 ^d
Desvio Padrão	(± 2,639)	(± 2,401)	(± 1,033)	(± 1,862)
Tempo de Presa Final	171 ^c	150,3 ^b	134,8 ^a	191,7 ^d
Desvio Padrão	(± 1,789)	(± 1,751)	(± 1,722)	(± 1,751)

Letras iguais na mesma linha indicam semelhança estatística (p>0,05).

Resistência á compressão

No teste de 24 horas e 21 dias, a adição de NPsAg ao CP/ZrO₂ aumentou a resistência à compressão, sendo estatisticamente diferente quando comparado aos outros grupos. MTA e o MTA/NPsAg foram estatisticamente semelhantes nos dois períodos, conforme Tabela 6.

Tabela 6. Valores médios (MPa) e desvio-padrão dos diferentes cimentos para resistência a compressão após 24 horas e 21 dias

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	MTA/NPsAg	CP/ZrO ₂ /NPsAg
Resistência 24h	17,13 ^c	27,80 ^b	15,29 ^c	34,84 ^a
Desvio Padrão	(± 3,123)	(± 5,117)	(± 2,611)	(± 5,460)
Resistência 21d	32,01 ^{b,c}	23,18 ^c	34,36 ^b	56,46 ^a
Desvio Padrão	(± 6,003)	(± 2,289)	(± 5,271)	(± 9,611)

Letras iguais na mesma linha indicam semelhança estatística (p>0,05).

pH

Nos períodos de 2 e 7 dias o grupo de MTA/NPsAg apresentou o maior pH, sendo estatisticamente diferente quando comparado aos outros grupos, o grupo de MTA com água apresentou o menor pH nos 2 períodos, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios (pH) e desvio-padrão dos diferentes cimentos para pH após 2 e 7 dias, 5 e 15 horas

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	MTA/ NPsAg	CP/ ZrO ₂ / NPsAg
2 Dias	5 horas	10,79 ^c	11,21 ^a	11,15 ^a
	Desvio Padrão	(± 0,08790)	(± 0,1329)	(± 0,06736)
2 Dias	15 horas	10,99 ^c	11,31 ^b	11,47 ^a
	Desvio Padrão	(± 0,07739)	(± 0,08990)	(± 0,08042)
7 Dias	5 horas	10,83 ^b	10,59 ^c	11,05 ^a
	Desvio Padrão	(± 0,1638)	(± 0,1151)	(± 0,1886)
7 Dias	15 horas	10,91 ^c	10,90 ^c	11,40 ^a
	Desvio Padrão	(± 0,1641)	(± 0,08923)	(± 0,1454)

Letras iguais na mesma linha indicam semelhança estatística (p>0,05).

Solubilidade

No período de 2 e 7 dias os grupos de MTA/NPsAg e CP/ZrO₂/NPsAg apresentaram a menor solubilidade sendo estatisticamente semelhantes entre si, e a maior solubilidade foi apresentado pelos grupos de MTA e CP/ZrO₂, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios (%) e desvio-padrão da perda de massa dos diferentes cimentos para solubilidade nos períodos de 2 e 7, após 15 horas de imersão

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	MTA/ NPsAg	CP/ZrO ₂ /NPsAg
Solubilidade 2 Dias	3,675 ^b	3,551 ^b	1,855 ^a	1,264 ^a
Desvio Padrão	(± 0,8546)	(± 0,5959)	(± 0,6308)	(± 0,4090)
Solubilidade 7 Dias	5,036 ^b	5,692 ^b	2,389 ^a	1,531 ^a
Desvio Padrão	(± 2,786)	(± 1,367)	(± 0,3914)	(± 0,6695)

Letras iguais na mesma linha indicam semelhança estatística ($p > 0,05$).

Discussão

Vários estudos buscam a melhora da ação antimicrobiana e das propriedades físico-químicas do MTA pela adição de substâncias como a clorexidina em diferentes concentrações (Mittag *et al.* 2012), e hipoclorito de sódio (NaOCl) (Kogan *et al.* 2006). No entanto, a adição destes elementos pode afetar as propriedades físico-químicas e mecânicas do material (Kogan *et al.* 2006).

O MTA apresenta na composição óxido de bismuto (Bi_2O_3) adicionado para promover radiopacidade (Al-Hezaimi *et al.* 2009). Dentre os radiopacificadores alternativos para o MTA destaca-se o óxido de zircônio (Gomes Cornelio *et al.* 2011). No presente estudo, a adição de NPsAg ao MTA e CP não promoveu aumento da radiopacidade. Mas, todos os materiais apresentaram radiopacidade adequada de acordo com a norma ISO 6876 que indica que os materiais endodônticos devem apresentar radiopacidade superior a 3 mm de alumínio.

Uma desvantagem do MTA é o longo tempo de presa, que pode promover maior solubilidade do cimento (Lee *et al.* 2004). Os tempos de presa inicial e final do MTA de 25 min e 171 min respectivamente estão de acordo com estudos anteriores (Torabinejad *et al.* 1995, Chng *et al.* 2005).

No presente estudo, o MTA/NPsAg apresentou menor tempo de presa quando comparado aos demais grupos, o que pode representar uma vantagem da associação. Uma possível explicação seria a capacidade de penetração das nanopartículas de prata (5-10nm) nos poros do cimento acelerando a hidratação dos silicatos e reduzindo o tempo de presa (Popovich 1979, Ramachandran. 1984). O MTA Angelus não apresenta sulfato de cálcio em sua composição, o que resulta em menor tempo de presa (Oliveira *et al.* 2007). Para o grupo de CP/ ZrO_2 ocorreu aumento do tempo de presa do material

quando associado às nanopartículas de prata. Também tem sido demonstrado que a adição de agentes radiopacificadores aumenta o tempo de presa dos materiais por interferirem no mecanismo de hidratação do CP, retardando a formação de uma matriz (Camilleri 2010).

O MTA e o CP são ricos em óxido de cálcio, que em contato com tecidos ou água se transformam em hidróxido de cálcio. A sua dissociação em íons hidroxila e íons cálcio resultam em aumento de pH e liberação de íons cálcio (Duarte *et al.* 2003). O pH alcalino e a liberação de íons cálcio estão relacionados com a bioatividade do MTA (Gandolfi *et al.* 2010). Camilleri *et al.* (2011) demonstram que a hidratação do CP acrescido de 30% de ZrO_2 resulta em aumento do pH e liberação de íons cálcio. Os quatro materiais exibiram um pH alcalino, concordando com outros estudos (Duarte *et al.* 2003, Santos *et al.* 2005) que reportam pH de 10-12.

Solubilidade é um fator importante para materiais retro-obturadores (Torabinejad *et al.* 1995). MTA e CP/ ZrO_2 apresentaram resultados similares quanto a solubilidade concordando com Camilleri *et al.* (2011). O MTA/NPsAg e CP/ ZrO_2 /NPsAg apresentaram menor solubilidade em relação aos demais grupos. Este fato pode estar relacionado à formação de matriz porosa quando o MTA é manipulado com água (Fridland & Rosado 2003). Quando manipulado com a solução de nanopartículas, menor porosidade pode ter ocorrido em função da penetração das nanopartículas de prata (de Moura *et al.* 2013), sugerindo que as nanopartículas de prata tiveram uma interferência positiva no processo de hidratação dos cimentos, diminuindo a porosidade e conseqüentemente a solubilidade. Ainda, a incorporação de ZrO_2 proporciona menor solubilidade para o material (Weckwerth *et al.* 2012).

Vários fatores afetam os testes mecânicos do CP (Camilleri *et al.* 2006). Estes fatores incluem a proporção água/cimento, a forma e tamanho do corpo-de-prova e preparo final do espécime. A proporção água/liquido é um dos parâmetros que afetam a dureza do CP (Fridland & Rosado 2003). A quantidade de solução utilizada para o MTA/NPsAg foi maior do que a utilizada para o material sem prata conforme a Tabela 2. Contudo, o material apresentou menor solubilidade do que relatado por Friedland & Rosado (2003) que reportam maior solubilidade e porosidade quando o material é manipulado com mais líquido.

Os valores de resistência à compressão não são críticos para os materiais retro-obturadores, já que eles não são submetidos a grandes cargas oclusais (Abdullah *et al.* 2002). O aumento da resistência com o passar do tempo indica que o material continua a reação de presa e aumentando a sua resistência e estabilidade (Islam *et al.* 2006). A resistência à compressão do MTA é afetada por vários fatores entre eles o tipo de MTA (Islam *et al.* 2006) e a solução utilizada (Holt *et al.* 2007).

A resistência à compressão apresentada pelo MTA foi menor do que as apresentadas pelo CP/ZrO₂ às 24 horas e maior aos 21 dias concordando com Islam *et al.* (2006). MTA/Água e MTA/NPsAg apresentaram resistência à compressão similar. No entanto, a resistência à compressão foi maior para o CP/ZrO₂/NPsAg, possivelmente pela menor porosidade do material quando manipulado em solução de nanopartículas (de Moura *et al.* 2013). A menor quantidade de solução de prata necessária para manipulação do CP/ZrO₂/NPsAg também pode contribuir com a menor solubilidade, porosidade e resistência (Fridland & Rosado 2003).

De todas as associações testadas neste experimento os melhores resultados foram apresentados pelo grupo de MTA/NPsAg, já que apresentou os maiores valores de pH, redução significativa de solubilidade, radiopacidade adequada, tempo de presa menor e uma resistência a compressão aceitável para um material retro-obturador.

A associação CP/ZrO₂/NPsAg apresentou um pH alcalino variando de 10,73 a 11,27, radiopacidade adequada, baixa solubilidade, uma alta resistência à compressão quando comparado ao grupo de MTA/Água. A única desvantagem foi o aumento no tempo de presa. A adição de aceleradores de presa pode ser sugerida para melhora desta propriedade.

Conclusão

A associação de nanopartículas de prata com MTA e CP/ZrO₂ favorece as propriedades físico-químicas e mecânicas dos materiais. Estudos adicionais de biocompatibilidade e atividade antimicrobiana são necessários.

Referências

- Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F (2002) An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* **23**, 4001-4010.
- Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Simon JH, Rotstein I (2009) MTA preparations from different origins may vary in their antimicrobial activity. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **107**, e85-88.
- Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM *et al.* (2008) Mineral Trioxide Aggregate with or without Calcium Chloride in Pulpotomy. *Journal of endodontics* **34**, 172-175.
- Camilleri J (2009) Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *Journal of endodontics* **35**, 1412-1417.
- Camilleri J (2010) Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *International endodontic journal* **43**, 231-240.
- Camilleri J, Cutajar A, Mallia B (2011) Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **27**, 845-854.
- Camilleri J, Gandolfi MG (2010) Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *International endodontic journal* **43**, 21-30.
- Camilleri J, Montesin FE, Curtis RV, Ford TR (2006) Characterization of Portland cement for use as a dental restorative material. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **22**, 569-575.
- Chng HK, Islam I, Yap AU, Tong YW, Koh ET (2005) Properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics* **31**, 665-668.
- Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP (2007) Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *Journal of endodontics* **33**, 295-298.
- de Moura MR, Aouada FA, Mattoso LH, Zucolotto V (2013) Hybrid nanocomposites containing carboxymethylcellulose and silver nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **13**, 1946-1950.
- Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C (2003) pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **95**, 345-347.
- Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD (2000) Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Brazilian dental journal* **11**, 3-9.
- Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *International endodontic journal* **46**, 755-762.
- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H (2009) PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology letters* **190**, 156-162.
- Fridland M, Rosado R (2003) Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *Journal of endodontics* **29**, 814-817.
- Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C (2010) Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *International endodontic journal* **43**, 917-929.

- Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *Journal of endodontics* **37**, 203-210.
- Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE (2007) The antimicrobial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *Journal of endodontics* **33**, 844-847.
- Islam I, Chng HK, Yap AU (2006) Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *Journal of endodontics* **32**, 193-197.
- Jia H HW, Wei L (2008) The structures and antibacterial properties of nano-SiO₂ supported silver/zinc-silver materials. *Dental Materials* **24**, 244-249.
- Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I (2006) The effects of various additives on setting properties of MTA. *Journal of endodontics* **32**, 569-572.
- Lee YL, Lee BS, Lin FH, Yun Lin A, Lan WH, Lin CP (2004) Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* **25**, 787-793.
- Mittag SG, Eissner C, Zabel L, Wrbas KT, Kielbassa AM (2012) The influence of chlorhexidine on the antibacterial effects of MTA. *Quintessence international* **43**, 901-906.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A *et al.* (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346-2353.
- Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH (2007) Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Brazilian dental journal* **18**, 3-7.
- Oukarroum A, Bras S, Perreault F, Popovic R (2012) Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and environmental safety* **78**, 80-85.
- Pissiotis E, Spangberg L (2000) Reaction of bony tissue to implanted silver glass ionomer and a reinforced zinc oxide-eugenol cement. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **89**, 623-629.
- Popovich (1979) Concrete making. *Washington: McGraw-Hill Book Company*.
- Ramachandran. (1984) Concrete admixtures handbook. *New Jersey: Noyes Publications*.
- Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM (2013) Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iranian endodontic journal* **8**, 166-170.
- Santos AD, Moraes JC, Araujo EB, Yukimitu K, Valerio Filho WV (2005) Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. *International endodontic journal* **38**, 443-447.
- Sheikh FA, Barakat NA, Kanjwal MA *et al.* (2010) Electrospun titanium dioxide nanofibers containing hydroxyapatite and silver nanoparticles as future implant materials. *Journal of materials science. Materials in medicine* **21**, 2551-2559.
- Swift EJ, Jr. (1986) Glass ionomers: a review for the clinical dentist. *General dentistry* **34**, 468-471.
- Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Guerreiro Tanomaru JM, Goncalves M (2007) Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *Journal of endodontics* **33**, 249-251.
- Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF *et al.* (2012) Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN dentistry* **2012**, 898051.

- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics* **21**, 349-353.
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD (1995) Antibacterial effects of some root end filling materials. *Journal of endodontics* **21**, 403-406.
- Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM *et al.* (2009) Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **108**, e35-38.
- Weckwerth PH, Machado AC, Kuga MC, Vivan RR, Polleto Rda S, Duarte MA (2012) Influence of radiopacifying agents on the solubility, pH and antimicrobial activity of portland cement. *Brazilian dental journal* **23**, 515-520.
- You C, Han C, Wang X *et al.* (2012) The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. *Molecular biology reports* **39**, 9193-9201.

3 CAPITULO 2

EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DO MTA E CIMENTO PORTLAND ASSOCIADO AO ÓXIDO DE ZIRCÔNIO.*

*Artigo será submetido para publicação no periódico International Endodontic Journal

Resumo

Objetivo: O presente estudo visa avaliar as propriedades antimicrobianas do MTA e da associação CP/ZrO₂ manipulados com água destilada ou com solução de NPsAg:

Metodologia: Os materiais avaliados foram: **G1** – MTA Branco (Angelus); **G2** – CP/ZrO₂; **G3** - MTA + NPsAg; **G4** – CP/ZrO₂ + NPsAg. A avaliação antimicrobiana foi realizada por meio de testes de contato direto sobre células planctônicas e sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* induzido por 15 dias sobre dentina bovina. A avaliação sobre células planctônicas foi realizada utilizando o cimento fresco e o tempo de contato de 5 e 15 horas. A turbidez do meio foi analisada em espectrofotômetro (DO₆₀₀). O teste sobre biofilme foi realizado após tempo de presa de 2 dias e contato com o biofilme por 5 e 15h, utilizando técnica de plaqueamento e contagem de unidade formadora de colônias (UFC/mL). Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey com 5% de significância.

Resultados: Na avaliação do cimento fresco nos períodos de 5 e 15h de contato, todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao controle com exceção do grupo de MTA/Água no período de 5 h. Na avaliação antibiofilme, todos os materiais demonstraram ação contra biofilme de *E. faecalis*, com exceção do grupo de MTA/Água no período de 5 horas. Maior ação antibiofilme foi observada para os materiais com NPsAg após 15h de contato.

Conclusão: A incorporação de NPsAg ao CP e MTA promove aumento da atividade antibacteriana e antibiofilme dos cimentos de silicato de cálcio.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, MTA, *Enterococcus faecalis*, biofilme, contato direto.

Introdução

O material ideal para selamento de perfurações e obturação retrógrada deve apresentar radiopacidade, ação bactericida ou bacteriostática, promover selamento e estabilidade dimensional, e ser biocompatível (Torabinejad *et al.* 1995, Torabinejad & Chivian 1999). Dentre os materiais atualmente utilizados destaca-se o Mineral Trióxido Agregado (MTA), desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Califórnia, USA) por Torabinejad *et al.* (1993) (Coomaraswamy *et al.* 2007).

MTA é um cimento à base de silicato de cálcio composto de partículas hidrofílicas que na presença de umidade resulta em um gel coloidal que se converte em estrutura sólida (Schwartz *et al.* 1999). O cimento Portland (CP) composto por silicato dicálcico, silicato tricálcico, aluminato tricálcico e aluminoferrite tetracálcico é o principal componente do MTA (Torabinejad *et al.* 1995). O óxido de bismuto promove radiopacidade ao MTA, mas causa mudanças nas propriedades físico-químicas e mecânicas do cimento (Coomaraswamy *et al.* 2007). O óxido de zircônio (ZrO₂) tem sido indicado como radiopacificador alternativo, visando aperfeiçoar as propriedades físico-químicas e biológicas do MTA (Camilleri *et al.* 2011, Gomes Cornelio *et al.* 2011).

O MTA apresenta mecanismo similar ao do hidróxido de cálcio na propriedade antimicrobiana (Torabinejad *et al.* 1995). No entanto, Torabinejad *et al.* (1995), observaram que o MTA foi efetivo contra alguns micro-organismos facultativos, mas não contra outras cepas bacterianas, incluindo *Enterococcus faecalis*. Estrela *et al.* (2000) também não detectaram nenhum efeito inibidor do MTA sobre *E. faecalis*. A prata (Ag) tem sido incorporada a vários materiais dentais como resinas acrílicas (Acosta-Torres *et al.* 2012) e adesivos ortodônticos (Ahn *et al.* 2009), visando

melhorar as propriedades antibacterianas e antifúngicas dos materiais, e apresenta bons resultados.

Nas últimas décadas, a nanotecnologia tem sido incorporada a várias aplicações biomédicas (Khan *et al.* 2013). As nanopartículas de prata (NPsAg) são reconhecidas como agentes antimicrobianos (Rai *et al.* 2009). NPsAg são reportadas como sendo não tóxicas aos seres humanos e são efetivas sobre cepas bacterianas, vírus e outros micro-organismos eucarióticos a baixas concentrações e sem efeitos secundários (Jeong SH 2005).

Diferentes concentrações de NPsAg adicionadas a resina dentária demonstraram efeito antimicrobiano (Monteiro *et al.* 2012). Uma resina acrílica dentária modificada em associação com NPsAg demonstrou propriedades antifúngicas (Nam *et al.* 2012). A prata tem sido incorporada em materiais dentais como cimentos de ionômero de vidro melhorando suas propriedades antibacterianas (Swift 1986).

Samiei *et al.* (2013) avaliaram a propriedade antimicrobiana do MTA Angelus misturado com 1% de nanopartículas de prata, sobre *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* por meio do teste de difusão em ágar, e os resultados mostraram que a adição de nanopartículas de prata ao MTA melhorou a sua atividade antibacteriana.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana sobre células planctônicas e antibiofilme de *Enterococcus faecalis* partir da adição de solução de nanopartículas de prata (NPsAg) ao cimento Portland (CP) e MTA.

Material e métodos

Para este estudo, foram utilizados dois métodos de análise antimicrobiana: Teste de contato direto sobre células planctônicas e teste de contato direto sobre biofilme induzido in vitro por 15 dias. A cepa selecionada para este estudo foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais, procedência, e proporção pó-liquido empregada.

Grupo	Material	Proporção Pó (g)/ Líquido (μL)
1. MTA/Água	MTA Angelus (MTA) + Água destilada	1/330
2. CP/ZrO ₂ /Água	CP 70% + ZrO ₂ 30% + Água Destilada	1/330
3. MTA/NPsAg	MTA + NPsAg (53 mg/L)	1/440
4. CP/ZrO ₂ /NPsA g	PC 70% + ZrO ₂ 30% + NPsAg (53 mg/L)	1/330

MTA: Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil

CP: Cimento Portland: CP - CPB-40 estrutural Votoran, Votorantin cimentos, Camargo Correa Cimentos S.A., Pedro Leopoldo, MG)

ZrO₂: Óxido de Zircônio: Sigma Aldrich Corp. St. Louis, MO, Estados Unidos da América

NPsAg: Instituto de Física de São Carlos-USP

Contato direto sobre bactéria na forma planctônica

O teste de contato direto foi baseado na metodologia de Baer et al. (Baer & Maki 2010). Após manipulação dos materiais experimentais, eles foram inseridos de forma padronizada em poços de uma microplaca de 96 poços. Em seguida foram depositados sobre os cimentos 10 μ L de suspensão de *E. faecalis* em cultura padronizada em espectrofotômetro com DO₆₀₀ igual a 0,2. Para cada material foram utilizados 6 poços. Um grupo controle positivo foi realizado somente o inóculo sem material. Dois controles negativos foram realizados, um com material e meio de cultura estéril e outro somente com meio de cultura estéril e sem material.

As placas foram mantidas em fluxo laminar por 30 min para secagem do inóculo. Em seguida foram adicionados 250 μ L de meio BHI em cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C em microaerofilia durante os períodos experimentais de contato de 5 e 15 horas.

Após o período de contato, uma alíquota de 10 μ L foi tirada de cada poço e levada para uma nova placa (placa de leitura) com 250 μ L de meio BHI. A placa de leitura foi incubada 37 °C em microaerofilia por 5 horas, tempo baseado na curva de crescimento de *E. faecalis*, observada previamente. Ao final, as placas foram lidas em espectrofotômetro (DO₆₀₀) (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) para obtenção do valor de turbidez do meio.

Aos dados foi aplicada a seguinte fórmula:

$Ab_{\text{final}} = Ab(\text{material com inóculo}) - \text{Média } Ab(\text{material sem inóculo})$. Os valores de Ab_{final} foram analisados e foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) e comparação entre os grupos utilizando o teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Atividade Antibiofilme

O teste de atividade antibiofilme por contato direto foi realizado segundo Faria-Junior *et al.* (2013). Blocos de dentina bovina com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x altura) foram obtidos a partir de incisivos centrais bovinos, colocados em tubo de ensaio contendo água destilada para esterilização em autoclave a 121°C por 20 min.

O biofilme foi desenvolvido a partir da inoculação de uma suspensão a 1×10^8 UFC mL⁻¹ de *E. faecalis* (ATCC 29212) sobre os blocos de dentina, utilizando placa de cultura celular de 24 poços por um período de 14 dias. Foram utilizados 1,8 mL de meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI-Difco) e 0,2 mL da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas em microaerofilia com agitação orbital a 37°C. Trocas do meio de cultura esterilizado foram realizadas a cada 2 dias para suprir as necessidades nutricionais do biofilme. A presença de biofilme nos blocos de dentina após 14 dias foram constatadas macroscopicamente.

Os corpos-de-prova dos materiais foram confeccionados a partir de uma matriz com diâmetro interno de 5 mm. Os espécimes foram mantidos em estufa a 37°C até o momento do experimento. Os cimentos foram analisados após 2 dias da manipulação. Após este período, o corpo-de-prova de cada material foi removido da matriz, esterilizado em luz ultravioleta por 30 minutos de cada lado e colocados sobre um dos blocos de dentina contendo o biofilme, lavados previamente em solução salina para remoção de bactérias planctônicas. O método de esterilização foi validado anteriormente por meio de teste de esterilidade.

Foram utilizados 6 corpos-de-prova para cada tempo de contato e para cada material. O corpo-de-prova foi colocado em contato com o biofilme induzido durante

5h e 15h em placa de cultura de 24 poços em presença de umidade. Foi incluído um grupo controle onde o biofilme não entrou em contato com nenhum material servindo de comparação para os resultados.

Decorridos os períodos de contato, os corpos-de-prova foram removidos e os blocos de dentina com o biofilme remanescente foram enxaguados em salina e individualmente colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução salina estéril e 2 pérolas de vidro e agitados em vórtex (model Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil) por 1 minuto para suspensão dos micro-organismos remanescentes. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada da amostra. Ao final das diluições, alíquotas de 20 μL de cada uma das suspensões foram distribuídas em triplicata sobre placas de Petri contendo o meio de cultura seletivo para *E. faecalis*, m-Enterococcus ágar (Difco Laboratories – Becton Dickinson and Company - USA) e incubadas a 37 °C por 48h.

A leitura dos resultados resultou da média do número de UFCmL⁻¹ das triplicatas com contagem entre 5 e 50 UFC. A partir dessas médias foi calculado o número de UFCmL⁻¹ após cada um dos tempos de contato entre os discos de cimentos obturadores e o biofilme desenvolvido nos blocos de dentina. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica e submetidos aos testes ANOVA e Tukey com 5% de significância.

Resultados

Atividade antimicrobiana por contato direto com células planctônicas de *E. faecalis*

Os resultados demonstraram que os grupos CP/ZrO₂ e CP/ZrO₂/NPsAg apresentaram maior redução bacteriana ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos após 5 horas de contato. MTA/NPsAg apresentou maior redução bacteriana que MTA/água, que foi similar ao controle ($p > 0,05$). No período de 15 horas todos os grupos apresentaram redução significativa de *E. faecalis* quando comparados ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios (nm) e desvio padrão da turbidez do meio observada para cada material.

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	MTA/NPsAg	CP/ ZrO ₂ / NPsAg	Controle
5 horas	0.5933 ^{bc}	0.1020 ^a	0.4060 ^b	0.1950 ^a	0.7870 ^c
Desvio Padrão	(± 0.1534)	(± 0.04316)	(± 0.3118)	(± 0.1366)	(± 0.08838)
15 horas	0.06703 ^a	0.0726 ^a	0.06712 ^a	0.07617 ^a	0.3905 ^b
Desvio Padrão	(± 0.007336)	(± 0.05277)	(± 0.06973)	(± 0.08304)	(± 0.04867)

Letras iguais na mesma linha indicam semelhança estatística ($p > 0,05$).

Contato direto sobre biofilme de *E.faecalis*

A Tabela 3 mostra a média dos valores de UFCmL⁻¹ transformados em log¹⁰, após 5 e 15 horas de contato com os biofilmes. No período de 5 horas MTA/água foi semelhante ao grupo controle, e redução de microrganismos foi observada para os demais materiais em relação ao controle (p<0,05). No período de 15 horas todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, com maior redução bacteriana para MTA/NPsAg e CP/ZrO₂/NPsAg. O biofilme não foi eliminado completamente por nenhum dos materiais, em nenhum dos períodos de contato (Tabela3).

Tabela 3. Valores médios (UFC/mL) e desvio-padrão dos diferentes cimentos para a atividade antibiofilme após 2 dias de presa, 5 e 15 horas de contato com biofilme.

Grupos		MTA	CP/ZrO ₂	MTA/NPsAg	CP/ ZrO ₂ / NPsAg	Controle
2 Dias	5 horas	6,451 ^{ab}	6,391 ^a	5,921 ^a	5,777 ^a	7,110 ^b
	Desvio Padrão	(± 0,4573)	(± 0,3679)	(± 0,5776)	(± 0,1859)	(± 0,3594)
	15 horas	6,576 ^b	6,712 ^b	5,069 ^a	5,614 ^a	7,730 ^c
	Desvio Padrão	(± 0,5908)	(± 0,2284)	(± 0,3121)	(± 0,3282)	(± 0,8958)

Letras iguais na mesma linha indicam semelhança estatística (p>0,05).

Discussão

O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de cimentos por meio de dois métodos, o contato direto sobre células planctônicas e o contato direto sobre biofilme de *E. faecalis*. *E. faecalis* é uma espécie bacteriana prevalente em casos de fracasso endodôntico (Stuart *et al.* 2006). Um dos fatores responsáveis pela resistência do *E. faecalis* é sua habilidade de sobreviver em ambientes alcalinos (Evans *et al.* 2002) e formar biofilme (Kristich *et al.* 2004).

O teste de difusão em ágar é um método antibacteriano simples e de menor custo (Jorgensen & Ferraro 2009, Salem-Milani *et al.* 2013). Porém este método tem desvantagens como a influência da característica de difusão do material, que é afetada pela concentração, peso molecular e a solubilidade dos agentes antimicrobianos (Siqueira *et al.* 2000, Gomes *et al.* 2004, Yasuda *et al.* 2008). O teste de contato direto permite contato direto entre micro-organismo e material avaliado, e não depende das propriedades de difusão do material e do meio (Gomes *et al.* 2004).

O insucesso endodôntico é relacionado à persistência de micro-organismos organizados na forma de biofilme microbiano (Faria-Junior *et al.* 2013), sendo importante a avaliação da atividade antimicrobiana sobre esta forma de organização. Assim, a metodologia descrita por Faria-Junior *et al.* (2013) permite avaliar materiais pelo teste de contato direto sobre micro-organismos organizados em biofilme, aproximando resultados da situação clínica endodôntica (Socransky & Haffajee 2002). Um dos fatores que afetam a resistência do biofilme está relacionado ao seu período de desenvolvimento (Norrington *et al.* 2008). Biofilmes incubados por períodos curtos de tempo são pouco estruturados e podem não mostrar a resistência de um biofilme

maduro. O biofilme do presente estudo foi desenvolvido por um período de 14 dias, sendo considerado maduro segundo Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2013) .

Estudos sobre a atividade antibacteriana do MTA e CP contra *E. faecalis* mostram diferentes resultados. Torabinejad *et al.* (1995), observaram que o MTA foi efetivo contra alguns micro-organismos facultativos, mas não contra o *E. faecalis*. Zarrabi *et al.* (Hasan Zarrabi *et al.* 2009) empregando teste de difusão em ágar, avaliaram a propriedade antibacteriana do MTA e CP e mostraram que os cimentos apresentaram uma efetiva ação antibacteriana contra diversas bactérias com exceção de *E. faecalis*. Por outro lado, Tanomaru Filho *et al.* (2007) avaliaram o CP e o MTA branco por meio de difusão em ágar e demonstraram que os 2 materiais produziram zonas de inibição contra *E. faecalis*. Ainda, Stowe *et al.* (Stowe *et al.* 2004) avaliaram as propriedades antibacterianas do MTA e demonstraram inibição do crescimento de *E. faecalis* e *Streptococcus sanguis*. Os diferentes resultados podem estar relacionados às diferenças entre metodologias, tipos de cepas bacterianas, períodos de contato, concentrações, meios de culturas e tipo do MTA avaliados.

Os resultados do teste de contato com células planctônicas demonstraram que CP/ZrO₂ e CP/ZrO₂/NPsAg apresentaram maior redução bacteriana no tempo de 5 horas e todos os grupos mostraram redução de *E. faecalis* quando comparados ao grupo controle no período de 15 horas. Os resultados concordam com Lovato & Sedgley (2011) que por meio de teste de contato direto observaram eficácia antibacteriana do MTA contra cepas de *E. faecalis*. Asgary & Kamrani (2008) demonstraram atividade antibacteriana contra *E. faecalis* do MTA fresco por meio de difusão em ágar. A eficácia antibacteriana do MTA esta relacionada ao seu elevado pH, apresentando um

pH inicial de 10.2, e de 12.5 em 3 horas (Torabinejad *et al.* 1995), que pode inibir a maioria dos micro-organismos, incluindo bactérias resistentes como *E. faecalis*.

No presente estudo foram utilizadas Nanopartículas de prata sintetizadas pela redução de nitrato de prata (AgNO_3) com o polímero poli vinil álcool (PVA) como estabilizante químico, sendo as partículas obtidas de 5-10nm de tamanho. O efeito bactericida das nanopartículas de prata depende do seu tamanho (Morones *et al.* 2005), sendo que as nanopartículas menores do que 10 nm demonstram interação com a bactéria.

Após 5 horas de contato com biofilme todos os materiais exceto MTA/água promoveram redução de microrganismos, o que ocorreu para todos os materiais após o período de 15 horas, com uma maior redução bacteriana para os grupos de MTA/NPsAg e CP/ ZrO_2 /NPsAg. O biofilme não foi eliminado completamente por nenhum dos materiais, em nenhum dos períodos de contato.

As propriedades antibacterianas das nanopartículas de prata têm sido demonstradas sobre bactérias em forma planctônica e biofilme. Kalishwaralal *et al.* (2010) reportaram que as nanopartículas de prata têm a habilidade de bloquear a síntese de polissacarídeos extracelulares, e seu efeito pode ocorrer pelos canais de comunicação existentes dentro do biofilme que estão presentes para o transporte de nutrientes, NPsAg podem se difundir diretamente na camada de polissacarídeos através dos poros e assim exercer uma função antimicrobiana.

Os materiais manipulados com solução de NPsAg proporcionaram maior redução bacteriana sobre o biofilme de *E. faecalis*. Resultados similares foram observados por Wu *et al.* (2014) que utilizaram um gel de Nanopartículas de prata (0.02% y 0.01%) sobre biofilme de *E. faecallis* por 7 dias, e concluíram que as

nanopartículas de prata afetaram a integridade estrutural do biofilme e mostraram potencial para eliminá-lo. Samiei et al. 2013 demonstraram num teste de difusão em ágar que a adição de nanopartículas de prata a 1% ao MTA melhorou a suas propriedades antibacterianas contra *E. faecalis*, *C. albicans*, e *P. aeruginosa*.

Uma hipótese para estes resultados pode ser devido as nanopartículas serem menores do que 10 nm e interagirem diretamente com a bactéria (Morones *et al.* 2005), já que as nanopartículas de prata tem carga positiva e interagem com a membrana celular bacteriana que por serem ricas em fosfolipídios ácidos com carga negativa (Kim *et al.* 2007; Lee *et al.* 2013). A partir da aderência das nanopartículas à membrana bacteriana, permeabilidade seria afetada (Morones *et al.* 2005) facilitando um maior contato entre os componentes internos da bactéria com os íons liberados pelo MTA e CP.

Conclusão

A incorporação de NPsAg ao MTA e CP aumentou a efetividade dos materiais à base de silicato de cálcio tanto sobre células planctônicas quanto sobre biofilmes de *E. faecalis*.

Referências

- Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nunez-Anita RE, Cajero-Juarez M, Castano VM (2012) Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International journal of nanomedicine* **7**, 4777-4786.
- Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS (2009) Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **25**, 206-213.
- Asgary S, Kamrani FA (2008) Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. *Journal of oral science* **50**, 469-474.
- Baer J, Maki JS (2010) In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *Journal of endodontics* **36**, 1170-1173.
- Camilleri J, Cutajar A, Mallia B (2011) Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **27**, 845-854.
- Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP (2007) Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *Journal of endodontics* **33**, 295-298.
- Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD (2000) Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Brazilian dental journal* **11**, 3-9.
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International endodontic journal* **35**, 221-228.
- Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *International endodontic journal* **46**, 755-762.
- Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC *et al.* (2004) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Brazilian dental journal* **15**, 30-35.
- Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *Journal of endodontics* **37**, 203-210.
- Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M (2013) Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of endodontics* **39**, 346-350.
- Hasan Zarrabi M, Javidi M, Naderinasab M, Gharechahi M (2009) Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. *Journal of oral science* **51**, 437-442.
- Jeong SH YS, Yi CS. (2005) The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers. *J Mater Sci* **40**, 5407-5411.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**, 1749-1755.

- Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S (2010) Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **79**, 340-344.
- Khan MS, Vishakante GD, Siddaramaiah H (2013) Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. *Advances in colloid and interface science* **199-200**, 44-58.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN *et al.* (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **3**, 95-101.
- Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM (2004) Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* **186**, 154-163.
- Lee JK, Park YJ, Kum KY *et al.* (2013) Antimicrobial efficacy of a human beta-defensin-3 peptide using an *Enterococcus faecalis* dentine infection model. *International endodontic journal* **46**, 406-412.
- Lovato KF, Sedgley CM (2011) Antibacterial activity of endosequence root repair material and proroot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* **37**, 1542-1546.
- Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB (2012) Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists* **21**, 7-15.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A *et al.* (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346-2353.
- Nam KY, Lee CH, Lee CJ (2012) Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. *Gerodontology* **29**, e413-419.
- Norrington DW, Ruby J, Beck P, Eleazer PD (2008) Observations of biofilm growth on human dentin and potential destruction after exposure to antibiotics. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **105**, 526-529.
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances* **27**, 76-83.
- Salem-Milani A, Balaei-Gajan E, Rahimi S *et al.* (2013) Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. *Journal of dentistry* **10**, 16-22.
- Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM (2013) Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iranian endodontic journal* **8**, 166-170.
- Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA, 3rd (1999) Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *Journal of the American Dental Association* **130**, 967-975.
- Siqueira JF, Jr., Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP (2000) Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *Journal of endodontics* **26**, 274-277.
- Socransky SS, Haffajee AD (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
- Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC (2004) The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics* **30**, 429-431.

- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006) Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics* **32**, 93-98.
- Swift EJ, Jr. (1986) Glass ionomers: a review for the clinical dentist. *General dentistry* **34**, 468-471.
- Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY (2007) In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *Journal of oral science* **49**, 41-45.
- Torabinejad M, Chivian N (1999) Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics* **25**, 197-205.
- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics* **21**, 349-353.
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD (1995) Antibacterial effects of some root end filling materials. *Journal of endodontics* **21**, 403-406.
- Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B (2014) Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against Enterococcus faecalis Biofilm. *Journal of endodontics* **40**, 285-290.
- Yasuda Y, Kamaguchi A, Saito T (2008) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens. *Journal of oral science* **50**, 309-313.

4 DISCUSSÃO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) foi desenvolvido por Torabinejad, em 1995 para selar a comunicação entre o dente e o meio externo (Torabinejad et al.³⁹, 1993). É amplamente utilizado em casos de rizogênese incompleta (Felippe et al.¹⁵, 2006) e em obturações retrógradas (Torabinejad et al.³⁸, 1995). O material retro-obturador ideal deve apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas específicas como radiopacidade, estabilidade química, ação antibacteriana e biocompatibilidade (Torabinejad et al.³⁷, 1995).

O MTA é composto principalmente por silicato dicálcico e silicato tricálcico (Camilleri et al.¹⁰, 2005), que são também os principais componentes do Cimento Portland. O MTA e CP apresentam grande similaridade em quanto à sua composição, ação antimicrobiana e propriedades biológicas (Holland et al.²¹, 2001).

O MTA apresenta várias aplicações clínicas, porém apresenta grandes desvantagens como longo tempo de presa, dificuldade de manipulação e limitada ação antimicrobiana (Camilleri⁵ 2009).

Um material retro-obturador deve ser radiopaco para permitir a sua visualização radiográfica (Islam et al.²³, 2006). O óxido de Bismuto é o radiopacificador presente no MTA (Hungaro Duarte et al.²², 2009). No entanto Camilleri⁶ (2011) observou que a adição do óxido de bismuto ao MTA afeta as propriedades do material. O Óxido de Zircônio (ZrO_2) tem sido proposto como radiopacificador alternativo (Hungaro Duarte et al.²², 2009), e tem demonstrado que a associação com CP apresenta radiopacidade maior do que 3 mm Al (Camilleri et al.⁷, 2011). No presente estudo todos os materiais apresentaram radiopacidade maior do que 4 mm Al cumprindo com a norma ISO 6876²⁸.

Tem sido demonstrado na literatura que as NPsAg diminuem a solubilidade dos materiais (Chladek et al.¹¹, 2012). No presente estudo o G3 e G4 demonstraram uma diminuição significativa na solubilidade quando comparado com os outros grupos, com uma menor percentagem de solubilidade para o G4. Os resultados contrastam com Fridland, Rosado¹⁶ (2003), os quais mostraram que a solubilidade aumenta significativamente com o aumento da proporção pó-água.

Quando manipulado com a solução de nanopartículas, menor porosidade pode ter ocorrido em função da penetração das nanopartículas de prata (de Moura et al.¹³, 2013), sugerindo que as nanopartículas de prata tiveram uma interferência positiva no processo de hidratação dos cimentos, diminuindo a porosidade e conseqüentemente a solubilidade. Ainda, a incorporação de ZrO_2 proporciona menor solubilidade para o material (Weckwerth et al.⁴⁰, 2012).

O teste de resistência à compressão, exceto para o grupo CP/ ZrO_2 , demonstrou que todos os materiais tiveram um aumento no valor de resistência à compressão de 24 horas a 21 dias. Segundo Islam et al.²³ (2006), isto é devido ao contínuo endurecimento dos materiais, o que resulta num aumento de resistência e estabilidade com o decorrer do tempo. No período de 21 dias os grupos MTA/NPsAg e CP/ ZrO_2 /NPsAg demonstraram um aumento na resistência à compressão quando comparado aos grupos MTA/Água e CP/ ZrO_2 . Uma possível explicação é que existe certo grau de porosidade nos materiais após manipulação pó-líquido. A porosidade ocorre devido à incorporação de bolhas de ar microscópicas durante a mistura (Torabinejad et al.³⁶, 1995) quando o material é manipulado com solução de NPsAg pode existir menor porosidade (de Moura et al.¹³, 2013). O aumento da porosidade induz maiores índices de degradação do material (Coomaraswamy et al.¹², 2007) afetando a sua resistência à compressão.

Quando o MTA e CP são misturados com água se produz Hidróxido de Cálcio, que libera íons cálcio e íons hidroxila o que eleva o pH dos materiais (Duarte et al.¹⁴, 2007), estimulando a mineralização no processo de reparação de tecidos, aumentando também a sua biocompatibilidade e propriedade antibacteriana (McHugh et al.²⁶, 2004). Todos os grupos apresentaram um pH entre 10-12 concordando com os achados na literatura (Asgary et al.³, 2008; Guerreiro-Tanomaru et al.¹⁹, 2012), contrastando com Torabinejad et al.³⁶, (1995) que reporta valores de 12.0 para o MTA, a diferença de resultados pode ser devido a diferentes metodologias utilizadas. Os maiores valores de pH foram apresentados pelo grupo de MTA/NPsAg em todos os períodos e pelo grupo de CP/ZrO₂ no período de 2 dias e 5 horas.

Com o avanço da tecnologia de nanopartículas de prata e incorporação aos diversos materiais dentais, tem sido demonstrada melhora nas propriedades antibacterianas e osteoindutivas (Liu et al.²⁵, 2012).

A concentração utilizada para este trabalho foi de (53 mg/L) e o tamanho da partícula foi de 5-10 nm. Tem sido demonstrado que partículas menores do que 10 nm apresentam efeito antibacteriano (Morones et al.²⁷, 2005). As NPsAg interagem com múltiplos sítios da célula bacteriana, tais como a membrana celular, enzimas e plasmídeos, proporcionando simultaneamente às bactérias menor capacidade de gerar resistência (Rai et al.²⁹, 2012).

O grupo de CP/ZrO₂ demonstrou atividade antibacteriana em todos os períodos, sendo estatisticamente diferente ao grupo controle concordando com estes resultados, um estudo de Guerreiro-Tanomaru et al.¹⁹, (2012), demonstrou por meio do teste de difusão em ágar que a associação de CP/ZrO₂ apresentou atividade antibacteriana contra o *E. faecalis*. E contrastando nossos resultados com os achados

por Weckwerth et al.⁴⁰ (2012), onde a associação não apresentou zonas de inibição no teste de difusão em ágar para este microrganismo.

Na análise antimicrobiana, nenhum cimento foi capaz de eliminar completamente o biofilme de *E. faecalis*. No período de 2 dias de presa com 15 horas de contato os cimentos experimentais MTA/NPsAg e CP/ZrO₂/NPsAg apresentaram diferença estatística quando comparados aos outros grupos, demonstrando resultados similares aos apresentados por Samiei et al.³¹ (2013) onde a associação de NPsAg ao MTA aumentou a atividade antibacteriana do material. E concordando também com um estudo realizado por Wu et al.⁴¹ (2014) onde as NPsAg apresentaram ação antibacteriana danificando significativamente a integridade estrutural do biofilme mostrando maior redução bacteriana do que o Hidróxido de Cálcio.

No teste em células planctônicas todos os materiais demonstraram redução bacteriana no período de 15 horas sem diferença estatística entre eles. Isto se deve ao fato de que as bactérias em forma planctônica, são menos estruturadas e carecem de uma matriz extracelular que incrementa a resistência da bactéria frente a agentes antimicrobianos (Allaker et al.², 2014).

Futuras pesquisas como bioatividade, citotoxicidade, testes in vivo, em subcutâneo de ratos, viabilidade celular, são necessários para mostrar a resposta biológica diante de cimentos com nanopartículas de prata.

5 CONCLUSÃO

A associação de CP com ZrO_2 e a adição de NPsAg proporciona propriedades físico-químicas, mecânicas e antibacterianas adequadas, com potencial para uso alternativo ao MTA. No entanto, futuros experimentos fazem-se necessários para maior elucidação das propriedades biológicas e citotóxicas do cimento.

6 REFERÊNCIAS*

1. Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2009; 25(2): 206-13.
2. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43(2): 95-104.
3. Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S. The properties of a new endodontic material. *J Endod.* 2008; 34(8): 990-3.
4. Bhattacharyya D SS, Satnalika N, Khandelwal A, Jeon SH. Nanotechnology, big things from a tiny world: a review. *Int J Serv Sci Technol.* 2009; 2(3): 29-38.
5. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod.* 2009; 35(10): 1412-7.
6. Camilleri J. Evaluation of the effect of intrinsic material properties and ambient conditions on the dimensional stability of white mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod.* 2011 37(2): 239-45.
7. Camilleri J, Cutajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater.* 2011; 27(8): 845-54.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver Disponível no site <http://foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

8. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 831-40.
9. 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.
10. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J.* 2005; 38(11): 834-42.
11. Chladek G, Kasperski J, Barszczewska-Rybarek I, Zmudzki J. Sorption, solubility, bond strength and hardness of denture soft lining incorporated with silver nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2012; 14(1): 563-74.
12. 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): 295-8.
13. de Moura MR, Aouada FA, Mattoso LH, Zucolotto V. Hybrid nanocomposites containing carboxymethylcellulose and silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013; 13(3): 1946-50.
14. Duarte MA, Martins CS, de Oliveira Cardoso Demarchi AC, de Godoy LF, Kuga MC, Yamashita JC. Calcium and hydroxide release from different pulp-capping materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(1): e66-9.

15. Felipe WT, Felipe MC, Rocha MJ. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J.* 2006; 39(1): 2-9.
16. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod.* 2003; 29(12): 814-7.
17. Fujieda T, Uno M, Ishigami H, Kurachi M, Kamemizu H, Wakamatsu N, et al. Effects of dental porcelain containing silver nanoparticles on static fatigue. *Dent Mater J.* 2013; 32(3): 405-8.
18. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011; 37(2): 203-10.
19. Guerreiro-Tanomaru JM, Cornelio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012; 2012: 469019.
20. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J.* 2001; 12(2): 109-13.
21. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2001; 12(1): 3-8.

22. Hungaro 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.* 2009; 35(5): 737-40.
23. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod.* 2006; 32(3): 193-7.
24. Jeong SH, Yi CS. The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers. *J Mater Sci.* 2005; 40(20): 5407-11.
25. Liu Y, Zheng Z, Zara JN, Hsu C, Soofer DE, Lee KS, et al. The antimicrobial and osteoinductive properties of silver nanoparticle/poly (DL-lactic-co-glycolic acid)-coated stainless steel. *Biomaterials.* 2012; 33(34): 8745-56.
26. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2004; 30(4): 218-9.
27. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005; 16(10): 2346-53.
28. International Standard Organization. ISO 6876: dental root canal sealing materials. Genève: ISO; 2001.
29. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol.* 2012; 112(5): 841-52.

30. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(4): 483-9.
31. Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM. Antimicrobial efficacy of Mineral Trioxide aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iran Endod J.* 2013; 8(4): 166-70.
32. Shah PM, Chong BS, Sidhu SK, Ford TR. Radiopacity of potential root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 81(4): 476-9.
33. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004; 275(1): 177-82.
34. Swift EJJr. Glass ionomers: a review for the clinical dentist. *Gen Dent.* 1986; 34(6): 468-71.
35. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999; 25(3): 197-205.
36. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21(7): 349-53.
37. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995; 21(8): 403-6.

38. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod.* 1995; 21(6): 295-9.
39. 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): 591-5.
40. Weckwerth PH, Machado AC, Kuga MC, Vivan RR, Polleto Rda S, Duarte MA. Influence of radiopacifying agents on the solubility, pH and antimicrobial activity of portland cement. *Braz Dent J.* 2012; 23(5): 515-20.
41. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod.* 2014; 40(2): 285-90.

Não autorizo a reprodução deste trabalho

Até 25/3/2017

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 25 de março de 2014

Fernando Antonio Vázquez García