



UNESP - Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Odontologia de Araraquara



ROBERTA BOSSO

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE CIMENTOS
PORTLAND ASSOCIADOS A RADIOPACIFICADORES MICRO E NANOPARTICULADOS**

Araraquara

2014



UNESP - Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Odontologia de Araraquara



ROBERTA BOSSO

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE CIMENTOS
PORTLAND ASSOCIADOS A RADIOPACIFICADORES MICRO E NANOPARTICULADOS**

Tese 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 Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

Araraquara

2014

Bosso, Roberta

Avaliação de propriedades físicas, químicas e biológicas de cimentos Portland associados a radiopacificadores micro e nanopartículas / Roberta Bosso.-- Araraquara: [s.n.], 2014.

87 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

1. Materiais dentários 2. Propriedades físicas e químicas 3. Cimento de silicato I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

ROBERTA BOSSO

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE
CIMENTOS PORTLAND ASSOCIADOS A RADIOPACIFICADORES MICRO E
NANOPARTICULADOS**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

2º examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

3º examinador: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

4º examinador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda

5º examinador: Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira

Araraquara, 20 de janeiro de 2014

DADOS CURRICULARES

ROBERTA BOSSO

NASCIMENTO 09/04/1985

Porto Ferreira – São Paulo

FILIAÇÃO Valdir Bosso

Nair Aparecida Minatel Bosso

2005 – 2008 Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2009 – 2010 Curso de aperfeiçoamento em Endodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2010 – 2014 Curso de Doutorado em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

“Eu vos amo Senhor, minha força!

O Senhor é o meu rochedo, minha fortaleza e meu libertador. Meu Deus é minha rocha, onde encontro o meu refúgio, meu escudo, força de minha salvação e minha cidadela.

Invoco o Senhor, digno de todo louvor, e fico livre dos meus inimigos. Na minha angústia, invoquei o Senhor, gritei para meu Deus, do seu templo ele ouviu a minha voz, e o meu clamor em sua presença chegou aos seus ouvidos.

Ele inclinou os céus e desceu, calcando aos pés escuras nuvens. Cavalgou sobre um querubim e voou, planando nas asas do vento. Do alto estendeu a sua mão e me pegou, e retirou-me das águas profundas, livrou-me de inimigo poderoso, dos meus adversários mais fortes do que eu. Investiram contra mim no dia do meu infortúnio, mas o Senhor foi o meu arrimo; pôs-me a salvo e livrou-me, porque me ama.

O Senhor me tratou segundo a minha inocência, retribuiu-me segundo a pureza de minhas mãos, porque guardei os caminhos do Senhor e não pequei separando-me do meu Deus. Tenho diante dos olhos todos os seus preceitos e não desvio de suas leis. Ando irrepreensivelmente diante dele, guardando-me do meu pecado.

O Senhor retribuiu-me segundo a minha justiça, segundo a pureza de minhas mãos diante dos seus olhos.

Senhor, sois vós que fazeis brilhar o meu farol, sois vós que dissipais as minhas trevas. Convosco afrontarei batalhões, com meu Deus escaltarei muralhas. Os caminhos de Deus são perfeitos, a palavra do Senhor é pura. Ele é o escudo de todos os que nele se refugiam. Pois quem é Deus senão o Senhor? Quem é o rochedo, senão o nosso Deus? É Deus quem me cinge de coragem e aplanar o meu caminho. Torna os meus pés velozes como os das gazelas e me instala nas alturas. Adestra minhas mãos para o combate e meus braços para o tiro de arco. Vós me dais o escudo que me salva. Vossa destra me sustêm, e vossa bondade me engrandece. Alargais o caminho a meus passos, para meus pés não resvalarem.

Viva o Senhor e bendito seja o meu rochedo! Exaltado seja Deus, que me salva! Deus, que me proporciona a vingança e avassala nações a meus pés. Sois vós que me libertais dos meus inimigos, me exaltais acima dos meus adversários e me salvais do homem violento. Por isso vos louvarei, ó Senhor, entre as nações e celebrarei o vosso nome. Ele prepara grandes vitórias a seu rei e faz misericórdia a seu ungido, a Davi e a sua descendência para sempre.” (Salmo 17)

Esta tese de doutorado é do Senhor.

Dedicatória

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida...

Primeiramente a **Deus**, inteligência suprema do Universo, causa de tudo o que existe, fonte de vida, sabedoria e inspiração superior.

À **Maria, Nossa Senhora e Mãe**, por todo amor, amparo, proteção e por interceder por mim e minha família junto a Deus.

Aos meus amados e queridos pais, **Valdir** e **Nair**, responsáveis pela minha vida e a quem devo meu caráter e disciplina ao trabalho. Ao apoio, abdições e todo amor dispensado a mim este trabalho pôde ser realizado. Vocês são minhas raízes profundas, são meus presentes de Deus e a concretização de mais uma de suas promessas “Toda árvore boa dá bons frutos e pelos seus frutos os conhecereis” (Mt 7, 12 e 20). Agradeço a Deus por vocês serem meus pais. Amo-os muito e sempre!

Ao meu grande amor, **Muriel**, por me ensinar o significado da palavra felicidade, pela força que nos une e faz do nosso amor o mais intenso e o maior. Obrigada pela sua força, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Esta vitória é nossa!

Às minhas irmãs, **Renata** e **Marina**, que são um presente de Deus em minha vida, sempre me incentivaram e torceram pela minha vitória. O amor que tenho por vocês é incondicional e insubstituível.

À minha linda sobrinha, **Luiza**. "Jesus, porém, chamou-as e disse: Deixai vir a mim as criancinhas e não as impeçais, porque o Reino de Deus é daqueles que se parecem com elas" (Lc 18,16). Obrigada por iluminar meus dias com um simples sorriso. A tia ama muito você.

Esta dedicatória se estende também ao meu amigo, orientador e por muitas vezes, a figura de um pai, **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, por ter me acolhido como sua orientanda. A este devo a confiança em minha capacidade como pesquisadora, além da paciência e tranquilidade para me transmitir os ensinamentos. Pelo incentivo e exemplo de competência e perseverança não apenas no campo científico como frente às adversidades da vida, e dono de um imenso conhecimento e humildade. Devo a você muito do que sou e nunca esquecerei isto. Para mim o seu valor é inestimável.

Agradecimentos

Aos meus avôs, **Palmyro e Nair e Júlio e Luiza** (in memoriam), por me proporcionarem pais maravilhosos, alegrarem meus dias, por todo amor doado e pela estrutura familiar tão rara hoje em dia. Minha eterna gratidão.

Aos meus cunhados, **Bruno, Lucas e Lucas**, por todo incentivo e carinho. Vocês são minha família.

Aos meus queridos sogros, **Doraci e Antônia**, por me receberem em sua casa como uma filha. Agradeço a receptividade, o apoio e o filho. Obrigada por todo carinho.

Aos meus **tios, primos e priminhos**, pela torcida constante, pelo valioso incentivo e pela vibração e felicidade nos momentos de vitória.

Às minhas tão amadas amigas, **Bruna, Margareth, Tais, Adriana e Lara**. São tantas histórias, tantos medos, tantas vitórias e tanto amor. Obrigada meninas pela amizade verdadeira, sempre doada nunca à espera de retribuição. Amo vocês imensamente e só tenho a agradecer, devo parte da minha história a vocês. Simplesmente para sempre.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan e vice-reitora Prof. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon e vice-diretora Profa. Dra. Elaine M. Sgavioli Massucato.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert e vice-chefe Prof. Dr. Edson Alves de Campo.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia**, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, pelo apoio constante. Muito obrigada pela confiança depositada em mim.

Aos colegas da Pós-Graduação, **Letícia, Camila Espir, Carol Venção, Carol Andolfato, Tiago, Paula, Guilherme, Adriana, Fernando, Kátia, Matheus, Miriam, Keli, Juliana, Bernardo, Arnaldo, Rodrigo, Norberto, Rosymere, Flávia, Rafael, Regina, Santiago, Alana, Loise, Érica e Adriana Ortegá**, minha gratidão por todo ensinamento e pelo alegre convívio.

Para **Ana Livia** e **Elisandra**, obrigada pela amizade e colaboração no desenvolvimento da parte experimental desta tese e pela disponibilidade em me ajudar sempre. À **Natália** pela ótima convivência, amizade, paciência e pela grande ajuda para formatação desta tese. Ao meu grande amigo **Arturo**, obrigada pelo carinho, por sua amizade. Foi maravilhoso conviver com você.

Um agradecimento especial para **Gisselle, Nicolle, Ariele, Raqueli, Camilinha** e **Adinael**. Que Deus lhes proporcione tudo de bom que eu gostaria de dar para cada um de vocês. Sou imensamente grata pela amizade, companheirismo, carinho e paciência que tiveram comigo. Vocês tornaram meus dias em Araraquara muito mais felizes. Amo vocês, de coração!

À **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pelo apoio constante desde a minha graduação, por me ajudar prontamente em meus experimentos e nas demais situações da vida. Pude compartilhar e observar o amor e o respeito que a senhora tem por sua profissão e por cada paciente e aluno que passam por você. O que é um dom admirável e um exemplo a seguir. Obrigada por me ensinar muito sobre o que mais amo fazer, a endodontia.

À docente **Profa. Dra. Gisele Faria**, dona de uma inteligência ímpar, pela convivência maravilhosa, amizade, dedicação e humildade. Saiba “**GI**” que você é um grande exemplo a seguir, um presente de Deus em minha vida e para esta Faculdade.

Ao docente **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert**, pelos conhecimentos dados durante o curso que com certeza serão valiosos para minha formação profissional. Por todo carinho e respeito que sempre teve por mim. Obrigada pelos momentos de descontração e pelo convívio enriquecedor.

Ao docente **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho** obrigada pelo carinho, pelos momentos de descontração, bom-humor e por dividir comigo o seu conhecimento e paixão pela endodontia clínica, pesquisa e ensino.

Ao **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, pela convivência, carinho e pelos ensinamentos enriquecedores dentro e fora da área odontológica.

Ao **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, pela convivência e conhecimento transmitido.

Aos docentes **Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte**, **Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis** e **Prof. Dra. Josette Camilleri**, pelo apoio concedido para a realização de parte desta pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, **Creusa, Diva, Conceição, Cida, Marinho, Denise, Nelly, Vanderlei, Rosângela, Priscila, Marlene, Aninha e Lucinha**. Muito obrigada pela amizade, permanecerão para sempre no meu coração.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, Alexandre, Sergio, Fábio**, pela ajuda, paciência e simpatia. Obrigada por estar sempre à disposição.

Aos funcionários da Biblioteca, **Ceres, Marley, Adriano, Inês, Silvia, Eliane e Disleide**, pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas.

À **Fapesp**, pela concessão da bolsa de estudos em nível Doutorado Direto.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

Bosso R. Avaliação de propriedades físicas, químicas e biológicas de cimentos Portland associados a radiopacificadores micro e nanoparticulados [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2014.

Resumo

O Cimento Portland (CP) é um cimento de silicato de cálcio. Modificações em sua composição por meio de aditivos e resinas podem melhorar sua manipulação e presa. Foram avaliados MTA Angelus e diferentes cimentos de silicato de cálcio: puro (CSC), modificado (CSCM), resinoso 1 (CSCR1), resinoso 2 (CSCR2) e resinoso 3 (CSCR3). Dois cimentos foram selecionados para avaliação em associação aos radiopacificadores: óxido de zircônio (ZrO_2) ou óxido de nióbio (Nb_2O_5) micro ou nanoparticulado, tungstato de cálcio ($CaWO_4$) ou óxido de bismuto (Bi_2O_3). Na primeira etapa (Capítulo 1) foram avaliados tempo de presa, escoamento, resistência à compressão, quantificação de arsênio, radiopacidade e viabilidade celular. Na segunda etapa, os materiais CSCM e CSCR2 associados aos radiopacificadores foram avaliados quanto ao tempo de presa, escoamento, solubilidade, radiopacidade, resistência à compressão, pH, cálcio (capítulo 2); além de superfície, composição química, MTT e apoptose/necrose (capítulo 3). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os cimentos apresentaram arsênio em níveis compatíveis com o uso clínico, e mostraram biocompatibilidade. O CSCR2 apresentou maior escoamento. As associações do CSCM + $CaWO_4$ e CSCR2 + ZrO_2 e Nb_2O_5 micro ou $CaWO_4$ e o MTA Angelus apresentaram menor tempo de presa, e CSCM e CSCR2 + ZrO_2 micro maior escoamento. Todos os cimentos apresentaram baixa solubilidade, pH alcalino e liberaram íons cálcio. Além disso, apresentam partículas de tamanho maior que o MTA, além de cálcio e silício em sua composição e foram biocompatíveis. Concluímos que os cimentos CSCM e CSCR2 apresentam potencial uso clínico quando associado aos radiopacificadores avaliados, destacando-se o ZrO_2 e Nb_2O_5 microparticulados.

Palavras-chave: Materiais dentários, propriedades físicas e químicas, cimento de silicato.

Bosso R. Evaluation of physical, chemical and biological properties of Portland cements associated with micro and nanoparticulate radiopacifiers [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2014.

Abstract

Portland Cement (PC) is calcium silicate cement. Changes in its composition by additives and resins can improve their handling and setting time. It was evaluated MTA Angelus and different calcium silicate cements: pure (CSC), modified (CSCM), resin 1 (CSCR1), resin 2 (CSCR2) and resin 3 (CSCR3). After selection of two cements, they were associated with radiopacifiers: zirconium oxide (ZrO_2) or niobium oxide (Nb_2O_5) micro or nanoparticulate, calcium tungstate ($CaWO_4$) or bismuth oxide (Bi_2O_3). In the first fase (Chapter 1), setting time, flow, compressive strength, quantification of arsenic, radiopacity and cell viability were evaluated. In the second study, it were evaluated the setting time, flow, solubility, radiopacity, compressive strength, pH, calcium (Chapter 2), in addition to surface chemical composition, MTT and apoptosis/necrosis (Chapter 3) of cements CSCM and CSCR2 associated to radiopacifiers. Data were subjected to analysis of variance and Tukey test ($p < 0.05$). All sealers showed arsenic in compatible with clinical use levels, and showed biocompatibility. The CSCR2 showed higher flow. The associations of CSCM + $CaWO_4$ and CSCR2 with ZrO_2 or Nb_2O_5 micro or $CaWO_4$ and MTA Angelus had lower setting time, and CSCM and CSCR2 + ZrO_2 micro largest flow. All cements showed low solubility, alkaline and released calcium ions. Also, they have particles larger than the size MTA, calcium and silicon were present in their composition and they were biocompatible. It was concluded that the CSCM and CSCR2 cements have potential clinical use when associated with radiopacifiers reviews, specially the ZrO_2 and Nb_2O_5 microparticulated.

Keywords: Dental materials, physical and chemical properties, silicate cement.

Sumário

1	Introdução.....	11
2	Capítulo 1: Propriedades físico-química, mecânica e biológica de diferentes cimentos à base de silicato de cálcio.....	15
3	Capítulo 2: Avaliação de propriedades físico-químicas de diferentes cimentos à base de silicato de cálcio associados à radiopacificadores micro e nanoparticulados	39
4	Capítulo 3: Cimentos à base de silicato de cálcio associados a radiopacificadores micro e nanoparticulados. Propriedades físico-químicas e biológicas	55
5	Discussão	77
6	Conclusão	79
	Referências.....	80

1 Introdução

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Califórnia, USA), por Torabinejad et al.⁶⁹ (1993), e apresenta ampla indicação devido a sua biocompatibilidade, capacidade seladora e bioatividade (Parirokh, Torabinejad⁵⁷ 2010). O MTA é composto por 53,1% de silicato tricálcico, 22,5% silicato dicálcico, 21,6% óxido de bismuto (Bi_2O_3) (Camilleri⁷, 2007, Camilleri⁸, 2008, Camilleri⁹, 2008, Gandolf et al.³¹ 2010), podendo apresentar outros elementos. Os silicatos tricálcicos e dicálcicos são os componentes principais do cimento Portland (CP), sendo, portanto, considerado um cimento à base de silicato de cálcio. Quando hidratado, os componentes hidrofílicos dos cimentos apresentam uma série de reações físico-químicas que resultam na formação de um gel nanoporoso de silicato de cálcio hidratado, uma fração solúvel de hidróxido de cálcio e uma fase hidratada de aluminato de cálcio (Camilleri⁷, 2007, Camilleri⁸, 2008, Camilleri⁹, 2008). Estes cimentos adquirem presa em umidade, em ambientes como água, sangue e outros fluidos, sendo indicado para utilização na odontologia. Cimentos de silicato de cálcio apresentam propriedades de bioatividade quando imersos em soluções à base de fosfato e ainda, tendem a induzir a formação de precipitados de apatita (Coleman et al.²⁰ 2007, Taddei et al.⁶⁶ 2009).

Wucherpfennig, Green⁷⁵ (1999) observaram que o MTA apresenta composição similar ao CP, comprovada por análises macroscópica, microscópica e difração de Raios X. A partir da observação de que o principal componente do MTA é o CP, vários estudos tem demonstrado que as propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas desses cimentos são semelhantes (Estrela et al.²⁷ 2000, Islam et al.⁴⁵ 2006, Oliveira et al.⁵⁶ 2007). No entanto, o MTA contém um agente radiopacificador, o Bi_2O_3 (Peters, Peters⁵⁸, 2002).

O MTA apresenta algumas desvantagens, como dificuldade de manipulação e inserção (Torabinejad, White⁷⁰, 1995). Além disso, esse material apresenta baixa resistência à compressão (Pariroch, Torabinejad⁵⁷, 2010), baixo escoamento (Bortoluzzi et al.⁵ 2006), alto custo (Camilleri¹⁰, 2010), alta solubilidade (Porter et al.⁵⁹ 2010), longo tempo de presa (Tanomaru-Filho et al.⁶⁷ 2012), bem como pode apresentar metais pesados (Bramante et al.⁶ 2008, Duarte et al.²⁶ 2005, Schembri et al.⁶⁴ 2010).

Por apresentar propriedades físicas, químicas, mecânicas, biológicas e antimicrobianas semelhantes (Chang et al.¹⁶ 2010, Holland et al.³⁹ 2001, Saidon et al.⁶¹ 2003), o CP tem sido sugerido como alternativa ao MTA. Holland et al.³⁹ (2001) observaram mecanismo de ação biológica semelhante em tecido subcutâneo de ratos com o MTA, CP e hidróxido de

cálcio. Resultados semelhantes foram observados em estudos de citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade *in vivo* (Saidon et al.⁶¹ 2003). Hwang et al.⁴² (2011) na tentativa de desenvolver um cimento como substituto ao MTA, estudaram propriedades químicas, físicas e biológicas de um cimento experimental à base de CP e o compararam ao MTA e CP comum. Por meio da análise de microscopia eletrônica, espectrometria de energia dispersiva de Raios X e XTT Assay {2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide}, revelou-se que o cimento experimental apresenta composição semelhante ao CP e biocompatibilidade similar ao MTA.

Diferentes modificações do CP são observadas pela adição de aditivos e resinas para melhorar sua manipulação e tempo de presa (Camilleri⁹, 2008). O CP tipo I apresenta composição semelhante ao MTA (Tolentino et al.⁶⁸ 2002) e ambos apresentam baixa resistência à compressão (Garboczi, Bullard³², 2004). No entanto, outros tipos de CP como o tipo II, V e CP branco apresentam excelentes propriedades física e mecânica, incluindo a alta resistência à compressão, devido à inclusão de aditivos na composição (Garboczi, Bullard³², 2004).

Estudos apontam que o CP pode conter substâncias impróprias ao uso em humanos (Bramante et al.⁶ 2008, Duarte et al.²⁶ 2005, Schembri et al.⁶⁴ 2010). A norma ISO 9917-1⁴⁴ (2007) estipula que cimentos dentais à base de água devem conter menos de 2 ppm de arsênio em sua composição. O arsênio tem sido encontrado tanto no CP como no MTA, no entanto, em quantidades mínimas e compatíveis com sua utilização (Chang et al.¹⁷ 2011, Duarte et al.²⁶ 2005, Schembri et al.⁶⁴ 2010). Os componentes utilizados para composição do MTA devem ser certificados quanto a sua pureza e ausência de contaminação por metais pesados (Camilleri¹², 2011).

A baixa radiopacidade do CP dificulta a sua observação radiográfica (Húngaro-Duarte et al.⁴⁰, 2009, Húngaro-Duarte et al.⁴¹, 2012), sendo necessária a incorporação de um agente radiopacificador. Camilleri¹² (2011) observou que a presença de Bi₂O₃ como radiopacificador no MTA reduz a liberação de hidróxido de cálcio, aumenta a solubilidade e causa deterioração na estabilidade dimensional do material. Além disso, este radiopacificador aumenta a porosidade do CP (Coomaraswamy et al.²¹ 2007), interfere no crescimento celular (Camilleri et al.¹³, 2004), aumenta seu tempo de presa e diminui sua resistência à compressão (Camilleri⁹, 2008, Coomaraswamy et al.²¹ 2007).

Em substituição ao Bi₂O₃, outros radiopacificadores como tungstato de cálcio (CaWO₄), óxido de nióbio (Nb₂O₅) e óxido de zircônio (ZrO₂) podem ser utilizados. Cutajar et

al.²² (2011) e Camilleri et al.¹⁴ (2011) incorporaram ao CP diferentes concentrações de ZrO₂. Os primeiros autores observaram que essa combinação apresenta radiopacidade, resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade similar ao ProRoot MTA. Os segundos autores relatam que a hidratação do CP acrescido de 30% de ZrO₂ resulta em aumento do pH, liberação de íons cálcio e mostra ser bioativo. Liu et al.⁴⁹ (2006) demonstraram a bioatividade e citocompatibilidade de filmes de zircônia nanoestruturados. Além disso, Saldaña et al.⁶² (2007) e Gillani et al.³³ (2010) mostraram que o ZrO₂ nanoparticulado melhora as propriedades mecânicas e apresenta excelente biocompatibilidade.

Outro elemento químico estudado para melhorar as propriedades biológicas de materiais é o nióbio, devido a sua excelente biocompatibilidade (Denry et al.²⁴ 2005) e resistência superior à corrosão e desintegração (Ward et al.⁷⁴ 1996), além de apresentar potencial bioativo (Godley et al.³⁵ 2004, Miyasaki et al.⁵⁴, 2001, Miyasaki et al.⁵⁵, 2001). Karlinsey et al.⁴⁶ (2006) estudaram a bioatividade de microestruturas de Nb₂O₅ por meio da imersão em saliva humana e saliva artificial e concluíram que o Nb₂O₅ foi eficiente nucleador de hidroxiapatita e outros minerais, tais como cálcio e fósforo em soluções salivares supersaturadas. Wang et al.⁷³ (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de Nb₂O₅ frente a *Escherichia coli*. Em meio aquoso, houve significativa inibição do crescimento de *E. coli* (aproximadamente 30%).

O ZrO₂ e Nb₂O₅ apresentam capacidade de promover radiopacidade aos cimentos endodônticos (Camilleri et al.¹⁴ 2011, Leitune et al.⁴⁷ 2013), que devem apresentar valores superiores a 3 mm de uma escala de alumínio segundo especificações da ANSI/ADA³ (2000). A utilização do ZrO₂ associado ao CP como alternativa ao Bi₂O₃ resulta em material com radiopacidade adequada (Húngaro-Duarte et al.⁴⁰, 2009) de acordo com a especificação 57 da ANSI/ADA³ (2000). Esta associação também demonstra não apresentar citotoxicidade (Gomes Cornélio et al.³⁶, 2011). Viapiana et al.⁷¹ (2013) em estudo sobre cimentos endodônticos experimentais à base de CP associado ao ZrO₂ ou Nb₂O₅ mostraram que os cimentos experimentais apresentaram propriedades físico-químicas de acordo com as especificações n^o 57 ANSI/ADA³ (2000) and ISO 6876⁴³ (2002).

O CaWO₄ também vem sendo estudado como agente radiopacificador. Quando associado ao CP, esta associação promove maior pH nas primeiras 24 horas e libera íons cálcio de forma semelhante ao MTA (Húngaro-Duarte et al.⁴¹, 2012), aumenta a resistência à compressão do CP (Tanomaru-Filho et al.⁶⁷, 2012), apresenta ação antimicrobiana (Guerreiro-Tanomaru et al.³⁸ 2012) e não é citotóxico (Gomes Cornélio et al.³⁶, 2011). Quando associado

ao CP na proporção de 20% de CaWO_4 e 80% de CP, apresenta radiopacidade equivalente a 3,11 mmAl (Húngaro-Duarte et al.⁴⁰, 2009).

Cimentos à base de silicato tricálcico são propostos como materiais alternativos ao CP presente no MTA (Camilleri et al.¹⁵ 2013, Grech et al.³⁷ 2013), sendo a fase do silicato tricálcico a responsável pela bioatividade (Camilleri et al.¹⁵ 2013). Cimentos experimentais à base de silicato tricálcico associado ao radiopacificador ZrO_2 demonstram bioatividade e deposição de hidroxiapatita na superfície no cimento na presença de fluido corporal simulado (Camilleri et al.¹⁵ 2013), além disso, apresentam pH alcalino e liberam íons cálcio (Grech et al.³⁷ 2013).

Materiais à base de silicato de cálcio, bem como suas modificações e associações, apresentam potencial para aplicação em Odontologia. Diferentes formulações de cimentos à base de silicato de cálcio associados ao ZrO_2 , Nb_2O_5 , na forma micro e nanoparticulada, e ao CaWO_4 microparticulado podem representar um material para uso como cimento retrobturador com favoráveis propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas. Dessa forma, este estudo foi dividido em duas fases e três capítulos. Na primeira fase (Capítulo 1), avaliamos cinco cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas que estão disponíveis no mercado. Obtidos os dados, dois cimentos de silicato de cálcio com melhores resultados foram escolhidos e associados a diferentes agentes radiopacificadores e, então, tiveram suas propriedades estudadas (Capítulos 2 e 3).

2 Capítulo 1: Propriedades físico-química, mecânica e biológica de diferentes cimentos à base de silicato de cálcio*

* Artigo foi submetido para publicação no periódico Dental Materials

Resumo

Objetivo: Avaliar propriedades físico-químicas, mecânicas e biológica de cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições.

Metodologia: Foram avaliados tempo de presa, escoamento, resistência à compressão, quantificação de arsênio, radiopacidade e viabilidade celular do Mineral Trióxido Agregado (MTA Angelus branco) e cinco cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas: cimento de silicato de cálcio branco (CSC), cimento de silicato de cálcio modificado com aditivos e pigmentos (CSCM) e três cimentos de silicato de cálcio resinosos (CSCR1, CSCR2 e CSCR3). A presença de arsênio foi analisada seguindo a metodologia USEPA 3052/6010C. A resistência à compressão foi avaliada em máquina de ensaios mecânicos, e o tempo de presa, usando agulhas Gilmore. Para análise da radiopacidade foram realizadas radiografias juntamente com uma escala de alumínio. O teste de escoamento foi baseado na norma ISO 6876. O teste MTT foi realizado para avaliação da viabilidade celular após contato direto com os materiais. A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados: Os cimentos apresentam biocompatibilidade e arsênio em níveis compatíveis com uso clínico ($p > 0.05$). Somente o MTA apresentou radiopacidade satisfatória. O tempo de presa inicial e final do MTA foi inferior a todos os cimentos de silicato de cálcio ($p < 0,05$). CSC apresentou maior resistência à compressão ($p < 0,05$), enquanto o CSCR2 apresentou maior escoamento ($p < 0,05$).

Significância: Os cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas apresentaram níveis de arsênio e biocompatibilidade similares ao MTA e potencial para uso clínico após estudos com associação aos agentes radiopacificadores.

Palavras-chave: Materiais dentários; Mineral trióxido agregado; Propriedades químicas; Materiais retrobturadores.

Introdução

Um material retrobturador ou selador de perfurações deve apresentar biocompatibilidade com os tecidos adjacentes, insolubilidade nos fluidos bucais, estabilidade dimensional e radiopacidade [1]. O Mineral Trióxido Agregado (MTA), desenvolvido por Torabinejad em 1993 [2] é o material mais indicado para esta finalidade.

As propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas do MTA e cimento Portland (CP), considerado um cimento à base de silicato de cálcio são semelhantes [3,4]. O uso do CP é sugerido como alternativa ao MTA que demonstra dificuldade de manipulação e inserção em cavidades retrógradas. Além disso, o MTA apresenta pouco escoamento [5], alto custo [6], solubilidade [7], e pode apresentar metais pesados [8]. O tempo de presa longo do MTA tem sido visto como desvantagem desse material [9] podendo possibilitar infiltração imediata após obturação retrógrada [2]. A radiopacidade do CP puro é significativamente inferior à da dentina [10]. A presença de metais pesados, como o arsênio, foi relatada tanto no CP como no MTA [11]. Porém, essa quantidade tem sido considerada compatível com a aplicação clínica [11]. Holland et al. [12] observaram mecanismo de ação semelhante em tecido subcutâneo de ratos com o MTA, CP e hidróxido de cálcio. O mesmo foi encontrado em estudo de citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo por Saidon et al. [13].

Diferentes formulações de cimentos de silicato de cálcio são modificadas pela adição de aditivos e resinas para melhoria de suas propriedades de manipulação e presa [14] são desenvolvidas. Camilleri [14] avaliou diversos cimentos à base de silicato de cálcio modificados observando que os cimentos de presa acelerada mostraram características favoráveis quando comparados ao cimento de silicato de cálcio convencional. Abdullah et al. [15] investigaram dois tipos de cimentos de silicato de cálcio aditivados com cimento de ionômero de vidro e observaram que os cimentos aditivados não foram tóxicos e apresentavam potencial para promover reparo ósseo.

As diferentes composições do cimento de silicato de cálcio visam melhorar suas propriedades como presa e escoamento. O objetivo deste estudo foi avaliar propriedades físico-

químicas, mecânicas e biológica do cimento de silicato de cálcio branco e de diferentes modificações do cimento de silicato de cálcio.

Material e Métodos

Os materiais experimentais estão descritos na Tabela 1.

Quantificação de arsênio

A análise de arsênio foi realizada pelo método USEPA 3052/6010C [16], na qual 3052 indica a digestão em micro-ondas e 6010C representa a leitura em Espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma (ICP-OES) dos cimentos. O pó dos cimentos foi avaliado in natura, e em triplicata. Numa primeira etapa, 0,2000 g ($\pm 0,5$) de cada cimento foram adicionados a 2 mL de ácido sulfúrico 95 a 99% e as amostras levadas para micro-ondas (Digestor DGT 100 PLUS da Provecto Analítica) por 4 minutos com potência 400 W, 2 minutos a 660 W, 3 minutos a 800 W e 5 minutos a 1000 W. Após a primeira etapa foi adicionado 1 mL de ácido nítrico 65% e as amostras levadas para o micro-ondas por 4 minutos com potência 400 W, 3 minutos a 700 W e 5 minutos a 1000 W. Após resfriamento dos copos a temperatura ambiente, a amostra foi filtrada em balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com ácido nítrico 1%.

A análise foi realizada empregando-se o espectrômetro Optima 7000 DV (PerkinElmer, Waltham, USA), com comprimento de 228,812 nm sob a vista axial. Após análise de um padrão de concentração conhecido, calculou-se o fator de resposta do equipamento e, posteriormente, foi realizado o cálculo de concentração.

Radiopacidade

Foram utilizados anéis de teflon com diâmetro de 10 mm e 1 mm de altura para confecção de 6 corpos-de-prova para cada material. Os materiais foram mantidos a 37°C e 95% de umidade por 48 horas. Após esse período, foram posicionados sobre filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) ao lado de escala de alumínio, com variação de 2 a 16 mm de espessura. As radiografias foram realizadas em aparelho de raios-X GE 1000 (General Electric,

Milwaukee, WI) ajustado a 50 kV, 10 mA e 18 pulsos por segundo, com distância focal de 33 cm. Os filmes foram processados em reveladora automática (A/T 2000®XR, Air Techniques Ing, Hicksville, Nova Iorque, EUA). Após digitalização, as imagens radiográficas foram avaliadas em software UTHSCSA ImageTool para Windows versão 3.0. Foram avaliadas a equivalência em milímetros de alumínio para cada amostra, conforme realizado por Tanomaru-Filho et al. [1,17] e Vivan et al. [18].

Tempo de presa

Para determinação do tempo de presa, foram confeccionados 6 corpos-de-prova para cada material, por meio da utilização de anéis metálicos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. A avaliação do tempo de presa seguiu a metodologia adotada por Bortoluzzi et al. [19], com avaliações a cada 3 minutos durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e a cada 15 minutos até atingir o tempo de 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 o período entre a manipulação e momento em que cada agulha não produzisse marcas nos cimentos.

Resistência à compressão

Para o teste de resistência à compressão, os corpos-de-prova cilíndricos foram confeccionados de acordo com Islam et al. [4] com 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro. A amostra foi mantida na estufa a 37°C e 95% umidade. Após 3 horas, as amostras foram removidas do molde e mantidas em estufa até o período de 24 horas (n=6) e 21 dias (n=6), quando foram submetidas ao ensaio 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 e velocidade de 0,5 mm/minuto. A tensão máxima suportada foi calculada (MPa) com base na força máxima suportada e na área da base (mm^2) dos cilindros ($1 \text{ Pa}=1 \text{ N}/1\text{m}^2$).

Escoamento

O teste de escoamento foi realizado de acordo com a norma ISO 6876/2002 [20]. Após a manipulação do material, 0,05 mL de material foi colocado em placa de vidro (n=6). Após 3 minutos do início da manipulação, outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o cimento com um dispositivo de 100 gramas, totalizando 120 g, mantidos por 7 minutos. A mensuração foi realizada utilizando duas técnicas. Na primeira, foram medidos o maior e menor diâmetro de cada espécime, sendo necessária a diferença entre o maior e menor diâmetro inferior a 1 mm para a utilização da amostra. Para o segundo método, os corpos-de-prova foram fotografados ao lado de uma régua milimetrada. Após a obtenção das imagens, a área do cimento foi medida em mm^2 no programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00, como descrito por Tanomaru-Filho et al. [21], em análises com corpos-de-prova de guta-percha.

Para todos os testes, os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, e posteriormente, às análises de variância, seguidas por testes de Tukey, com nível de 5% de significância.

Ensaio da viabilidade celular – MTT

Cultura celular

Os cimentos foram avaliados em cultura de células quanto à viabilidade celular. Foram utilizadas células osteoblásticas da linhagem SAOS-2 (células ósseas derivadas de osteosarcoma humano). As células foram cultivadas em monocamadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Glasgow, UK), suplementado com 10% de soro fetal

bovino (FBS, Gibco, Glasgow, UK), 100 µg/mL de streptomicina e 100 IU/mL de penicilina, em frascos T-75 (Costar/Corning). Os sistemas de cultura foram mantidos à temperatura de 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade até atingir 80% de confluência, aproximadamente 72 horas após a primeira passagem. Nessa fase, as células em monocamada foram tripsinizadas por 2 minutos com solução de 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco). As células foram coletadas por centrifugação em tubos Falcon de 15 mL, diluídas 20 vezes em meio de cultura (DMEM) e contadas em hemocítmetro. Após a contagem, as células da linhagem SAOS-2 foram semeadas em placas individuais de cultura (placas de 96 poços para o teste MTT), numa densidade de 2×10^4 células por poço e incubadas durante 24 horas, nas mesmas condições anteriormente descritas, até atingir o crescimento celular exponencial. Em seguida, o meio de cultura foi renovado e as células foram expostas aos cimentos avaliados, nas mesmas condições de cultura acima descritas. Após o período de 24 horas de exposição, as células foram submetidas ao teste de viabilidade celular.

Preparo dos materiais

Os materiais foram preparados na proporção pó/líquido descrita na Tabela 1. Após o preparo, 500 mg de cada material foram colocados em tubos Falcon de 50 mL (BD Company, Franklin Lakes, NJ) e expostos à luz UV por 15 minutos. Os tubos Falcon contendo a amostra dos cimentos foram preenchidos com 10 mL de meio DMEM e incubados por 4 horas a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ para obtenção dos eluídos do cimento fresco (50 mg/mL). Posteriormente, outras diluições foram preparadas em DMEM nas concentrações de 10 e 2 mg/mL. Foram também avaliados os controles positivo (peróxido de hidrogênio 3%) e negativo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino).

Ensaio da viabilidade celular – MTT

O ensaio MTT avalia a atividade da enzima Succinato Desidrogenase Mitocondrial. O número de células viáveis é determinado pela redução do corante diphenyltetrazolium bromide (MTT). A quantidade do composto MTT formazan produzida pela atividade enzimática celular foi determinada por espectrofotometria. Após incubação das células em placas de 96 poços com os diferentes grupos de cimentos endodônticos (concentrações de 2 mg/mL, 10 mg/mL e 50 mg/mL) durante o período de 24 horas, os meios de cultura foram substituídos por 100 µL da solução de MTT, seguido de incubação por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o período de incubação, o MTT (Sigma Chemicals, St Louis, MO) foi removido e o produto colorimétrico formazan foi solubilizado em 200 µL de HCl/Isopropanol (0,04 N). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria empregando-se o comprimento de onda de 590 nm em leitor de ELISA. Os respectivos valores de absorbância foram transferidos para o programa Excel XP (Microsoft Corporation), sendo os resultados calculados, a partir fórmula descrita abaixo, submetidos à análise estatística pelos testes ANOVA e Posttest Fisher LSD, com nível de significância de 5%.

$$\text{Percentual de viabilidade celular} = (a-b) / (c-b) \times 100$$

a = OD 590 nm amostra teste

b = média da OD 590 nm dos “brancos”

c = média da OD 590 nm dos controles.

Resultados

Quantificação de arsênio

Todos os materiais avaliados apresentaram quantidade de arsênio semelhante em sua composição ($p>0,05$), conforme Tabela 2.

Radiopacidade

O MTA produziu radiopacidade superior aos demais materiais ($p<0,05$), conforme segue na Tabela 2. Os cimentos à base de silicato de cálcio com composições químicas diferentes do CSC convencional apresentaram menores valores de radiopacidade.

Tempo de presa

A Tabela 2 descreve o tempo de presa inicial e final dos materiais. O MTA apresentou tempo de presa inferior aos demais cimentos de silicato de cálcio avaliados ($p<0,05$). CSCR3 produziu tempo de presa inicial maior ($p<0,05$), enquanto que CSCR1 apresentou maior período de presa final ($p<0,05$).

Resistência à compressão

Os resultados obtidos demonstram que o CSC apresenta maior valor ($p<0,05$) de resistência à compressão, seguido pelo MTA, que também diferiu dos cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas ($p<0,05$), conforme Tabela 2.

Escoamento

O CSCR2 apresentou maior escoamento que os demais cimentos ($p<0,05$), independentemente do tipo de análise realizada (Tabela 2).

Ensaio da viabilidade celular – MTT

Os cimentos avaliados apresentam citocompatibilidade, com resultados semelhantes ao controle negativo, conforme figura 1.

Discussão

O MTA foi desenvolvido como material retrobturador e selador de perfurações e tem sido indicado para outras aplicações clínicas, como capeamento pulpar [22] e pulpotomia [23]. A composição básica do MTA é similar à do CP [9]. O MTA apresenta na composição óxido de bismuto adicionado ao CP na concentração de 20% para promover radiopacidade [24].

Um dos principais problemas para utilização clínica do CP ou cimento de silicato de cálcio é a possível presença de arsênio na sua composição [8]. De acordo com a norma ISO 9917-1 [25], a concentração de arsênio em cimentos dentais à base de água deve ser inferior a 2 mg/kg. Todos os cimentos avaliados no presente estudo apresentam arsênio em concentração similar (aproximadamente 0,1 mg/kg) estando em acordo com o estabelecido pela norma ISO 9917-1 [25]. Bramante et al. [8] detectaram 1,03 mg/kg de arsênio no MTA Angelus branco e 0,52 mg/kg no CP branco.

Os níveis de arsênio presentes no MTA e CP tem sido avaliados por diferentes metodologias [8,11], apontando resultados variáveis. A metodologia usada no presente estudo foi baseada na USEPA 3052/6010C [16], conforme Ilander & Väisänen [26]. Os autores determinaram a concentração de elementos tóxicos (arsênio, bário, cobalto, níquel, estrôncio, vanádio, zinco, cobre e chumbo) demonstrando efetividade para a metodologia empregada, capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de elementos como o arsênio.

De acordo com a ISO 6876 [20], os cimentos endodônticos devem apresentar radiopacidade superior a 3 mm de alumínio. Segundo a especificação ANSI/ADA no. 57 [27] os cimentos endodônticos devem apresentar radiopacidade superior a 2 mm/Al em relação à dentina. A radiopacidade do CP varia de 0,86 - 2,02 mm/Al [4,28,29], concordando com os resultados do presente estudo. No entanto, estes valores são menores que o recomendado aos

materiais seladores endodônticos pela ISO 6876 [20]. A radiopacidade do MTA vem sendo relatada na literatura com valores que variam de 6 a 8 mm/Al [5,30,31].

Coutinho-Filho et al. [30] avaliaram a radiopacidade do MTA, CP e CP acrescido de Bi_2O_3 . Uma relação entre concentração Bi_2O_3 e radiopacidade do CP foi observada. Bueno et al. [31] concluíram que a adição de 15% de óxido de bismuto possibilita radiopacidade necessária para um cimento endodôntico. Para uso clínico dos cimentos à base de silicato de cálcio analisados no presente estudo, é necessário adição de agentes radiopacificadores.

Embora o MTA apresente propriedade biológica adequada, sua inserção em cavidades retrógradas e perfurações radiculares apresenta dificuldade em função do tempo de presa, consistência e escoamento que contribuem para o possível deslocamento do material [32]. No presente estudo, o tempo de presa inicial e final do MTA foi inferior aos cimentos de silicato de cálcio, concordando com Vivian et al. [33]. Chiang & Ding [34] mostraram que a adição de 20% de óxido de bismuto ao CP reduz o tempo de presa. Embora os cimentos de silicato de cálcio com diferentes composições químicas apresentem maior tempo de presa, outros componentes associados ou, a exclusão do gesso presente no ProRoot MTA podem acelerar a presa [14].

Vários fatores influenciam a resistência à compressão do MTA e cimento à base de silicato de cálcio, como o uso de diferentes veículos, pH da mistura, condições de armazenamento [5]. O teste de resistência à compressão é regulamentado pela norma ISO 9917-1 [25]. Neste estudo, o CSC apresentou maior valor de resistência à compressão após 24 horas e 21 dias de manipulação, enquanto que os demais cimentos de silicato de cálcio apresentaram menores valores em ambos os períodos. Todos os cimentos avaliados tiveram aumento da resistência à compressão com o decorrer do tempo, concordando com os resultados obtidos por Camilleri [14].

Saliba et al. [29] e Camilleri [6] observaram que a adição de diferentes proporções de óxido de bismuto ao CP não compromete a resistência do material quando comparado com o CP puro. No entanto, Camilleri [35] observou que a adição do Bi_2O_3 ao MTA reduz a liberação de íons cálcio, aumenta a solubilidade e prejudica a estabilidade dimensional do material. Esses

resultados são corroborados por Coomaraswamy et al. [36], que mostraram que a adição deste radiopacificador ao CP pode aumentar gradativamente a porosidade relativa do material de 15 a 31%, diminuindo conseqüentemente a sua resistência à compressão. Além disso, o aumento da porosidade pode levar a um aumento da solubilidade e, portanto, à degradação do material. A adição do silicato dicálcico aos cimentos endodônticos tem mostrado aumentar a resistência à compressão do material [37]. O MTA apresenta aumento da sua resistência à compressão após 21 dias na presença de umidade [38]. A adição de minerais siliconados aumenta a resistência mecânica do cimento [39], pois as partículas desse aditivo agem na nucleação dos cristais de cálcio hidratado [40]. No presente estudo, os CSC com diferentes composições apresentaram baixa resistência mecânica.

Uma importante propriedade para o material retrobturador é a capacidade de escoamento [41]. O CSCR2, composto por silicato de cálcio contendo aditivos resinosos, apresentou maior escoamento que os demais cimentos avaliados. Essa propriedade merece destaque uma vez que pode favorecer o preenchimento da cavidade retrógrada durante seu uso clínico. O escoamento observado para o MTA Angelus foi de 6,37 mm, concordando com os resultados de Camilleri [42] para o Pro Root MTA branco.

A biocompatibilidade do CP tem sido avaliada em testes subcutâneos de ratos [12,31], estudos em cultura celular [13] e em procedimentos de capeamento pulpar direto [23] com resultados semelhantes ao MTA. Neste estudo, por meio do ensaio MTT, foi observado que todos os cimentos à base de silicato de cálcio contendo aditivos e resinas apresentam citocompatibilidade, independente da concentração do elúido utilizada.

Os cimentos de silicato de cálcio contendo aditivos e resinas apresentam resultados semelhantes ao MTA em relação à concentração de arsênio e ainda apresentam citocompatibilidade. Além disso, esses cimentos apresentam propriedades que sugerem sua utilização como alternativa ao MTA, em especial, por permitir um melhor escoamento e

facilidade de inserção do cimento na cavidade. No entanto, estudos são necessários avaliando materiais após associação com agentes radiopacificadores e aditivos.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio financeiro da Fapesp – número dos processos 2011/11292-7 e 2011/18239-4.

Referências

1. Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Duarte MA, Gonçalves M and Tanomaru JM. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *J Appl Oral Sci*, 2008; 16:376–379.
2. Torabinejad M, Watson TF and Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*, 1993; 19:591–595.
3. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS and Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *J Braz Dent*, 2000; 11:3-9.
4. Islam I, Chng HK and Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod*, 2006; 32:193-197.
5. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG and Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod*, 2006; 32:897–900.
6. Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J*, 2010; 43:231–240.
7. Porter ML, Bertó A, Primus CM and Watanabe I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. *J Endod*, 2010; 36:524–528.
8. Bramante CM, Demarchi AC, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LS and Duarte MA. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008; 106:909-913.
9. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD and Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod*, 1995; 21:295-299.
10. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM,

Tanomaru Filho M and de Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*, 2009; 35:737-740.

11. Chang SW, Baek SH, Yang HC, Seo DG, Hong ST, Han SH, Lee Y, Gu Y, Kwon HB, Lee W, Bae KS and Kum KY. Heavy Metal Analysis of Ortho MTA and ProRoot MTA. *J Endod*, 2011; 37:1673–1676.

12. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA and Dezan Junior E. Healing processo f dog dental pup after pulpotomy and pulp with miner mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J*, 2001; 12:109-113.

13. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K and Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003; 95:483-489.

14. Camilleri J. The properties of accelerated Portland cement for the endodontic use. *J Endod*, 2008; 41:151-157.

15. Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J and McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials*, 2002; 23:4001-401002.

16. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-Method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1996.

17. Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Guerreiro-Tanomaru JM and Gonçalves M. Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *J Endod*, 2007; 33:249-251.

18. Vivian RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Hungaro Duarte MA and de Moraes IG. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end-filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009; 108:35-38.

19. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M and Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod*, 2009;

35:550-554.

20. International Standards Organization. Dental root canal sealing materials. ISO 6876. 2002; 7-8.
21. Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Tanomaru JM and Bier CA. Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *AustEndod J*, 2007; 33:23-26.
22. Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, Souza V and Alessandro LD. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod*, 2008; 34:1-6.
23. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG and Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004; 98:376-379.
24. Beyer-Olsen EM and Orstavik D. Radiopacity of root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1981; 51:320-328.
25. International Standardization Organization 9917-1. Dentistry: Water-based Cements—Part 1: Powder/Liquid Acid-base Cements. Geneva, Switzerland: International Standardization Organization. 2007; 1-23.
26. Ilander A and Väisänen A. An ultrasound-assisted digestion method for the determination of toxic element concentrations in ash samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2007; 602:195-201.
27. ANSI/ADA. Specification no. 57 endodontic sealing material. ANSI/ADA, Chicago, IL, 2000.
28. Kim EC, Lee BC, Chang HS, Hong CU and Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicidade of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*, 2008; 105:54-57.
29. Saliba E, Abassi-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper SM and Camilleri J. Evaluation of the strength and radio-opacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide.

Int Endod J, 2009; 42:322–328.

30. Coutinho-Filho T, De-Deus G, Klein L, Manera G, Peixoto C and Gurgel-Filho ED. Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008; 106:69-77.

31. Bueno CE, Zeferino EG, Manhães LR Jr, Rocha DG, Cunha RS and De Martin AS. Study of the bismuth oxide concentration required to provide Portland cement with adequate radiopacity for endodontic use. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009; 107:65-69.

32. Lee YL, Lee BS, Lin FH, Yun Lin A, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. Biomater, 2004; 25:787–793.

33. Vivian RR, Ordinola Zapata R, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Hungaro Duarte MA, Tanomaru Filho M and Moraes IG. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010; 110:250-256.

34. Chiang TY and Ding SJ. Comparative physicochemical and biocompatible properties of radiopaque dicalcium silicate cement and mineral trioxide aggregate. J Endod, 2010; 36:1683-1687.

35. 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; 37:239–245.

36. Coomaraswamy KS, LumLey PJ and Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier cement on the material properties of endodontic Portland cement – based (MTA like) system. J Endod, 2007; 33:295-298.

37. Torabinejad M, Hong CU, Mc Donald F and Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root- end filling material. J Endod, 1995; 21:349-353.

38. Dammaschke T, Gerth HUV, Zuchner H and Schafer E. Chemical and physical surface and

bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater*, 2005; 21:731–738.

39. Bonavetti VL, Rahhal VF and Irassar EF. Evolución de la hidratación de los cementos con adiciones. *Mater Contr*, 2002; 52:57-64.

40. Bonavetti VL and Irassar EF. The effect of stone dust content in sand. *Cem Concr Res*, 1994; 24:580-590.

41. Bernardes RA, Junior DS, Duarte MA and Bramante CM. Evaluation of the flow rate of 3 endodontic sealers: Sealer 26, AH Plus, and MTA Obtura. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 2010; 109:47-49.

42. Camilleri J. Evaluation of Selected Properties of Mineral Trioxide Aggregate Sealer Cement. *J Endod*, 2009; 35:1412–1417.

Tabelas

Tabela 1- Materiais experimentais, procedência e proporções empregadas.

Material	Fabricante
MTA Angelus (MTA)	MTA, Angelus, Londrina, Brasil
	Proporção: 1 g: 0,33 mL
Cimento à base de silicato de cálcio (CSC)	CPB-40 estrutural Votoran, Votorantin cimentos, Camargo Correa Cimentos S.A., Pedro Leopoldo, MG, Brasil
	Proporção: 1g: 0,36 mL
Cimento à base de silicato de cálcio modificado contendo aditivos (CSCM)	Usina Fortaleza ICMF Ltda., Barueri, SP, Brasil
	-composição: agregados minerais, aditivos e pigmentos
	Proporção: 1 g: 0,25 mL
Cimento à base de silicato de cálcio resinoso 1 (CSCR1)	Usina Fortaleza ICMF Ltda., Barueri, SP, Brasil
	-composição: agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos
	Proporção: 1 g: 0,36 mL
Cimento à base de silicato de cálcio resinoso 2 (CSCR2)	Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil
	-composição: agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos
	Proporção: 1 g: 0,28 mL
Cimento à base de silicato de cálcio resinoso 3 (CSCR3)	Cimentolit Ind. e Com. Ltda., Charqueada, SP, Brasil
	-composição: agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos
	Proporção: 1 g: 0,30 mL

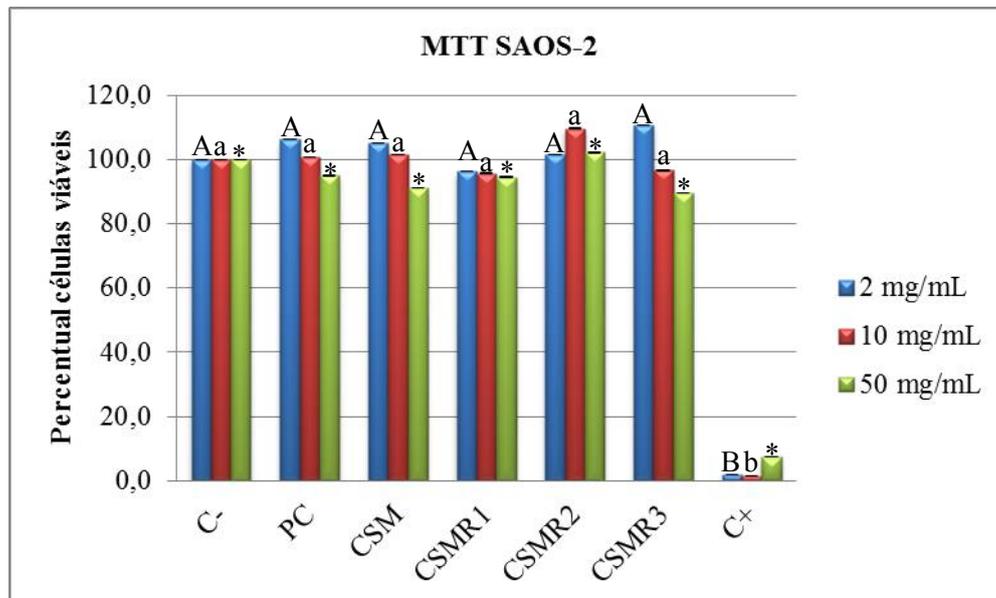
Tabela 2- Valores médios e desvio-padrão das propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos avaliados.

Materiais	Arsênio (mg/kg)	Radiopacidade (mmAl)	Tempo de presa (min)		Resistência à compressão (MPa)		Escoamento	
			Inicial	Final	24 horas	21 dias	mm	mm ²
CSC	0,09	1,13	104,0	198,0	35,44	93,77	6,18	28,7
	(0,017) ^a	(0,15) ^b	(0,0) ^b	(5,51) ^d	(7,50) ^a	(12,02) ^a	(0,67) ^c	(6,95) ^c
MTA	0,1	5,65	24,33	164,7	15,13	32,01	6,37	32,36
	(0,016) ^a	(0,47) ^a	(4,18) ^c	(8,64) ^d	(2,82) ^b	(7,77) ^b	(0,47) ^{bc}	(5,7) ^{bc}
CSCM	0,16	1,52	114,0	216,0	2,46	10,95	7,02	41,44
	(0,018) ^a	(0,12) ^b	(0,0) ^b	(12,93) ^c	(0,81) ^c	(1,50) ^c	(0,51) ^b	(10,61) ^b
CSCR1	0,1	1,13	113,2	367,8	1,68	4,96	6,39	34,32
	(0,015) ^a	(0,81) ^{bc}	(17,47) ^b	(38,14) ^a	(0,39) ^c	(0,65) ^c	(0,39) ^{bc}	(6,04) ^{bc}
CSCR2	0,1	1,05	116,0	286,7	2,97	4,93	8,52	56,25
	(0,015) ^a	(0,18) ^c	(12,65) ^b	(18,70) ^b	(0,59) ^c	(0,54) ^c	(0,99) ^a	(13,39) ^a
CSCR3	0,1	0,82	139,0	279,2	3,73	8,28	6,34	31,87
	(0,018) ^a	(0,07) ^c	(0,0) ^a	(5,52) ^b	(0,66) ^c	(1,35) ^c	(0,85) ^{bc}	(3,52) ^{bc}

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

Figuras

Figura 1- Valores médios e desvio-padrão dos resultados do ensaio de viabilidade celular dos diferentes materiais nas concentrações de 2 mg/mL, 10 mg/mL e 50 mg/mL.



3 Capítulo 2: Avaliação de propriedades físico-químicas de diferentes cimentos à base de silicato de cálcio associados à radiopacificadores micro e nanoparticulados*

*Artigo será submetido para publicação no periódico Clinical Oral Investigation

Resumo

Objetivos: Avaliar propriedades físico-químicas e mecânicas de dois cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas associados a diferentes radiopacificadores.

Materiais e Métodos: Foram avaliados os cimentos MTA Angelus, cimento de silicato de cálcio com aditivos (CSCM) e cimento de silicato de cálcio resinoso 2(CSCR2), acrescidos de radiopacificadores – óxido de zircônio (ZrO_2) microparticulado ou nanoparticulado, óxido de nióbio (Nb_2O_5) microparticulado ou nanoparticulado, óxido de bismuto (Bi_2O_3) ou tungstato de cálcio ($CaWO_4$). O tempo de presa foi avaliado por meio de agulha Gilmore. Análise do escoamento foi realizada segundo a norma ISO 6876. A solubilidade foi determinada pela porcentagem de perda de massa após imersão em água. A resistência à compressão foi avaliada após 24 horas e 21 dias da manipulação. O pH e liberação de íons cálcio foram analisados após os períodos 3, 12 e 24 horas, 7, 14 e 21 dias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados: Os materiais CSCM + $CaWO_4$ e CSCR2 + ZrO_2 micro, Nb_2O_5 e $CaWO_4$ apresentaram resultados semelhantes ao MTA, com tempo de presa final inferior às demais associações. CSCM ou CSCR2+ ZrO_2 micro apresentaram maior escoamento. Todos os cimentos avaliados apresentam baixa solubilidade. A resistência à compressão de todos os materiais aumentou no maior período de análise. Os materiais apresentaram pH alcalino e liberaram íons cálcio.

Conclusões: O radiopacificador ZrO_2 micro pode ser considerado como potencial substituto do Bi_2O_3 quando associado ao CSCM e ao CSCR2 por apresentar maior escoamento e menor tempo de presa.

Relevância clínica: Os materiais propostos, especialmente associados ao ZrO_2 representam cimentos retrobturadores com potencial para uso clínico após avaliações complementares.

Palavras-chave: Cimento Portland • Radiopacidade • Tempo de presa • Resistência à compressão • Cimento retrobturador • Agentes radiopacificadores

Introdução

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é considerado um material ideal para tratamento de perfurações, obturação retrógrada, além de outras indicações por apresentar excelente propriedade biológica e satisfatória propriedade físico-química [1-3]. Asgary et al. [4] relatam que o MTA e o Cimento Portland (CP) são cimentos à base de silicato de cálcio com composição similar, exceto pelo óxido de bismuto (Bi_2O_3) presente como agente radiopacificador do MTA.

O MTA apresenta tempo de presa longo [5], além da dificuldade de manipulação e inserção [6]. Diferentes modificações do CP são propostas pela adição de aditivos e resinas para melhora de suas propriedades de manipulação e presa [7]. Camilleri [2] observou que a adição do radiopacificador Bi_2O_3 ao

MTA reduz a liberação de hidróxido de cálcio, aumenta a solubilidade do material e prejudica a sua estabilidade dimensional. Novos radiopacificadores têm sido avaliados como alternativas ao Bi_2O_3 [8]. Húngaro Duarte et al. [8] observaram que o CP associado a Bi_2O_3 , óxido de zinco, óxido de chumbo, subnitrito de bismuto, carbonato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, tungstato de cálcio (CaWO_4) e óxido de zircônio (ZrO_2) proporcionaram maior radiopacidade que a dentina e o CP puro.

A substituição do Bi_2O_3 do MTA pelo ZrO_2 pode favorecer a bioatividade e melhorar as propriedades mecânicas do material [9,10]. Cutajar et al. [11] incorporaram ao CP diferentes concentrações de ZrO_2 e observaram que essa combinação apresenta radiopacidade, resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade similar ao ProRoot MTA. Camilleri et al. [12] relatam que a hidratação do CP acrescido de 30% de ZrO_2 pode favorecer o material aumentando o pH, liberação de íons cálcio e potencial bioativo. Antonijevic et al. 2013 relataram que o ZrO_2 pode ser utilizado como substituto do Bi_2O_3 no MTA, uma vez que este radiopacificador não alterou propriedades físicas do MTA [13]. Ainda, segundo Liu et al. [9], o emprego do ZrO_2 na forma nanoparticulada em cimentos ósseos, tem demonstrado bioatividade e citocompatibilidade. Li et al. 2013 [14] mostraram que a adição de 20% ZrO_2 nanoparticulado ao CP branco favorece a biocompatibilidade do CP.

Outro elemento químico com propriedades biológicas favoráveis é o Níbio (Nb), que tem sido utilizado em ligas de titânio de implantes endósseos devido à sua excelente biocompatibilidade [15] e resistência superior à corrosão e desintegração [16], além de apresentar potencial bioativo [17]. Seu emprego na forma nanoparticulada pode favorecer também a atividade antimicrobiana [17].

O CaWO_4 usado como agente radiopacificador do CP proporcionando pH alcalino e liberação de íons cálcio [18], resistência à compressão elevada [19], ação antimicrobiana [20] e compatibilidade biológica [21]. Além disso, quando associado ao CP na proporção de 20% proporciona radiopacidade de 3,11 mmAl [8].

A associação de cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas ao ZrO_2 ou Nb_2O_5 micro e nanoparticulado e ao CaWO_4 pode favorecer a radiopacidade e o potencial bioativo dos materiais, sendo importante a análise de suas propriedades para utilização clínica. O objetivo desse estudo foi avaliar propriedades físico-químicas e mecânica de dois cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas associados à radiopacificadores micro ou nanoparticulados.

Material e Métodos

Amostra

Foram avaliados dois cimentos com diferentes composições químicas. O cimento à base de silicato de cálcio contendo aditivos (CSCM, Usina Fortaleza ICMF Ltda., Barueri, SP, Brasil), composto de agregados minerais, aditivos e pigmentos e o cimento à base de silicato de cálcio resinoso 2 (CSCR2, Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil), composto de agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos. Ambos cimentos

de silicato de cálcio foram associados aos radiopacificadores ZrO_2 microparticulado (ZrO_2 micro, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), ZrO_2 nanoparticulado (ZrO_2 nano, Laboratório de nanotecnologia, Instituto de Física de São Carlos, SP, Brasil), Nb_2O_5 microparticulado (Nb_2O_5 micro, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), Nb_2O_5 nanoparticulado (Nb_2O_5 nano, Laboratório de nanotecnologia, Instituto de Física de São Carlos, SP, Brasil), Bi_2O_3 (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) ou $CaWO_4$ (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os radiopacificadores nanoparticulados foram obtidos pelo método precursor polimérico realizado pelo Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil). As associações foram realizadas na proporção de 70% do cimento de silicato e 30% de radiopacificador, sendo que para o Bi_2O_3 , a proporção foi de 80% do cimento de silicato e 20% do radiopacificador. O tamanho das partículas obtido para o ZrO_2 foi de 74 nm e para o Nb_2O_5 de 83 nm os quais foram confirmados pela análise da área de superfície Brunauer-Emmett-Teller. Os materiais foram manipulados com água destilada, em proporção definida após testes preliminares.

Tempo de presa

Para avaliação do tempo de presa, foram confeccionados 6 corpos-de-prova para cada material em anéis metálicos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. Para a presa inicial foi utilizada agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e ponta com diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm. Para a presa final, após o período de presa inicial, foi usada agulha de Gilmore de $456 \pm 0,5$ g de massa e $1 \pm 0,1$ mm de diâmetro na ponta. A avaliação do tempo de presa foi realizada segundo Bortoluzzi et al. [22], com avaliação a cada 3 minutos, durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e a cada 15 minutos até atingir o tempo de presa final. Os materiais foram mantidos na estufa a $37^\circ C$ durante a análise. Os tempos de presa foram determinados como o período entre a manipulação e momento em que cada agulha não produzisse marcas nos cimentos.

Escoamento

O teste de escoamento foi realizado de acordo com a norma ISO 6876 [23]. Após a manipulação, 0,05 mL de material foi colocado em placa de vidro ($n=6$). Após 3 minutos do início da manipulação, outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o cimento com um dispositivo de 100 g, totalizando 120 g, sendo mantidos por 7 minutos. A mensuração foi realizada utilizando duas técnicas. Na primeira foram medidos o maior e menor diâmetro do material na placa, sendo usadas amostras com diferença entre o maior e menor diâmetro inferior a 1 mm. Para o segundo método, os corpos-de-prova foram fotografados ao lado de uma régua milimetrada. Após a obtenção das imagens, a área do cimento foi medida em mm^2 no programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00, como descrito por Tanomaru-Filho et al. [24], antes e após a compressão.

Solubilidade

Moldes circulares plásticos foram confeccionados com 1,5 mm de altura e 7,75 mm de diâmetro interno. Cada molde foi posicionado sobre lamínula de vidro recoberta por película de papel celofane e preenchido com um material ($n=6$). Um fio de nylon foi incluído na massa do cimento e outra lamínula de vidro

também envolta por celofane foi posicionada sobre o molde. O conjunto foi pressionado manualmente e armazenado em estufa com temperatura de 37° C num intervalo de tempo de três vezes o tempo de presa de cada material. Os corpos-de-prova foram removidos dos moldes, pesados em balança de precisão HM-200 (A & D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA) e suspensos por meio dos fios de nylon no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 7,5 mL de água destilada e deionizada. Os recipientes permaneceram em estufa a 37°C por sete dias, quando os corpos-de-prova foram removidos da água destilada, enxaguados e colocados em desumidificador. A massa antes e após o experimento foi mensurada a cada 24 horas até a estabilização da massa. A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa original.

Radiopacidade

Foram utilizados anéis de teflon com diâmetro de 10 mm e 1 mm de altura para confecção de 6 corpos-de-prova para cada material. Os materiais foram mantidos a 37°C e 100% de umidade por 48 horas. Após esse período, foram posicionados sobre filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) ao lado de escala de alumínio, com variação de 2 a 16 mm de espessura. As radiografias foram realizadas em aparelho de raios-X GE 1000 (General Electric, Milwaukee, WI) ajustado a 50 kV, 10 mA e 18 pulsos por segundo, com distância focal de 33 cm. Os filmes foram processados em reveladora automática (A/T 2000®XR, Air Techniques Inc, Hicksville, Nova Iorque, EUA). Após digitalização com máquina fotográfica (Nikon D70), as imagens radiográficas foram avaliadas em software UTHSCSA ImageTool para Windows versão 3.0. Foi avaliada a equivalência em milímetros de alumínio para cada amostra, de acordo com Tanomaru-Filho et al. [25].

Resistência à compressão

Corpos-de-prova cilíndricos foram confeccionados de acordo com Islam et al. [26] com 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro. As amostras foram mantidas na estufa a 37°C e 95% umidade. Após 3 horas, as amostras foram removidas do molde e ficaram mantidas em estufa até o período de 24 horas (n=6) e 21 dias (n=6), quando foram submetidas ao ensaio 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 e velocidade de 0,5 mm/minuto. A tensão máxima suportada foi calculada (MPa) com base na força máxima suportada e na área da base (mm²) dos cilindros ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$).

pH e liberação de íons cálcio

Para os testes de pH e cálcio, tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n=10), sendo que as duas extremidades permaneceram abertas. Cada tubo foi imerso em 10 mL de água destilada e mantido na estufa a 37°C durante os períodos experimentais. A cada período, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco contendo 10 mL de água destilada. Os períodos experimentais foram 3, 12, 24 horas, 7, 14 e 21 dias. O pH das soluções foi medido imediatamente após o término de cada período experimental com um pHmetro Ultrabasic (Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA) previamente calibrado.

A quantificação de íons cálcio foi realizada em espectrômetro de absorção atômica H1170 Hilger & Watts (Rank Precision Industries Ltd. Analytical Division, London, United Kingdom). Para evitar potenciais interferências, as amostras e soluções padrões foram combinadas com 0,20 mol/L de solução contendo cloreto de lantânio e cloreto de potássio. A solução contendo os íons foi aspirada para de uma câmara de nebulização e transportada para a chama. A liberação de cálcio dos materiais foi quantificada usando lâmpada de cátodo oco específica para cálcio (comprimento de onda = 422,7 nm e janela de 0,7 nm) operada a 20 mA. As leituras obtidas a partir da análise das soluções contendo íons cálcio foram comparadas com uma curva padrão, obtida por diluições de uma solução de cálcio P.A. em água ultra pura.

Análise estatística

Para todos os testes, os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade. Comprovada a normalidade da distribuição dos dados amostrais, eles foram submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de 5% de significância.

Resultados

Tempo de presa

O CSCM associado ao ZrO₂ micro apresentou tempo de presa inicial semelhante ao MTA Angelus. Quanto ao tempo de presa final, o CSCM + CaWO₄ foi semelhante ao MTA Angelus. A utilização do radiopacificador Nb₂O₅ nano ao CSCM apresentou maior tempo de presa inicial e final ($p < 0,05$) (Tabela 1).

O CSCR2 associado ao ZrO₂ micro apresentou tempo de presa inicial semelhante ao MTA Angelus. Quanto ao tempo de presa final, a associação dos radiopacificadores ZrO₂ micro, Nb₂O₅ micro e CaWO₄ proporcionou resultados semelhantes ao MTA Angelus (Tabela 2).

Escoamento

A associação do CSCM com o ZrO₂ micro apresentou maior escoamento ($p < 0,05$) quanto ao diâmetro médio, e foi semelhante estatisticamente ($p > 0,05$) à associação do CSCM ao Nb₂O₅ micro quando o escoamento foi analisado pela área, conforme Tabela 1. Maior escoamento foi observado para associação do CSCR2 + ZrO₂ micro ($p < 0,05$) nas duas análises, por diâmetro ou área (Tabela 2).

Solubilidade

Todos os cimentos avaliados apresentaram baixa solubilidade e não diferiram estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$) (Tabelas 1 e 2). Na comparação entre os dois tipos de cimentos à base de silicato de cálcio, também não houve diferença estatística entre eles e o MTA ($p \geq 0,05$).

Radiopacidade

A associação de ambos os cimentos à base de silicato de cálcio aos radiopacificadores ZrO_2 micro, $CaWO_4$ e Bi_2O_3 foi semelhante ao MTA ($p \geq 0,05$) e superiores as demais associações, conforme Tabelas 1 e 2. Todos os cimentos apresentaram radiopacidade superior a 3 mmAl, como sugerido pela ISO 6876 [23].

Resistência à compressão

O MTA apresentou resistência significativamente superior aos demais materiais nos períodos de 24 horas e 21 dias (Tabelas 1 e 2).

pH e liberação de íons cálcio

Todas as associações do CSCM mostraram pH alcalino. Maiores valores de pH foram encontrados nos períodos experimentais de 3 horas, 7, 14 e 21 dias. As associações do CSCR2 mostraram maiores valores de pH nos períodos de 7, 14 e 21 dias, conforme dados das Tabelas 3 e 4. Todos os cimentos liberaram íons cálcio, sendo a maior quantidade de cálcio encontrado no período de 7 dias. O MTA apresentou mais cálcio nos períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,05$) em relação às associações dos CSCM e CSCR2 (Tabelas 3 e 4).

Discussão

O MTA e o CP são considerados materiais à base de silicato de cálcio [4] com propriedades físico-químicas, mecânicas [26], biológicas [21] e antimicrobianas [20] semelhantes. Modificações na formulação do MTA ou desenvolvimento de novos materiais à base de silicato de cálcio tem sido propostos [8]. Neste estudo, dois cimentos à base de silicato de cálcio com formulações modificadas foram avaliados. O CSCM é composto por agregados minerais, aditivos e pigmentos, enquanto o CSCR2 é composto de agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos.

A baixa radiopacidade do CP [8] torna necessária a adição de agente radiopacificador. O radiopacificador presente no MTA é o Bi_2O_3 . Porém, o Bi_2O_3 aumenta a porosidade do material, comprometendo a longevidade do cimento [27]. A radiopacidade do material permite a sua diferenciação do osso e dentina [28] e tem relação com o número atômico do elemento químico. Os radiopacificadores utilizados neste estudo apresentam massa atômica que permite ao material detecção radiográfica quando associados aos cimentos de silicato de cálcio. Os resultados mostram que todos os cimentos apresentaram radiopacidade superior a 3 mmAl, como sugerido pela ISO 6876 [23]. Húngaro Duarte et al. [8] mostraram que a adição do ZrO_2 e $CaWO_4$ ao CP resulta em um material com radiopacidade adequada.

O tempo de presa final das associações do CSCM + $CaWO_4$ e CSCR2 com ZrO_2 micro, Nb_2O_5 micro ou $CaWO_4$ foi semelhante ao MTA Angelus, e inferior às demais associações. Nenhum radiopacificador associado ao CSCM e ao CSCR2 proporcionou tempo de presa inicial e final inferior ao MTA Angelus, concordando com outros estudos [18]. Tanomaru-Filho et al. [19] observaram que a adição de ZrO_2 , Bi_2O_3 e $CaWO_4$ ao CP branco apresenta tempo de presa inicial semelhante ao MTA e que a associação do CP com ZrO_2

e Bi_2O_3 foi capaz de reduzir o tempo de presa final em relação ao CP puro. A adição do CaWO_4 , Bi_2O_3 e ZrO_2 ao CP branco aumenta o tempo de presa em relação ao CP branco [18].

Húngaro Duarte et al. [18] mostraram que o MTA branco apresenta maior solubilidade que o CP branco ou associação do CP com CaWO_4 , Bi_2O_3 e ZrO_2 . Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que todos os cimentos estão em acordo com a especificação da ANSI/ADA no. 57 [29], que estabelece que o grau de solubilização seja inferior a 3%. Os cimentos apresentaram baixa solubilidade e foram semelhantes ao MTA, o qual demonstra baixa solubilidade [30]. No entanto, Islam et al. [26] observaram que o CP branco apresenta solubilidade inferior ao MTA. Essas diferenças podem ser atribuídas ao tipo de CP utilizado em cada estudo.

O escoamento de materiais retrobturadores favorece o preenchimento e selamento da cavidade retrógrada. A associação do CSCM ao ZrO_2 micro proporcionou maior escoamento ($p < 0,05$) quanto ao diâmetro médio, e foi semelhante ($p > 0,05$) à associação deste cimento ao Nb micro, quando o escoamento foi analisado por área. Maior escoamento foi observado na associação do CSCR2 + ZrO_2 micro ($p < 0,05$) em ambas as análises, por área ou diâmetro. O escoamento observado para o MTA Angelus foi de 6,52 mm, concordando com os resultados obtidos por Camilleri [31] para o Pro Root MTA branco.

A resistência à compressão foi avaliada após 24 horas e 21 dias, uma vez que a literatura informa que o CP se solubiliza gradualmente nos fluidos [32] e que a resistência à compressão do MTA aumenta na presença de umidade após o período de 21 dias [33]. Além disso, a incorporação de aditivos ou diferentes líquidos no MTA mostra comprometer sua resistência [34]. Neste estudo foi observado aumento da resistência à compressão com o decorrer do tempo, para todos os materiais, confirmando com os resultados de Torabinejad et al. [33]. O MTA apresenta resistência maior que os cimentos experimentais em ambos os períodos de análise.

O pH alcalino proporcionado pelos cimentos pode ser relacionado à atividade biológica de indução de mineralização [35]. Os cimentos apresentaram pH alcalino, semelhante ao observado por Camilleri [36], que observou que o MTA e o CP associado a diferentes radiopacificadores promovem altos valores de pH. Os cimentos experimentais mostraram maiores valores de pH nos períodos de 7, 14 e 21 dias. O MTA apresentou maior alcalinidade que os demais materiais avaliados. De acordo com Camilleri [37], o pH alcalino é causado pela liberação de hidróxido de cálcio originado pela hidratação do cimento. Este estudo mostrou que os cimentos liberam íons cálcio. A liberação de íons cálcio foi maior no período de 7 dias, diminuindo nos períodos de 14 e 21 dias. A liberação de íons cálcio pelo MTA diminuiu com o tempo [35]. O MTA promoveu maior liberação de íons cálcio nos períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,05$) em relação às associações dos CSCM e CSCR2. Esses resultados podem ser explicados pelo mecanismo de hidratação do CP que possui quatro estágios, o período de pré-indução, a indução ou fase dormente, a aceleração e a fase pós-aceleração [38]. Durante o período de pré-indução (primeiros minutos) ocorre uma rápida dissolução iônica causada pela hidrólise do silicato tricálcico, sendo que nesta fase, pouco silicato dicálcico reage. Na fase de indução (primeiras duas horas), a hidratação de todos os minerais de clínquer progride muito lentamente. Após 3 a 12 horas da manipulação, correspondente a fase de aceleração, o progresso da hidratação acelera de novo e é controlado pela nucleação e crescimento dos produtos de hidratação resultantes. A hidratação do silicato dicálcico aumenta, o

hidróxido de cálcio cristalino precipita, e a concentração de íons cálcio diminui. Finalmente, no período pós-aceleração, a taxa de hidratação diminui gradualmente à medida que a quantidade de material não reagido diminui e a difusão do processo de hidratação torna-se controlada [38].

Embora materiais nanoparticulados possam favorecer propriedades biológicas [9,14], a adição de radiopacificadores nanoparticulados não alterou as propriedades físico-químicas do cimento de silicato de cálcio em relação aos radiopacificadores convencionais. Nanopartículas de prata associadas à resina também não modificaram as suas propriedades físico-químicas [39]. Outros estudos apontam que o tamanho das partículas afeta as propriedades dos materiais [40-42]. A associação do dióxido de titânio nanoparticulado ao CP aumentou sua resistência à compressão e à flexão e diminuiu seu tempo de presa [40]. A utilização do ZrO_2 e Nb_2O_5 nanoparticulados associados a cimentos endodônticos à base de CP afetaram o tempo de presa, resistência à compressão, escoamento e a espessura da filme [41]. A adição de 8% e 10% de dióxido de silício nanoparticulado ao MTA acelerou o processo de hidratação e reduziu o tempo de presa do MTA [42].

Com base no conjunto dos resultados obtidos, o ZrO_2 micro pode ser considerado como potencial agente radiopacificador para utilização em associação ao CSCM e ao CSCR2, por proporcionar menor tempo de presa inicial e favorecer o escoamento do material.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – número dos processos 2011/11292-7 e 2011/18239-4.

Referências

1. Hwang YC, Kim DH, Hwang IN, Song SJ, Park YJ, Koh JT, Son HH, Oh WM (2011) Chemical constitution, physical properties, and biocompatibility of experimentally manufactured Portland cement. *J Endod* 37:58-62.
2. Camilleri J (2011) 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* 37:239–245.
3. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, De Stefano Dorigo E, Rossi PL, Prati C (2010) Kinetics of apatite formation on a calcium-silicate cement for root-end filling during ageing in physiological-like phosphate solutions. *Clin Oral Investig* 14:659-668.
4. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieh S, Brink F (2009) Comparison of mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. *J Endod* 35:243–250.
5. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR (1995) Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 21:295-299.

6. Torabinejad M, White DJ (1995) Tooth filling material and use. Washington, DC: United States Patent & Trademark Office. Patent Number 5,769:638.
7. Karlinsey RL, Yi K, Duhn CW (2006) Nucleation and growth of apatite by a self-assembled polycrystalline bioceramic. *Bioinspir Biomim* 1:12-19.
8. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG (2009) Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod* 35:737-740.
9. Liu X, Huang A, Ding C, Chu PK (2006) Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO₂) films fabricated by cathodic arc deposition. *Biomaterials* 27:3904-3911.
10. Rodrigues DC, Gilbert JL, Hasenwinkel JM (2010) Two-solution bone cements with cross-linked micro and nano-particles for vertebral fracture applications: effects of zirconium dioxide content on the material and setting properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 92:13-23.
11. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J (2011) Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater* 27:879-891.
12. Camilleri J, Cutajar A, Mallia B (2011) Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater* 27:845-854.
13. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L (2013) The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig* [Epub ahead of print].
14. Li Q, Deacon AD, Coleman NJ (2013) The impact of zirconium oxide nanoparticles on the hydration chemistry and biocompatibility of white Portland cement. *Dent Mater J* 32:808-815.
15. Denry IL, Holloway JA, Nakkula RJ, Walters JD (2005) Effect of zirconium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75:18-24.
16. Ward LP, Strafford KN, Wilks TP, Subramanian C (1996) The role of refractory element based coatings on the tribological and biological behaviour of orthopaedic implants. *J Mater Proc Tech* 56:364-374.
17. Wang Z, Lee YH, Wu B, Horst A, Kang Y, Tang YJ, Chen DR (2010) Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere* 80:525-529.
18. Húngaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, Vivan RR, Gomes de Moraes I, Bombarda de Andrade F (2012) Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod* 38:394-397.
19. Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, Bosso R, Reis JM, Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM (2012) Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dent*. doi: 10.5402/2012/898051
20. Guerreiro-Tanomaru JM, Cornélio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M (2012) pH and Antimicrobial Activity of Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dent*. doi: 10.5402/2012/469019
21. Gomes Cornélio 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. *J Endod* 37:203-210.

22. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM (2009) The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod* 35:550-554.
23. British Standard Institution (2002) Dental root canal sealing materials. BS EN ISO 6876.
24. Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Tanomaru JM, Bier CA (2007) Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Aust Endod J* 33:23-26.
25. Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Guerreiro-Tanomaru JM, Gonçalves M (2007) Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *J Endod* 33:249-251.
26. Islam I, Chng HK, Yap AU (2006) Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod* 32:193-197.
27. Coomaraswamy KS, LumLey PJ, Hofmann MP (2007) Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTAlike) system. *J Endod* 33:295–298.
28. Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Bernardes RA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, de Moraes IG (2010) Influence of calcium hydroxide association on the physical properties of AH Plus. *J Endod* 36:1048-1051.
29. ANSI/ADA (2000) Specification no. 57: endodontic sealing materials. Chicago, IL: ANSI/ADA.
30. Danesh G, Dammaschke T, Gerth HU, Zandbiglari T, Schafer E (2006) A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *Int Endod J* 39:213–219.
31. Vivian RR, Ordinola-Zapata R, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Hungaro Duarte MA, Tanomaru Filho M, Gomes de Moraes I (2010) Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110:250–256.
32. Bodanezi A, Carvalho N, Silva D, Bernardineli N, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG (2008) Immediate and delayed solubility of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Appl Oral Sci* 16:127-131.
33. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 21:349–353.
34. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I (2006) The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* 32:569–572.
35. Duarte MAH, de Oliveria Demarchi ACC, Yamashita JC, Kuga MC, de Campos Fraga S (2003) pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95:345–347.
36. Camilleri J (2010) Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J* 43:231–240.
37. Camilleri J (2008) Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 41:408–417.
38. Camilleri J (2007) Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 40:462–470.
39. Chladek G, Kasperski J, Barszczewska-Rybarek I, Zmudzki J (2012) Sorption, solubility, bond strength and hardness of denture soft lining incorporated with silver nanoparticles. *Int J Mol Sci* 14:563-574.

40. Chateau R, Heydari V, Moradkhannejhad L, Safarpour M, Joo SW (2013) Self-cleaning and mechanical properties of modified white cement with nanostructured TiO₂. *J Nanosci Nanotechnol* 13:5109-5114.
41. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M (2013) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J*. doi:10.1111/iej.12167
42. Akbari M, Zebarjad SM, Nategh B, Rouhani A (2013) Effect of Nano Silica on Setting Time and Physical Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 39:1448–1451.

Tabelas

Tabela 1- Valores médios e desvio-padrão dos testes físico-químicos e mecânico do CSCM associado aos diferentes radiopacificadores.

	Tempo de presa (minutos)		Escoamento		Solubilidade (%)	Radio-pacidade (mmAl)	Resistência à compressão (MPa)	
	Inicial	Final	mm	mm ²			24 horas	21 dias
CSCM + ZrO₂ micro	20,0 (±0,0) d	365,0 (±30,0) c	7,8 (±0,5) a	48,71 (±5,0) a	0,99 (±0,8) a	5,94 (±0,9) a	2,17 (±0,1) b	3,56 (±0,4) b
CSCM + ZrO₂ nano	47,5 (±10,3) bc	488,8 (±7,4) b	6,78 (±0,4) bc	36,76 (±6,0) bc	1,91 (±1,0) a	4,34 (±0,23) b	0,58 (±0,1) b	2,34 (±0,7) b
CSCM + Nb₂O₅ micro	57,5 (±5,2) bc	480,7 (±17,4) b	7,04 (±0,2) b	40,69 (±4,5) ab	1,93 (±1,6) a	4,09 (±0,43) b	0,64 (±0,0) b	2,23 (±0,3) b
CSCM + Nb₂O₅ nano	100 (±10,4) a	555,5 (±14,2) a	6,31 (±0,2) c	32,04 (±3,4) bc	1,71 (±0,7) a	4,02 (±0,53) b	0,31 (±0,0) b	2,04 (±0,3) b
CSCM + Bi₂O₃	60,0 (±0,0) b	264,2 (±75,1) d	6,34 (±0,4) c	32,90 (±8,2) bc	2,01 (±1,5) a	5,78 (±0,53) a	0,69 (±0,0) b	6,41 (±0,7) b
CSCM + CaWO₄	47,33 (±8,8) c	197,3 (±31,1) e	6,18 (±0,4) c	31,35 (±4,2) c	0,52 (±0,1) a	5,67 (±0,51) a	1,46 (±0,4) b	3,57 (±0,7) b
MTA Angelus	24,33 (±4,1) d	175,2 (±4,1) e	6,52 (±0,2) bc	32,05 (±0,8) bc	0,30 (±0,0) a	5,96 (±0,74) a	14,79 (±2,8) a	32,01 (±7,7) a

*Letras iguais, na mesma coluna, indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$).

Tabela 2- Valores médios e desvio-padrão dos testes físico-químicos e mecânico do CSCR2 associado aos diferentes radiopacificadores.

	Tempo de presa (minutos)		Escoamento		Solubilidade (%)	Radiopacidade (mmAl)	Resistência à compressão (MPa)	
	Inicial	Final	mm	mm ²			24 horas	21 dias
CSCR2 + ZrO₂ micro	33,83 (±4,0) cd	163,5 (±53,8) c	10,25 (±0,6) a	82,59 (±10,2) a	1,02 (±1,3) a	5,28 (±1,0) a	0,60 (±0,1) b	6,02 (±0,6) b
CSCR2 + ZrO₂ nano	36,67 (±1,5) c	342,3 (±12,7) a	6,49 (±0,3) c	33,21 (±2,9) bc	1,15 (±0,4) a	3,91 (±0,1) b	0,37 (±0,0) b	2,70 (±0,5) b
CSCR2 + Nb₂O₅ micro	40,50 (±1,7) c	191,7 (±48,3) bc	6,97 (±0,4) bc	38,73 (±4,5) bc	1,21 (±1,1) a	3,45 (±0,3) b	0,43 (±0,0) b	2,89 (±0,1) b
CSCR2 + Nb₂O₅ nano	57,50 (±2,7) ab	379,2 (±18,8) a	6,93 (±0,3) bc	37,34 (±4,1) bc	1,67 (±0,7) a	3,61 (±0,4) b	0,37 (±0,0) b	2,28 (±0,3) b
CSCR2 + Bi₂O₃	61,50 (±9,2) a	226,5 (±26,3) b	7,15 (±0,3) bc	43,25 (±3,0) b	0,89 (±0,5) a	5,32 (±0,4) a	0,36 (±0,0) b	5,98 (±0,9) b
CSCR2 + CaWO₄	51,17 (±8,1) b	188,5 (±16,6) bc	7,39 (±0,3) b	44,06 (±6,0) b	0,92 (±0,8) a	5,18 (±0,6) a	0,52 (±0,1) b	2,18 (±0,2) b
MTA Angelus	24,33 (±4,1) d	175,2 (±4,1) bc	6,52 (±0,2) c	32,05 (±0,8) c	0,30 (±0,0) a	5,96 (±0,7) a	14,79 (±2,8) a	32,01 (±7,7) a

*Letras iguais, na mesma coluna, indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$).

Tabela 3- Valores médios e desvio-padrão de pH e liberação de íons cálcio nos diferentes períodos experimentais para o CSCM associado aos diferentes radiopacificadores.

	pH						Cálcio					
	3 horas	12 horas	24 horas	7 dias	14 dias	21 dias	3 horas	12 horas	24 horas	7 dias	14 dias	21 dias
CSCM + ZrO₂ micro	8,14 (±0,2) b	8,60 (±0,1) ac	8,03 (±0,1) b	8,98 (±0,5) d	8,60 (±0,3) c	8,20 (±0,1) bc	1,62 (±0,6) c	1,42 (±0,1) a	1,50 (±0,2) ab	4,65 (±0,3) c	3,41 (±10,4) c	4,02 (±0,4) a
CSCM + ZrO₂ nano	9,03 (±0,7) ab	8,51 (±0,3) bc	7,99 (±0,1) b	9,12 (±0,6) cd	8,81 (±0,6) bc	8,82 (±0,4) a	5,95 (±3,5) a	2,07 (±0,8) a	1,83 (±0,4) a	4,92 (±1,2) c	4,46 (±1,2) bc	3,69 (±0,6) ab
CSC M+ Nb₂O₅ micro	8,79 (±0,3) b	8,36 (±0,1) c	7,92 (±0,1) b	9,51 (±0,1) bd	9,09 (±0,2) ac	8,87 (±0,2) a	3,19 (±2,0) bc	1,95 (±0,8) a	1,25 (±0,3) b	4,95 (±0,8) c	4,47 (±1,2) bc	3,91 (±0,7) a
CSC M+ Nb₂O₅ nano	9,00 (±0,5) ab	8,69 (±0,1) ab	7,86 (±0,1) b	9,55 (±0,5) bc	9,26 (±0,3) ab	8,58 (±0,2) ab	3,84 (±1,9) ac	1,92 (±0,4) a	1,90 (±0,3) a	5,77 (±1,0) bc	4,19 (±0,5) bc	3,05 (±0,4) b
CSCM+ Bi₂O₃	8,58 (±0,2) b	8,81 (±0,2) a	8,41 (±0,3) a	9,81 (±0,1) ab	9,25 (±0,5) ab	8,18 (±0,4) bc	1,76 (±0,5) c	1,97 (± 0,3) a	1,76 (±0,5) a	6,59 (±0,6) b	5,31 (±1,6) b	4,13 (±0,6) a
CSCM + CaWO₄	8,23 (±0,2) b	7,32 (±0,1) e	7,33 (±0,2) c	9,15 (±0,2) cd	8,58 (±0,3) c	7,88 (±0,2) c	1,58 (±0,4) c	1,41 (± 0,1) a	1,20 (±0,2) b	5,15 (±0,9) c	4,28 (±0,6) bc	3,0 (±0,3) b
MTA Angelus	9,50 (±0,2) a	7,67 (±0,2) d	7,98 (±0,3) b	10,29 (±0,1) a	9,60 (±0,1) a	8,93 (±0,3) a	5,34 (±1,8) ab	1,79 (± 0,6) a	1,36 (±0,4) a	10,85 (±1,3) a	7,55 (±1,4) a	4,62 (±1,2) a

*Letras iguais, na mesma coluna, indicam semelhança estatística (p≥0,05).

Tabela 4- Valores médios e desvio-padrão de pH e liberação de íons cálcio nos diferentes períodos experimentais para o CSCR2 associado aos diferentes radiopacificadores.

	pH						Cálcio					
	3 horas	12 horas	24 horas	7 dias	14 dias	21 dias	3 horas	12 horas	24 horas	7 dias	14 dias	21 dias
CSCR2 + ZrO₂ micro	7,31 (±0,1) c	7,07 (±0,1) d	6,93 (±0,1) c	8,83 (±0,6) c	8,11 (±0,4) c	7,93 (±0,4) c	1,26 (±0,3) c	1,97 (±0,6) a	0,85 (±0,3) b	6,49 (±1,9) b	3,26 (±0,7) d	2,50 (±0,3) b
CSCR2 + ZrO₂ nano	7,40 (±0,1) c	7,01 (±0,1) d	6,93 (±0,1) c	9,46 (±0,1) b	8,48 (±0,6) bc	7,98 (±0,3) c	1,34 (±0,3) c	1,62 (±0,3) a	1,10 (±0,1) a	6,88 (±1,9) bc	5,44 (±1,5) b	4,09 (±2,0) b
CSCR2 + Nb₂O₅ micro	7,25 (±0,1) c	6,97 (±0,1) d	6,90 (±0,1) c	9,39 (±0,1) bc	8,57 (±0,5) bc	8,17 (±0,4) bc	1,77 (±0,6) bc	1,60 (±0,4) a	1,21 (±0,2) a	5,33 (±0,9) b	3,41 (±0,3) d	3,45 (±1,1) b
CSCR2 + Nb₂O₅ nano	7,18 (±0,1) c	6,98 (±0,1) d	6,88 (±0,1) c	9,44 (±0,2) bc	8,78 (±0,6) bc	8,69 (±0,4) ab	1,14 (±0,4) c	1,35 (±0,5) a	1,38 (±0,4) a	7,75 (±3,7) b	4,41 (±0,9) bd	8,62 (±4,4) a
CSCR2 + Bi₂O₃	8,37 (±0,4) b	8,00 (±0,2) a	7,49 (±0,1) b	8,98 (±0,4) bc	9,16 (±0,5) ab	8,83 (±0,5) a	2,94 (±1,3) b	1,93 (±0,3) a	1,28 (±0,1) a	4,90 (±0,4) c	4,78 (±0,6) bc	3,44 (±0,8) b
CSCR2 + CaWO₄	8,60 (±0,3) b	7,40 (±0,1) c	7,44 (±0,1) b	8,93 (±0,5) c	8,41 (±0,5) c	7,93 (±0,1) c	2,84 (±0,9) b	2,03 (±0,6) a	1,40 (±0,3) a	4,88 (±0,9) c	3,88 (±0,6) c	2,95 (±0,2) b
MTA Angelus	9,5 (±0,2) a	7,87 (±0,2) b	7,98 (±0,3) a	10,29 (±0,1) a	9,60 (±0,1) a	8,93 (±0,3) a	5,34 (±1,8) a	1,79 (±0,6) a	1,36 (±0,4) a	10,85 (±1,3) a	7,55 (±1,4) a	4,62 (±1,2) b

*Letras iguais, na mesma coluna, indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$).

4 Capítulo 3: Cimentos à base de silicato de cálcio associados a radiopacificadores micro e nanoparticulados. Propriedades físico-químicas e biológicas*

*Artigo será submetido para publicação no Journal of Endodontics

Resumo

Introdução: O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um cimento de silicato de cálcio. O objetivo deste estudo foi avaliar propriedades físicas e biológicas de uma formulação de cimento de silicato de cálcio com aditivos (CSCM) e outra com resina (CSCR2), associados aos agentes radiopacificadores: óxido de zircônio (ZrO_2) e óxido de nióbio (Nb_2O_5) nas formas micro e nanoparticulada, tungstato de cálcio ($CaWO_4$) e óxido de bismuto (Bi_2O_3). O MTA Angelus foi utilizado como controle. **Métodos:** A avaliação da superfície foi realizada em microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de energia dispersiva de Raios X (EDS-X). Os testes MTT e apoptose/necrose foram realizados para avaliação da viabilidade das células após contato com materiais. Os dados obtidos foram submetidos aos testes análise de variância e Tukey, com nível de significância de 5%. **Resultados:** Todos os cimentos apresentaram cálcio, silício e alumínio na composição. CSCM e CSCR2 apresentam maior tamanho das partículas que o MTA. Os testes de MTT e apoptose/necrose mostraram que os cimentos são biocompatíveis. Os CSCM e CSCR2 tiveram um percentual de células viáveis semelhante ao grupo controle negativo ($p \geq 0,05$). **Conclusões:** Ambos cimentos à base de silicato de cálcio apresentam potencial para uso alternativo ao MTA quando associados aos radiopacificadores avaliados.

Introdução

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) tem sido classificado como cimento à base de silicato de cálcio (1) e foi introduzido para selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e superfície externa dentária. Sua aplicação clínica inclui capeamento pulpar direto, obturação retrógrada, apicigênese e apicificação, tratamento de fraturas radiculares, reabsorções interna e externa e selamento de perfurações (2). Suas indicações são atribuídas à sua biocompatibilidade, alcalinidade (valor de pH 12,5), capacidade seladora e bioatividade (3).

MTA e o cimento Portland (CP) apresentam composição química similar e são cimentos à base de silicato de cálcio. O MTA apresenta na composição o CP como principal componente (4) e óxido de bismuto (Bi_2O_3) para promover radiopacidade (5). As propriedades físicas, químicas, mecânicas, biológicas e antimicrobianas do CP e MTA são semelhantes (6-8).

O Bi_2O_3 presente no MTA pode comprometer propriedades físicas, mecânicas e biológicas do cimento (9-11). Desta forma, novos radiopacificadores são avaliados como alternativas ao Bi_2O_3 . Como exemplos, o óxido de zircônio (ZrO_2) e tungstato de cálcio ($CaWO_4$) quando incorporados ao CP resultam em cimentos com radiopacidade superior à da

dentina (12) e acima do valor mínimo recomendado pela especificação 57 da ANSI/ADA (13). A associação de ZrO_2 e $CaWO_4$ ao CP não demonstra citotoxicidade (8). O Nióbio (Nb) pode promover radiopacidade e melhorar as propriedades biológicas de materiais devido à sua biocompatibilidade (14) e bioatividade (15). Sua utilização na forma nanoparticulada demonstra potencial bioativo e antimicrobiano (16).

A biocompatibilidade do CP é conhecida (8), mas suas diferentes formulações podem modificar suas propriedades. Ainda a associação aos diferentes agentes radiopacificadores como ZrO_2 e óxido de nióbio (Nb_2O_5) na forma micro e nanoparticulada ou o $CaWO_4$ microparticulado pode favorecer a propriedade biológica dos materiais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar a composição química e biocompatibilidade de dois cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas em associação a diferentes radiopacificadores.

Material e Métodos

Amostra

Foram avaliados dois cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas associados à radiopacificadores micro e nanoparticulados (Tabela 1). Os radiopacificadores nanoparticulados foram obtidos pelo método precursor polimérico no Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil). O tamanho das partículas para o ZrO_2 foi de 74 nm e para o Nb_2O_5 de 83 nm os quais foram confirmados pela análise da área de superfície Brunauer-Emmett-Teller. Os materiais foram manipulados com água destiladas seguindo as proporções da Tabela 1.

Tabela 1- Grupo de materiais avaliados e proporção pó-líquido.

Material	Proporção pó-líquido
MTA Branco*	1 g - 300 µL
Cimento à base de silicato de cálcio contendo aditivos (CSCM)** + 30% Óxido de Zircônio (Zr ₂ O) microparticulado****	1 g - 200 µL
CSCM + 30% Óxido de Zircônio (Zr ₂ O) nanoparticulado*****	1 g - 360 µL
CSCM + 30% Óxido de Nióbio (Nb ₂ O ₅) microparticulado****	1 g - 340 µL
CSCM + 30% Óxido de Nióbio (Nb ₂ O ₅) nanoparticulado *****	1 g - 390 µL
CSCM + 20% Óxido de Bismuto (Bi ₂ O ₃) microparticulado****	1 g - 260 µL
CSCM + 30% Tungstato de cálcio (CAWO ₄) microparticulado*****	1 g - 200 µL
Cimento à base de silicato de cálcio resinoso 2 (CSCR2)*** + 30% Óxido de Zircônio (Zr ₂ O) microparticulado	1 g - 235 µL
CSCR2 + 30% Óxido de Zircônio (Zr ₂ O) nanoparticulado	1 g - 340 µL
CSCR2 + 30% Óxido de Nióbio (Nb ₂ O ₅) microparticulado	1 g - 380 µL
CSCR2 + 30% Óxido de Nióbio (Nb ₂ O ₅) nanoparticulado	1 g - 380 µL
CSCR2 + 20% Óxido de Bismuto (Bi ₂ O ₃) microparticulado	1 g - 250 µL
CSCR2 + 30% Tungstato de cálcio (CaWO ₄) microparticulado	1 g - 220 µL

*MTA, Angelus, Londrina, Brasil

**Cimento à base de silicato de cálcio (CSC), Usina Fortaleza ICMF Ltda., Barueri, SP, Brasil (composição: agregados minerais, aditivos e pigmentos)

***Cimento à base de silicato de cálcio resinoso 2 (CSCR2), Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil

****Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil

*****Laboratório de nanotecnologia, Instituto de Física de São Carlos, SP, Brasil

*****Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA

Análise da superfície e composição química

Para a análise morfológica da superfície dos diferentes grupos experimentais, os materiais foram manipulados e inseridos em moldes cilíndricos de 6 mm de diâmetro e 12 mm de altura. Os espécimes foram mantidos na estufa, a 37°C e imersos em água destilada durante 28 dias. Após este período, os corpos-de-prova foram secos com papel absorvente e mantidos num dessecador a vácuo contendo sílica durante 24 horas. Os espécimes foram incluídos em resina e polidas em máquina de polimento automática (EcoMet® 250 Grinder-Polisher Family, Illinois, USA). Após nova secagem, os espécimes foram colocados em stubs, banhados em carbono e examinados por microscopia eletrônica de varredura (JEOL – JSM – 6610LV, Tokyo, Japão) em diferentes magnitudes (50X, 500X e 1000X) em modo retroespalhado e por elétrons secundários. Todas as análises foram realizadas a 18 kV e SS 68. Além disso, a análise por espectrometria de energia dispersiva de Raios X (EDS) (Thermo Scientific, Madison, USA) foi realizada nas imagens obtidas com aumento de 1000X.

Ensaio da viabilidade celular

Para cada material, 1 g foi pesado em balança analítica de precisão HM-200 (A & D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA), manipulado com água destilada nas devidas proporções em placas de vidro estéreis e acomodados no fundo de placas de cultura de 12 poços. As placas foram levadas em estufa a 37°C e umidade durante 15 horas para completa presa dos materiais. Após esse período, as placas foram expostas a luz UV durante 30 minutos para prevenção de contaminação e 5 mL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino (Sigma/Aldrich) foi colocado em cada poço. A placa permaneceu por 24 horas em estufa (37°C, 95% umidade e 5% CO₂) para formação do eluído de cada material. Após 24 horas, esse meio foi coletado e três diluições foram realizadas para exposição às células (1:2, 1:4 e 1:8).

Cultura de células

Foram utilizadas células osteoblásticas humanas (Saos-2, linha ATCC HTB-85) por meio de monocamada em frascos T-75 (Corning, Union City, CA), contendo meio de cultura DMEM (Sigma/Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS-Gibco/Life Technologies), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As células foram cultivadas duas vezes por semana a 37°C, 95% de umidade, 5% de CO₂. As células aderentes em fase logarítmica de crescimento foram removidas por uma mistura de tripsina/EDTA 0,25% (Gibco- BRL, Gaithersburg, MD) a 37°C durante 3 minutos.

MTT

Esse ensaio é baseado na habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO) em compostos coloridos de formazan, cuja absorvância é proporcional à quantidade de células vivas. Após contagem e transferência das células osteoblásticas SAOS-2 (7×10^4) para placas de 96 poços com meio de cultura DMEM 5% SFB (Soro fetal bovino- Gibco/Invitrogen), as células foram expostas durante 24 horas com as respectivas diluições dos eluídos dos cimentos (200 μ L/cada) e os controles negativo (DMEM sem SFB) e positivo (peróxido de hidrogênio 3%). Após o período de 24 horas, o meio de cultura foi trocado por DMEM sem SFB contendo 5 mg/mL de MTT e as placas incubadas por 3 horas. Depois disso, cada poço foi lavado com 1 mL de tampão fosfato (PBS 1X) e 500 μ L de álcool isopropílico acidificado (HCl: isopropylalcohol, 0,04 N) foi adicionado ao extrato para solubilizar o formazan. A densidade óptica (570 nm) foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT). O experimento foi realizado em triplicata.

Detecção de apoptose/ necrose

O cultivo das células foi obtido da mesma forma como descrito acima para o teste MTT. O eluído utilizado foi na concentração de 1:8.

Foram transferidas 1×10^6 células SAOS-2 para a placa de 96 poços, após o contato com os eluídos dos cimentos em placas de cultura de 24 poços. O teste foi realizado por meio do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA). Após 24 horas de contato com os eluídos dos cimentos, as células foram lavadas e coletadas dos poços das placas de cultura com detergente não enzimático (*Cell dissociation buffer*- Gibco/Life Technologies), resuspendidas em tampão *Binding Buffer* 1X (0,1 mol/L HEPES/NaOH; 1,4 mol/L NaCl; 25 mmol/L CaCl_2 – pH: 7,4) e coradas com os marcadores para apoptose: FITC Annexin V e/ou PI (*Propidium Iodide Staining Solution*- 50 μ g/mL), além dos controles não marcados e controle positivo (Camptotecina 1 mmol/L- Sigma/Aldrich). Todos os tubos *ependorfs* foram incubados por 15 minutos na ausência de luz e foi adicionado mais 400 μ L de *Binding Buffer* 1X em cada amostra. As análises foram realizadas em Citômetro de fluxo (BD FACS Verse 4C) de acordo com os parâmetros do kit: Células viáveis (FITC-/ PI-); Células em apoptose inicial (FITC+/ PI-); Células em apoptose final (FITC+/ PI+); Necrose celular.

Análise dos resultados

Para os testes MTT e apoptose/necrose, os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade, sendo esta comprovada, foram posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA para comparação dos diferentes grupos entre si e ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com 5% de significância.

Resultados

Análise da superfície e composição química

As micrografias eletrônicas para os dois tipos de cimentos à base de silicato de cálcio, o CSCM e CSCR2 estão apresentadas nas figuras 1a e 1b, respectivamente. O MTA foi utilizado como controle. Todos os materiais pela análise EDS-X demonstraram picos de cálcio, silício e alumínio indicando uma fase de aluminato que é característico de cimentos tipo Portland e diferente de cimentos puros à base de silicato tricálcico. O tamanho de partícula do CSCM e CSCR2 foi maior do que a do MTA. Todos os diferentes radiopacificadores utilizados foram visíveis nas micrografias eletrônicas. Os radiopacificadores apareceram brilhantes devido a sua alta massa atômica. O ZrO₂ nanoparticulado apresentou partículas com tamanhos maiores que o ZrO₂ microparticulado. A hidratação do cimento foi evidente pela presença de hidrato de silicato de cálcio e etringita nas imagens de elétrons secundários com ampliações mais elevadas (Figura 2).

MTT

As figuras 3a e 3b mostram o efeito dos cimentos sobre as células SAOS-2 após contato com os eluídos dos cimentos por um período de 24 horas. Os dados apontam que todos os cimentos apresentaram biocompatibilidade, com destaque para as menores concentrações. No eluído com diluição 1:4, o MTA apresentou viabilidade celular inferior ($p < 0,05$) ao controle negativo e às associações do CSCM e CSCR2, exceto para a associação CSCR2 + ZrO₂ microparticulado.

Apoptose/necrose

Todos os cimentos à base de silicato de cálcio apresentaram viabilidade celular e tiveram um percentual de células viáveis semelhante ao grupo controle negativo ($p \geq 0,05$). O MTA apresentou maior índice de células viáveis, sendo semelhante à associação do CSCM + CaWO_4 ($p \geq 0,05$). Todos os CSCM apresentaram apoptose e necrose celular em percentual semelhante ao controle negativo ($p \geq 0,05$), exceto a associação do CSCM + CaWO_4 que apresentou maior percentual de apoptose ($p < 0,05$) (Figura 4a).

Os CSCR2 apresentaram alto percentual de células viáveis semelhante ao controle negativo e ao MTA ($p \geq 0,05$). Todos os cimentos com CSCR2 apresentaram apoptose celular em percentual inferior ao controle negativo ($p < 0,05$). Quanto à necrose celular, não houve diferença entre os cimentos avaliados e o controle negativo ($p \geq 0,05$) (figura 4b).

Discussão

Um material retrobturador ideal deve promover selamento, apresentar baixa solubilidade, ser biocompatível e demonstrar potencial bioativo. A substituição do Bi_2O_3 por ZrO_2 associado ao CP demonstra propriedades física, mecânica e bioatividade adequados (17, 18). Outra possibilidade de utilização do ZrO_2 está em seu uso na forma nanoparticulada, por demonstrar bioatividade e citocompatibilidade (19) e melhorar as propriedades mecânicas e físicas de materiais (20, 21).

Metais como o nióbio tem merecido destaque para uso em materiais odontológicos (22), por apresentar excelente resistência à corrosão, não ser alergênico ou tóxico (23), ser biocompatível (24) e tem demonstrado capacidade de promover a formação de apatita (15). O Nb_2O_5 na forma nanoparticulada apresenta atividade antimicrobiana (16). O CaWO_4 vem sendo estudado como agente radiopacificador associado ao CP (8, 12, 25) apresentando adequada biocompatibilidade (8), além de não alterar a propriedade mecânica e o tempo de presa final do CP (25).

A análise da superfície do MTA (26), tamanho e forma da partícula (27) demonstra que o cimento apresenta superfície homogênea e pequenas partículas. Materiais com superfície lisa e regular podem promover menor irritação tecidual (2). Dammaschke et al. (29) afirmam que as características da superfície de um material podem indicar sua biocompatibilidade, influenciando diretamente na adesão e distribuição celular.

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que os CSCM e CSCR2 apresentam morfologia de superfície típica de materiais à base de CP com partículas de diferentes tamanhos,

enquanto o MTA apresenta partículas mais finas e homogêneas, conforme Dammaschke et al. (29) e Hwang et al. (30).

Os radiopacificadores estudados demonstraram diferentes tamanhos e morfologias das partículas. Os cimentos com ZrO_2 nanoparticulado formaram aglomerados com morfologias distintas, enquanto que os cimentos acrescidos de Nb_2O_5 nanoparticulado apresentaram partículas menores e mais dispersas. A micrografia por elétrons secundários demonstrou o processo de hidratação do cimento, com formação de hidrato de silicato de cálcio e etringita. A análise por EDS-X dos cimentos MTA e dos dois cimentos à base de silicato de cálcio com diferentes composições químicas indicam que todos os materiais apresentam semelhanças nos seus componentes, como os elementos cálcio, alumínio e silício.

Os cimentos retrobturadores devem apresentar biocompatibilidade, uma vez que a toxicidade pode promover degeneração dos tecidos periapicais e atraso no reparo (31). O CP e MTA não são genotóxicos (32), e apresentaram biocompatibilidade semelhante (31). No entanto, existem poucos relatos sobre a biocompatibilidade do CP e outras formulações de cimentos à base de silicato de cálcio acrescidos de agentes radiopacificadores.

Os radiopacificadores ZrO_2 , $CaWO_4$ e Nb_2O_5 são biocompatíveis (8,14). A associação do Nb_2O_5 a cimentos cerâmicos de fluorapatita não promove citotoxicidade (14). Gomes-Cornélio et al. (8) observaram que o CP associado aos radiopacificadores ZrO_2 , Bi_2O_3 e $CaWO_4$ não são citotóxicos. O presente estudo demonstrou que todos os cimentos apresentam biocompatibilidade. Na diluição do cimento 1:4, o MTA apresentou viabilidade celular inferior às associações do CSCM e CSCR2, exceto para CSCR2 + ZrO_2 microparticulado. Hwang et al. (30) observaram que o MTA apresenta viabilidade celular maior do que o CP. No entanto, achados similares em estudos de citotoxicidade usando o teste MTT revelam respostas favoráveis do CP puro e/ou modificado associado ou não a agentes radiopacificadores (8, 33).

Apoptose constitui um mecanismo fisiológico de morte celular endógena, desencadeada por meio de estímulos internos ou externos, fisiológicos ou patológicos. A necrose representa a morte celular por dano celular excessivo, devido a um estímulo patológico (34). Ensaios de detecção de apoptose e necrose são importantes para avaliação de metais como radiopacificadores em cimentos ou para avaliar a biocompatibilidade de novos cimentos à base de silicato de cálcio. As alterações por apoptose ocorrem como consequência da citotoxicidade de drogas e patologias (35). Por outro lado, agentes citotóxicos, como os metais, podem levar ao estresse oxidativo e induzir a apoptose (8).

O teste apoptose/necrose foi realizado por meio do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I frente à linhagem celular SAOS-2. Os achados apontam que todos os CSCM e CSCR2 demonstraram viabilidade celular com percentual de células viáveis semelhante ao grupo controle negativo. As avaliações com CSCM apresentaram percentual de apoptose e necrose celular semelhante ao controle negativo, enquanto que os CSCR2 apresentaram apoptose celular em percentual inferior e necrose celular semelhante ao controle negativo. Desta forma, confirma-se que estes cimentos apresentam biocompatibilidade, assim como observado pelo ensaio de MTT. Gomes-Cornélio et al. (8) observaram, por meio de teste de apoptose/necrose em microscopia de fluorescência, que as células após exposição ao CP associado aos radiopacificadores ZrO_2 , Bi_2O_3 ou $CaWO_4$ não apresentaram alterações morfológicas.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, todas as associações apresentaram composição semelhante ao MTA e também mostraram não ser citotóxicos. Na menor concentração, os cimentos à base de silicato de cálcio mostraram viabilidade celular semelhante ao MTA. Desta forma, conclui-se que os cimentos à base de silicato de cálcio avaliados neste estudo apresentam potencial para uso alternativo ao MTA quando associados aos radiopacificadores estudados.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – número dos processos 2011/11292-7 e 2011/18239-4.

Referências

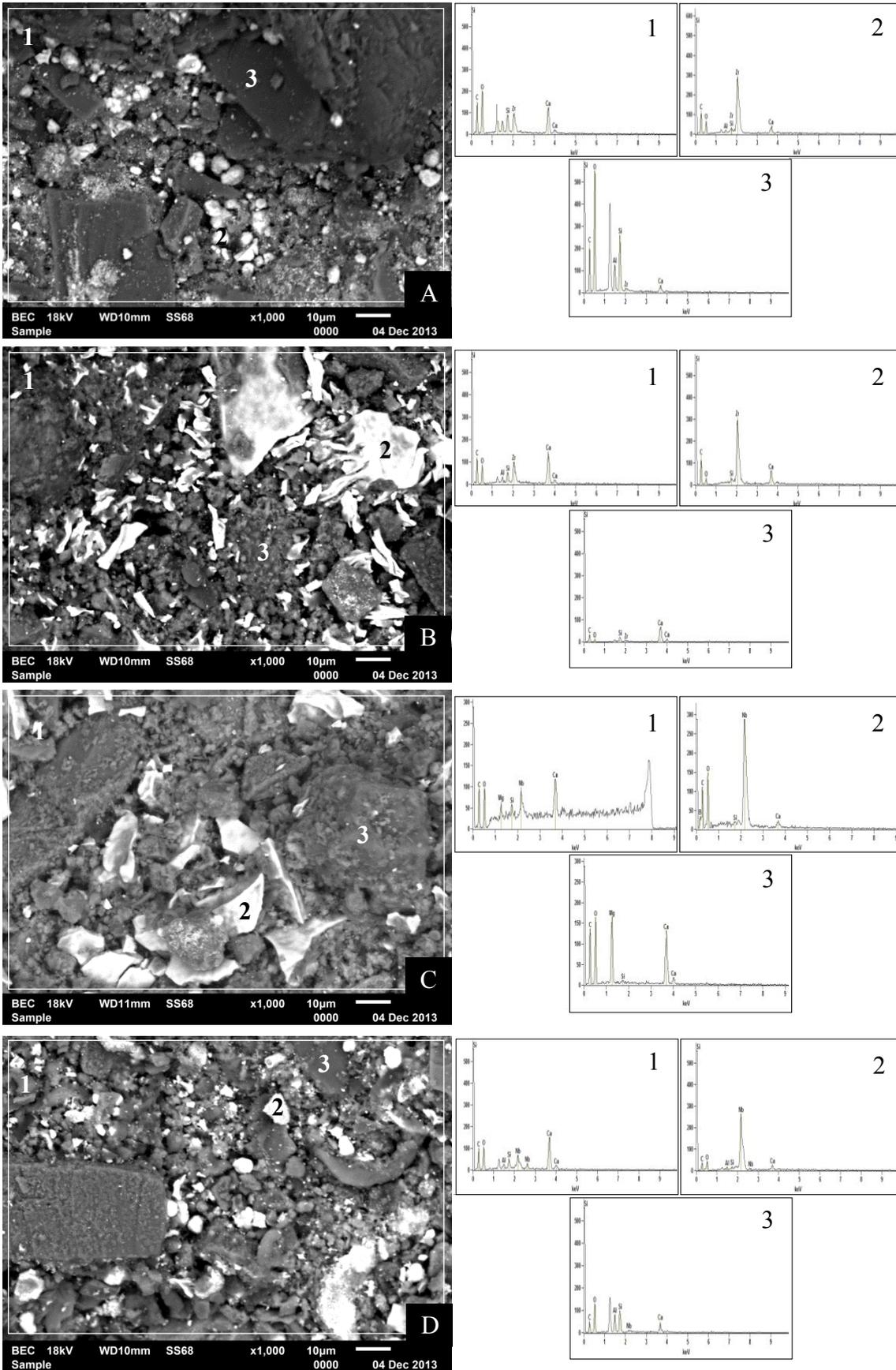
1. Darvell BW, Wu RC. “MTA”- an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dent Mater* 2011;27:407–22.
2. Anthonappa RP, King NM, Martens LC. Is there sufficient evidence to support the long-term efficacy of mineral trioxide aggregate (MTA) for endodontic therapy in primary teeth? *Int Endod J* 2013;46:198-204.
3. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2011;36:400–13.
4. Torabinejad M, White DJ. United States Patent 5,415,547 1995;16.

5. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddsi J, Kheirieh S, Brink F. Comparison of Mineral Trioxide Aggregate's Composition with Portland Cements and a New Endodontic Cement. *J Endod* 2009;35:243–50.
6. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod* 2006;32:193-97.
7. Chang SW, Shon WJ, Lee W, Kum KY, Baek SH, Bae KS. Analysis of heavy metal contents in gray and white MTA and 2 kinds of Portland cement: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:642-6.
8. Gomes Cornélio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Citotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* 2011;37:203–10.
9. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2004;37:699–704.
10. Coomaraswamy KS, LumLey PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTAlike) system. *J Endod* 2007;33:295–8.
11. 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;37:239–45.
12. Húngaro-Duarte MA, de Oliveira El, Kadre GD, et al. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod* 2009;35:737–40.
13. ANSI/ADA. Specification no. 57: endodontic sealing materials. Chicago, IL: ANSI/ADA. 2000.
14. Denry IL, Holloway JA, Nakkula RJ, Walters JD. Effect of nionium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;75:18-24.
15. Karlinsey RL, Yi K, Duhn CW. Nucleation and growth of apatite by a self-assembled polycrystalline bioceramic. *Bioinspir Biomim* 2006;1:12-9.
16. Wang Z, Lee YH, Wu B, et al. Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere* 2010;80:525-9.
17. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater* 2011;27:879-91.
18. 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;27:845-54.

19. Liu X, Huang A, Ding C, Chu PK. Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO_2) films fabricated by cathodic arc deposition. *Biomaterials* 2006;27:3904-11.
20. Gillani R, Ercan B, Qiao A, Webster TJ. Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. *Int J Nanomedicine* 2010;2:1-11.
21. Rodrigues DC, Gilbert JL, Hasenwinkel JM. Two-solution bone cements with cross-linked micro and nano-particles for vertebral fracture applications: effects of zirconium dioxide content on the material and setting properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;92:13-23.
22. Ferracane J. *Materials in dentistry*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Maryland 2001;285.
23. Gladwin M, Bagby M. *Clinical aspect of dental materials: Theory, practice, and cases*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Maryland 2004;167-8.
24. Shibata K, Kamegai A. *Titanium in dentistry: Biocompatibility of titanium*. Quintessence, Tokyo 1988;35-41.
25. Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, et al. Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dent* 2012;2012:898051.
26. Tingey MC, Bush P, Levine MS. Analysis of Mineral Trioxide Aggregate Surface when Set in the Presence of Fetal Bovine Serum. *J Endod* 2008;34:45-9.
27. Komabayashi T, Spangberg LS. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *J Endod* 2008;34:94-8.
28. Spangberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials: 1-toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973;35:402-14.
29. Dammaschke T, Gerth HU, Zuchner H, Schafer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater* 2005;21:731-8.
30. Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:96-102.
31. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J* 2005;38:604-9.
32. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white portland cements. *J Endod* 2005;31:605-7.

33. Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J* 2010;43:843-8.
34. Li J, Huang CY, Zheng RL, Cui KR, Li JF. Hydrogen peroxide induces apoptosis in human hepatoma cells and alters cell redox status. *Cell Biol Int* 2000;24:9-23.
35. Nikitakis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:476–90.

Figuras



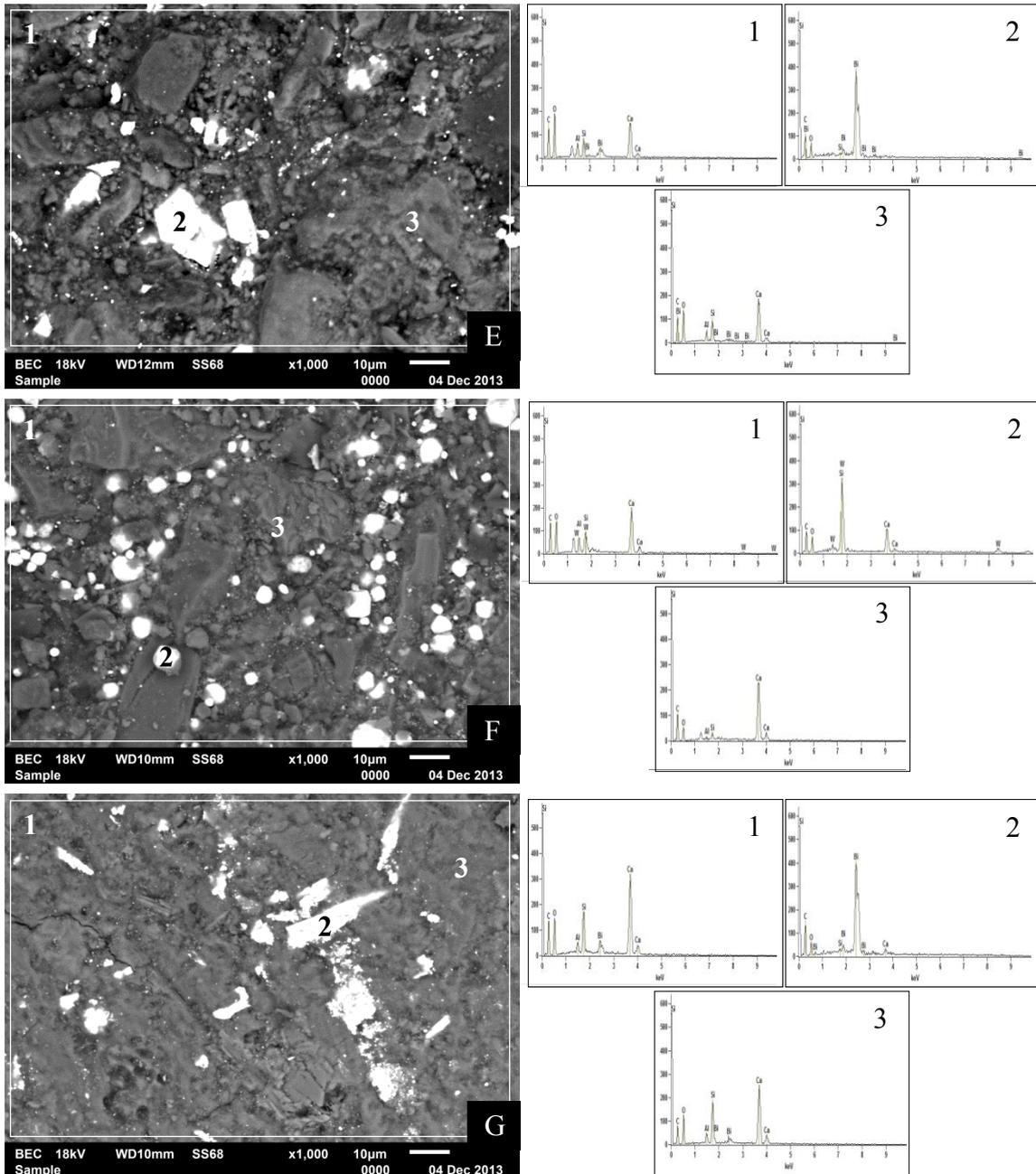
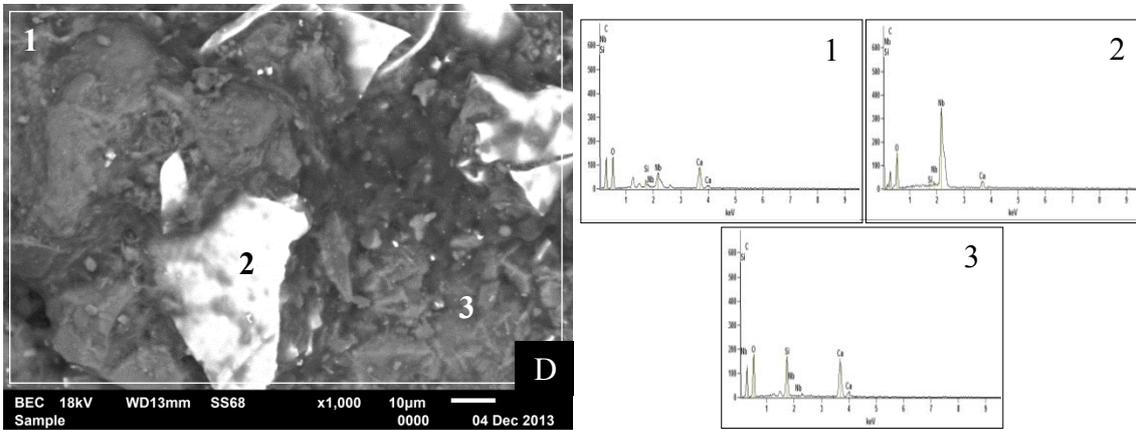
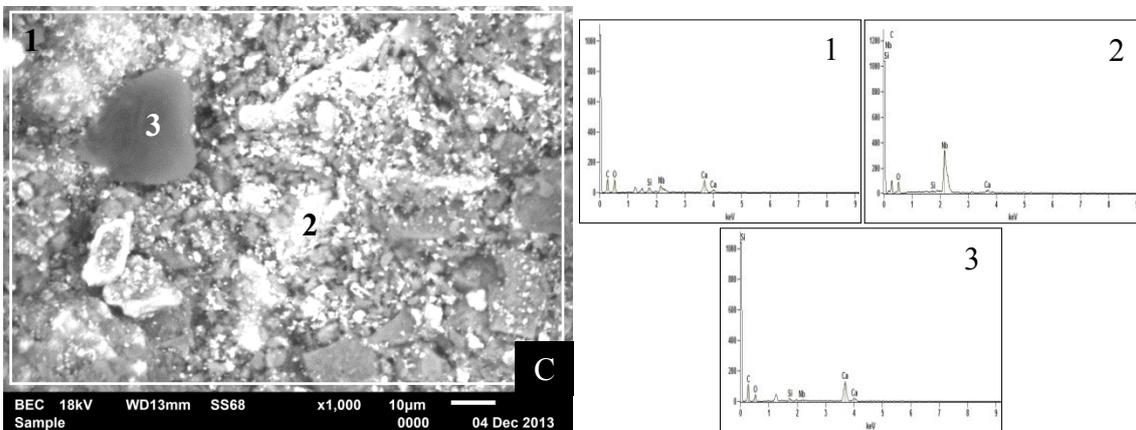
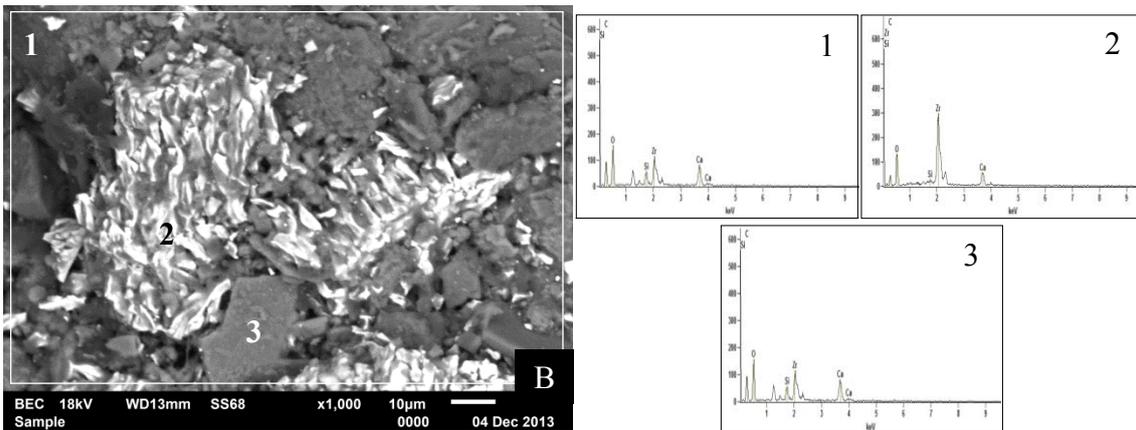
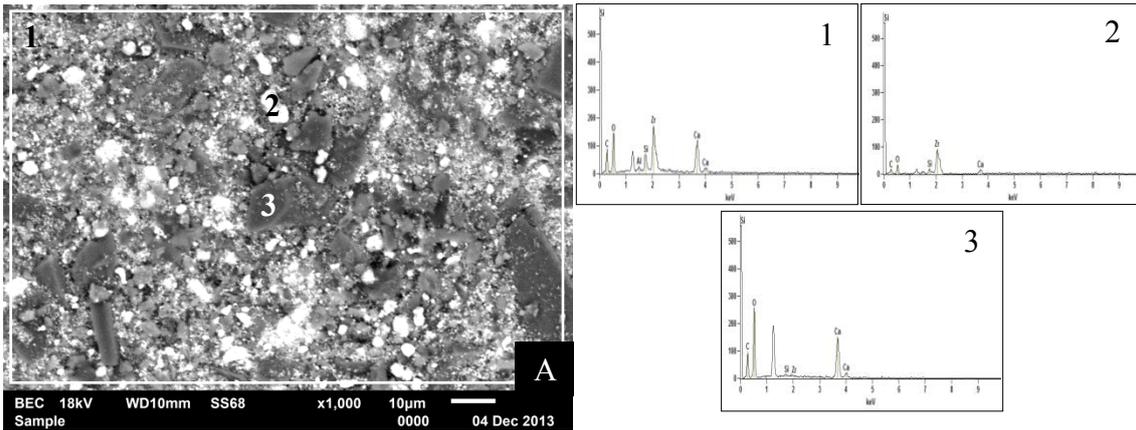


Figura 1a: Micrografia eletrônica retroespalhada (magnificação de 1000 X) e EDS das amostras do CSCM associado aos radiopacificadores (A) ZrO_2 micro, (B) ZrO_2 nano, (C) Nb_2O_5 micro, (D) Nb_2O_5 nano, (E) Bi_2O_3 , (F) $CaWO_4$ e o cimento (G) MTA com respectivas análises por espectrometria de energia dispersiva de Raios X nos pontos marcados como 1, 2 e 3.



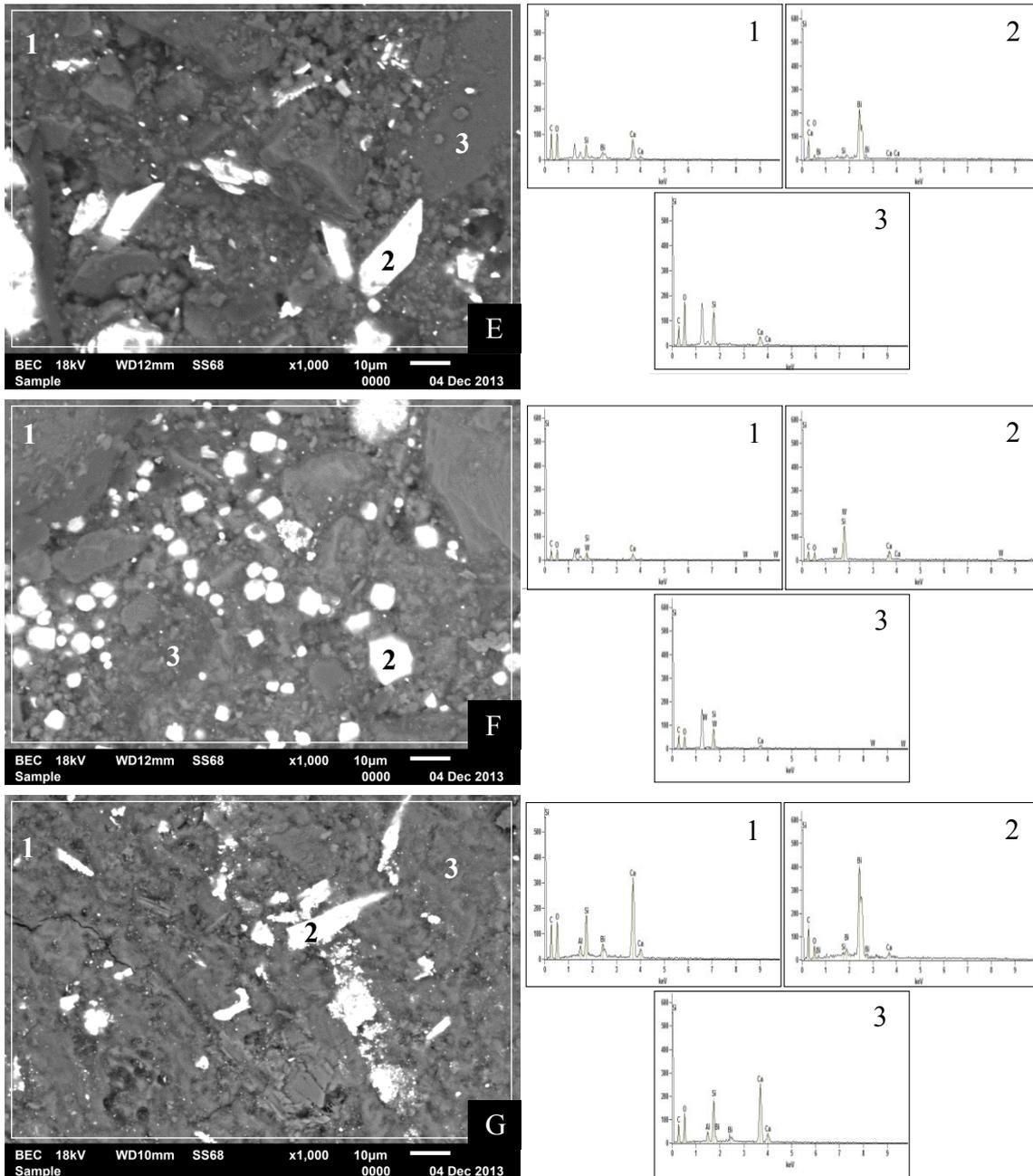


Figura 1b: Micrografia eletrônica retroespalhada (magnificação de 1000 X) e EDS das amostras do CSCR2 associado aos radiopacificadores (A) ZrO_2 micro, (B) ZrO_2 nano, (C) Nb_2O_5 micro, (D) Nb_2O_5 nano, (E) Bi_2O_3 , (F) $CaWO_4$ e o cimento (G) MTA com respectivas análises por espectrometria de energia dispersiva de Raios X nos pontos marcados como 1, 2 e 3.

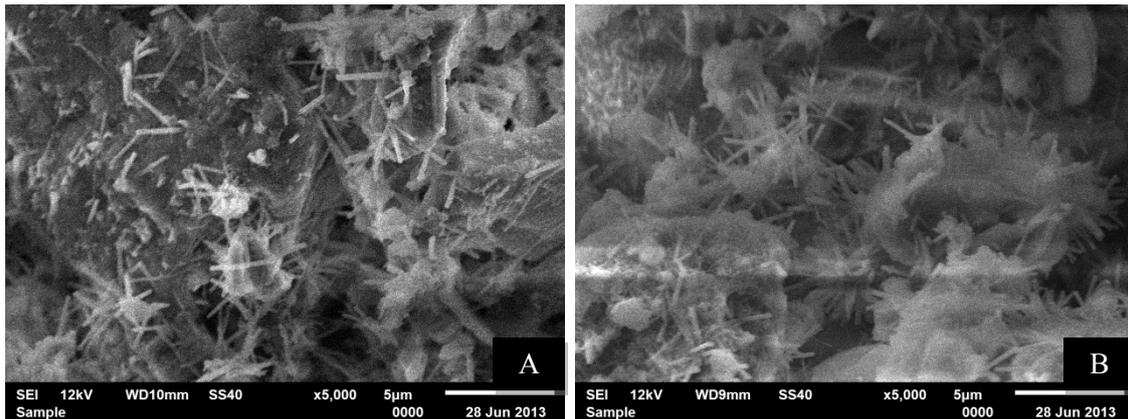
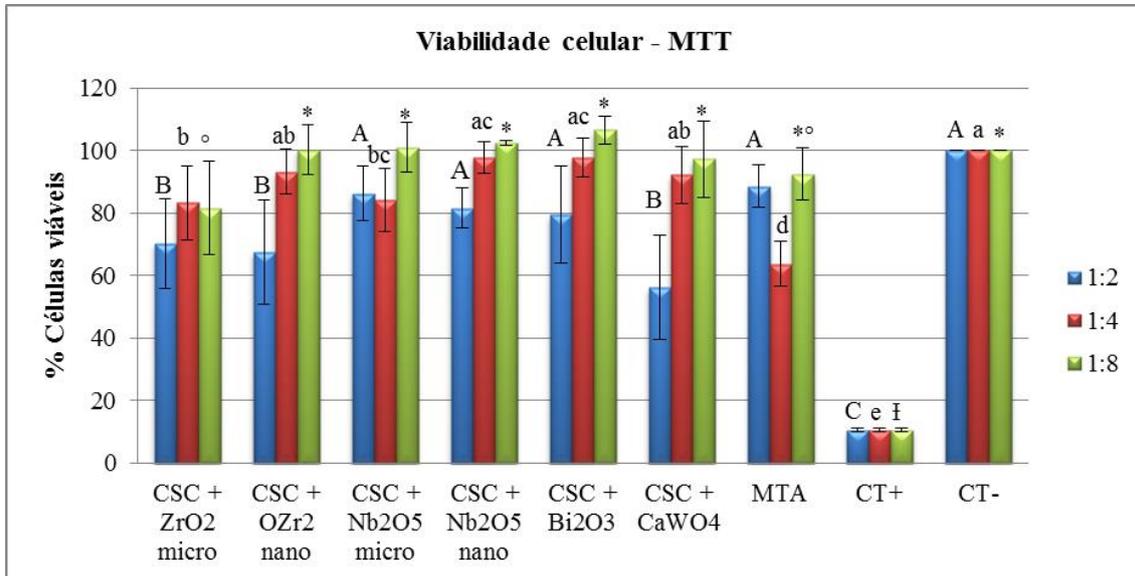


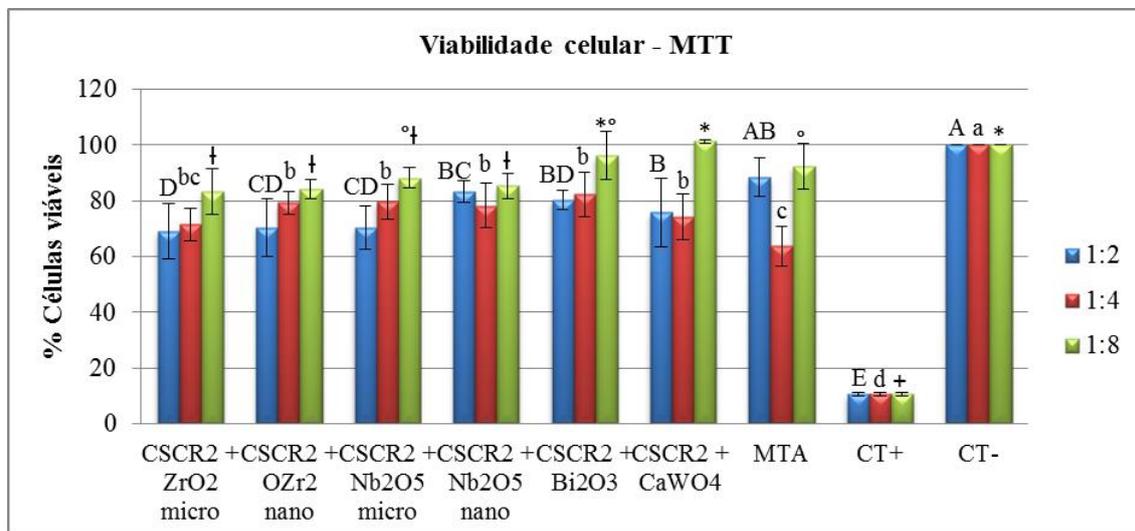
Figura 1b: Micrografia eletrônica de varredura por elétrons secundários após hidratação dos cimentos com aspecto de favos de mel do silicato de cálcio hidratado e agulhas de etringita (A e B).

Figura 3a- Valores médios e desvio-padrão do ensaio de viabilidade celular do CSCM associado aos radiopacificadores no período de 24 horas, nas concentrações de 1:2, 1:4 e 1:8.



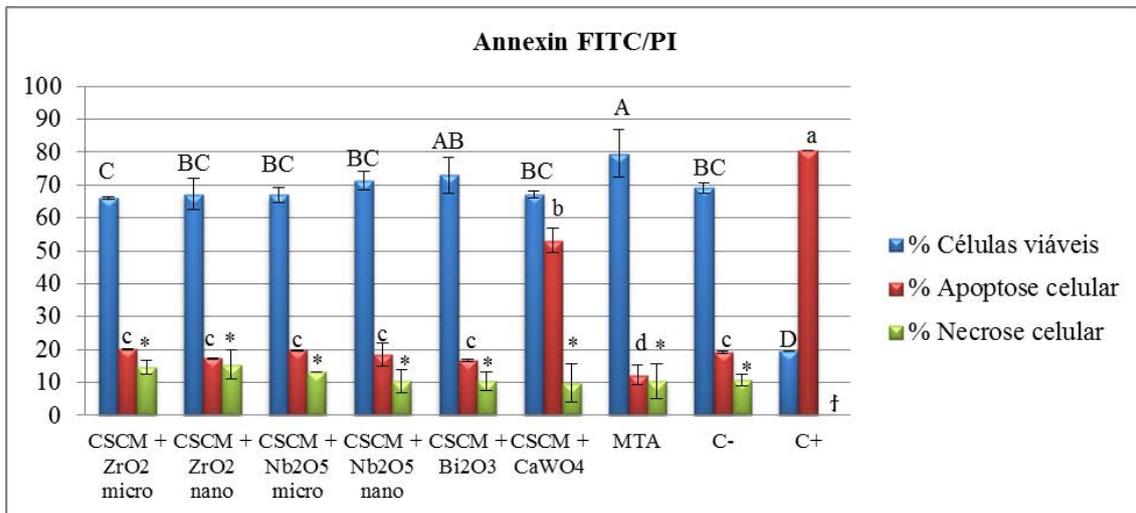
Letras maiúsculas iguais na primeira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para a concentração de 1:2 ($p \geq 0,05$). Letras minúsculas iguais na segunda coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para a concentração de 1:4 ($p \geq 0,05$). Símbolos iguais na terceira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para a concentração de 1:8 ($p \geq 0,05$). C- = controle negativo; C+ = controle positivo

Figura 3b- Valores médios e desvio-padrão do ensaio de viabilidade celular do CSCR2 associado aos radiopacificadores no período de 24 horas, nas concentrações de 1:2, 1:4 e 1:8.



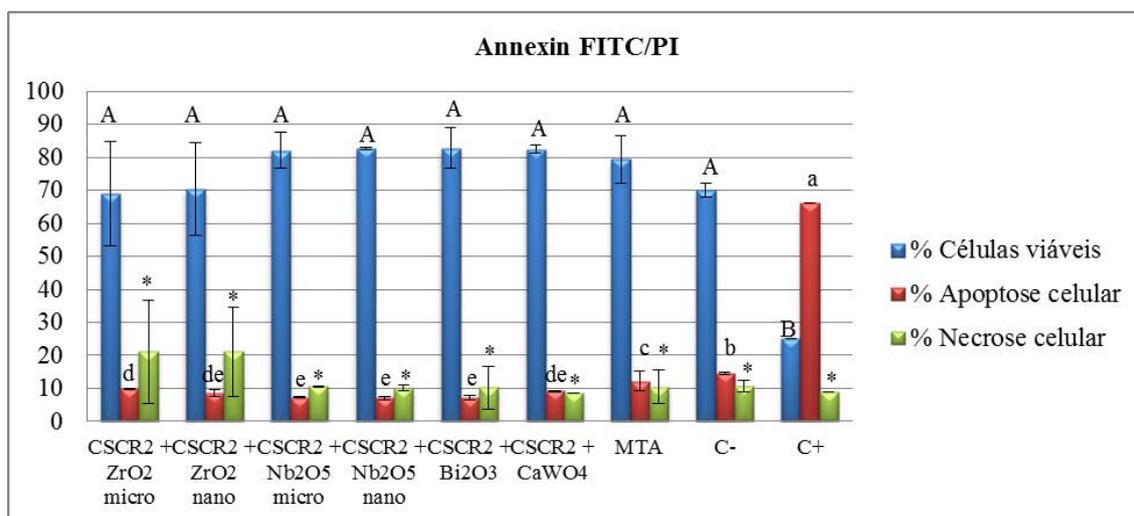
Letras maiúsculas iguais na primeira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para a concentração de 1:2 ($p \geq 0,05$). Letras minúsculas iguais na segunda coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para a concentração de 1:4 ($p \geq 0,05$). Símbolos iguais na terceira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para a concentração de 1:8 ($p \geq 0,05$). C- = controle negativo; C+ = controle positivo

Figura 4a- Valores médios e desvio-padrão do ensaio de apoptose/necrose do CSCM associado aos radiopacificadores no período de 24 horas, na concentração de 1:8.



Letras maiúsculas iguais na primeira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para o percentual de células viáveis ($p \geq 0,05$). Letras minúsculas iguais na segunda coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para o percentual de apoptose celular ($p \geq 0,05$). Símbolos iguais na terceira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para o percentual de necrose celular ($p \geq 0,05$). C- = controle negativo; C+ = controle positivo.

Figura 4b- Valores médios e desvio-padrão do ensaio de apoptose/necrose do CSCR2 associado aos radiopacificadores no período de 24 horas, na concentração de 1:8.



Letras maiúsculas iguais na primeira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para o percentual de células viáveis ($p \geq 0,05$). Letras minúsculas iguais na segunda coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para o percentual de apoptose celular ($p \geq 0,05$). Símbolos iguais na terceira coluna dos diferentes materiais indicam semelhança estatística para o percentual de necrose celular ($p \geq 0,05$). C- = controle negativo; C+ = controle positivo.

5 Discussão

Embora o MTA apresente propriedade biológica adequada, o material apresenta dificuldade de manipulação em função do tempo de presa, consistência e escoamento^{67,72}. Na busca por materiais à base de silicato de cálcio para utilização clínica^{11,29,30,71}, novas propostas e formulações são estudadas.

Diferentes componentes podem ser adicionados aos cimentos de silicato de cálcio. O tempo de presa do CP pode ser reduzido pela adição de cloreto de cálcio¹. A adição de componentes iônicos a cimentos contendo silicato de cálcio promove estímulo da proliferação celular⁵¹⁻⁵³. As modificações propostas para os cimentos avaliados no presente estudo não comprometeram suas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas, permitindo, em especial para os cimentos selecionados para os estudos 2 e 3, potencial para uso clínico.

Outro fator a ser considerado para proposta de novo material à base de silicato de cálcio é o radiopacificador a ser usado. As desvantagens que o radiopacificador Bi₂O₃ causa ao MTA são conhecidas^{9,12,13,21}. Por este motivo, a adição de radiopacificadores alternativos foi avaliada no presente estudo.

No intuito de melhorar as propriedades do silicato de cálcio, foram avaliados o ZrO₂, Nb₂O₅ microparticulado e nanoparticulado e CaWO₄ que são metais que apresentam resultados favoráveis na literatura. Cimentos experimentais à base de silicato tricálcico associado ao radiopacificador ZrO₂ demonstram bioatividade e deposição de hidroxiapatita na superfície no cimento na presença de fluido corporal simulado¹⁵, além disso, apresentam pH alcalino e liberam íons cálcio³⁷. A associação do CP ao Zr₂O demonstra radiopacidade, resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade similares ao ProRoot MTA²². Ainda, a hidratação do CP acrescido de 30% de Zr₂O resulta em aumento do pH, liberação de íons cálcio e apresenta bioatividade¹⁴. Outra possibilidade de utilização do Zr₂O está em seu uso na forma nanoparticulada, por apresentar bioatividade e citocompatibilidade⁴⁹ e melhorar as propriedades mecânicas e físicas dos materiais^{33,50,60}.

Metais como o nióbio tem atraído considerável atenção para utilização em materiais odontológicos²⁸, por apresentar excelente resistência à corrosão, não ser alergênico ou tóxico³⁴. Este metal é conhecido por sua biocompatibilidade e geralmente é utilizado em implantes dentários ou ósseos⁶⁵. Além disso, tem demonstrado capacidade de promover a formação de apatita^{35,46,54,55}. O Nb₂O₅ na forma nanoparticulada apresenta atividade

antimicrobiana⁷³, podendo ser indicado para utilização como agente radiopacificador em materiais retrobturadores à base de CP.

O CaWO_4 vem sendo estudado como agente radiopacificador associado ao CP^{36,40,67}. Sua análise se justifica, pois estudos mostram que este agente apresenta adequada biocompatibilidade³⁶, além de não alterar a resistência à compressão e o tempo de presa final do CP⁶⁷. Os cimentos CSCM e CSCR2 associados aos radiopacificadores CaWO_4 , ZrO_2 e Nb_2O_5 microparticulados apresentaram resultados adequados para serem usados em substituição ao Bi_2O_3 .

Embora materiais nanoparticulados possam favorecer propriedades biológicas⁴⁸⁻⁴⁹, a adição de radiopacificadores nanoparticulados não alterou as propriedades físico-químicas do cimento de silicato de cálcio em relação aos radiopacificadores convencionais. Outros estudos relatam diferentes efeitos da adição de substâncias nanoparticuladas. Nanopartículas de prata associadas à resina também não modificaram as suas propriedades físico-químicas¹⁹. Outros estudos apontam que o tamanho das partículas afeta as propriedades dos materiais^{2,18,71}. A associação do dióxido de titânio nanoparticulado ao CP aumentou sua resistência à compressão e à flexão e diminuiu seu tempo de presa¹⁸. A utilização do ZrO_2 e Nb_2O_5 nanoparticulados associados a cimentos endodônticos à base de CP afetaram o tempo de presa, resistência à compressão, escoamento e a espessura da filme⁷¹. A adição de dióxido de silício nanoparticulado ao MTA acelerou o processo de hidratação e reduziu o tempo de presa do MTA². Estudos adicionais são necessários para avaliação de diferentes veículos que poderiam aperfeiçoar a incorporação das nanopartículas na matriz de cimento, tornando possível a obtenção de melhores resultados.

As metodologias propostas neste estudo são modelos *in vitro*, que foram reproduzidas para avaliar as propriedades físicas, mecânicas e biológicas dos cimentos. Nossos resultados apontam que algumas propriedades ainda necessitam ser melhoradas, como tempo de presa, manipulação e inserção do material, escoamento e resistência à compressão.

Estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar resposta histológica em subcutâneo de rato, bem como a capacidade seladora e antimicrobiana dos cimentos experimentais. Os resultados obtidos poderão contribuir no desenvolvimento de um novo material para ser utilizado como cimento retrobturador com propriedades adequadas à prática clínica.

6 Conclusão

Os cimentos de silicato de cálcio estudados com diferentes composições contendo aditivos e resinas apresentam níveis de arsênio e biocompatibilidade similar ao MTA. Além disso, suas propriedades físico-químicas sugerem sua utilização como alternativa ao MTA, após estudos adicionais em associações aos agentes radiopacificadores.

Os cimentos de silicato de cálcio CSCM e CSCR2 foram associados aos radiopacificadores ZrO_2 e Nb_2O_5 micro ou nanoparticulados, e ao $CaWO_4$. A associação dos cimentos ao ZrO_2 microparticulado apresentou melhores resultados físico-químicos, favorecendo o escoamento e o tempo de presa inicial do material. E a associação do CSCR2 ao Nb_2O_5 apresentou maior liberação de íons cálcio.

Todas as associações do CSCM e CSCR2 aos radiopacificadores $CaWO_4$, ZrO_2 e Nb_2O_5 micro e nanoparticulados apresentaram composição semelhante ao MTA e também mostraram não ser citotóxicos. Desta forma, conclui-se que os cimentos à base de silicato de cálcio avaliados neste estudo apresentam potencial para uso alternativo ao MTA quando associados aos radiopacificadores estudados.

Referências*

1. Abdullaha D, Pitt Ford TR, Papaioannouc S, Nicholsond J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials*. 2002; 23(19): 4001–10.
2. Akbari M, Zebarjad SM, Nategh B, Rouhani A. Effect of nano silica on setting time and physical properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2013; 39(11): 1448–51.
3. American National Standards Institute/American Dental Association (ANSI/ADA). Specification no. 57: endodontic sealing materials. Chicago, IL: ANSI/ADA; 2000.
4. Anthonappa RP, King NM, Martens LC. Is there sufficient evidence to support the long-term efficacy of mineral trioxide aggregate (MTA) for endodontic therapy in primary teeth? *Int Endod J*. 2013; 46(3): 198-204.
5. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernadineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod*. 2006; 32(9): 897–900.
6. Bramante CM, Demarchi AC, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LS, et al. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(6): 909-13.
7. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2007; 40(6): 462–70.
8. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2008; 41(5): 408–17.
9. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for the endodontic use. *J Endod*. 2008; 41(2): 151-7.
10. Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J*. 2010; 43(3): 231–40.
11. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater*. 2011; 27(8): 836–44.

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

12. 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.
13. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2004; 37(10): 699–704.
14. 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.
15. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013; 29(5): 580-93.
16. Chang SW, Shon WJ, Lee W, Kum KY, Baek SH, Bae KS. Analysis of heavy metal contents in gray and white MTA and 2 kinds of Portland cement: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): 642-6.
17. Chang SW, Baek SH, Yang HC, Seo DG, Hong ST, Han SH, et al. Heavy metal analysis of Ortho MTA and ProRoot MTA. *J Endod.* 2011; 37(12): 1673–6.
18. Chateau R, Heydari V, Moradkhannejhad L, Safarpour M, Joo SW. Self-cleaning and mechanical properties of modified white cement with nanostructured TiO₂. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013; 13(7): 5109-14.
19. 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.
20. Coleman NJ, Nicholson JW, Awosanya K. A preliminary investigation of the in vitro bioactivity of white Portland cement. *Cem Concr Res.* 2007; 37(11): 1518–23.
21. Coomaraswamy KS, LumLey PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTAlike) system. *J Endod.* 2007; 33(3): 295–8.

22. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater.* 2011; 27(9): 879-91.
23. Dammaschke T, Gerth HUV, Zuchner H, Schafer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater.* 2005; 21(8): 731-8.
24. Denry IL, Holloway JA, Nakkula RJ, Walters JD. Effect of nionium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 75(1): 18-24.
25. Duarte MAH, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SdeC. pH and calcium ion release of two root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(3): 345-7.
26. Duarte MAH, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. Arsenic release provided by MTA and cement. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(5): 648-50.
27. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J.* 2000; 11(1): 3-9.
28. Ferracane J. *Materials in dentistry.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
29. Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J. Themicrostructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dent Mater.* 2012; 28(5): 584–95.
30. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 326–36.
31. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, De Stefano Dorigo E, Rossi PL, Prati C. Kinetics of apatite formation on a calcium-silicate cement for root-end filling during ageing in physiological-like phosphate solutions. *Clin Oral Investig.* 2010; 14(6): 659-68.

32. Garboczi EJ, Bullard JW. Shape analysis of a reference cement. *Cement Concrete Res.* 2004; 34(10): 1933-7.
33. Gillani R, Ercan B, Qiao A, Webster TJ. Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. *Int J Nanomedicine.* 2010; 2(5): 1-11.
34. Gladwin M, Bagby M. *Clinical aspect of dental materials: theory, practice, and cases.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
35. Godley R, Starosvetsky D, Gotman I. Bonelike apatite formation on niobium metal treated in aqueous NaOH. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(10): 1073-7.
36. Gomes Cornélio 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.
37. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Inter Endod J.* 2013; 46(7): 632–41.
38. Guerreiro-Tanomaru JM, Cornélio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012 Oct 16. Epub.
39. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Healing processo f dog dental pup after pulpotomy and pulp with miner mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J.* 2001; 12(2): 109-13.
40. Húngaro Duarte MA, de Oliveira EI, Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, et al. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35(5): 737-40.
41. Húngaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(3): 394-7.
42. Hwang YC, Kim DH, Hwang IN, Song SJ, Park YJ, Koh JT, et al. Chemical constitution, physical properties, and biocompatibility of experimentally manufactured Portland cement. *J Endod.* 2011; 37(1): 58-62.

43. International Standards Organization. Dental root canal sealing materials: ISO 6876. Geneva: ISO; 2002.
44. International Standards Organization. Dentistry: water-based cements—part 1: powder/liquid acid-base cements. Geneva: ISO; 2007.
45. 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.
46. Karlinsey RL, Yi K, Duhn CW. Nucleation and growth of apatite by a self-assembled polycrystalline bioceramic. *Bioinspir Biomim*. 2006; 1(1): 12-9.
47. Leitune VC, Takimi A, Collares FM, Santos PD, Provenzi C, Bergmann CP, et al. Niobium pentoxide as a new filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2013; 46(3): 205-10.
48. Li Q, Deacon AD, Coleman NJ. The impact of zirconium oxide nanoparticles on the hydration chemistry and biocompatibility of white Portland cement. *Dent Mater J*. 2013; 32(5): 808-15.
49. Liu X, Huang A, Ding C, Chu PK. Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO₂) films fabricated by cathodic arc deposition. *Biomaterials*. 2006; 27(21): 3904-11.
50. Lohbauer U, Wagner A, Belli R, Stoetzel C, Hilpert A, Kurland HD, et al. Zirconia nanoparticles prepared by laser vaporization as fillers for dental adhesives. *Acta Biomater*. 2010; 6(12): 4539-46.
51. Magallanes-Perdomo M, De Aza AH, Mateus AY, Teixeira S, Monteiro FJ, De Aza S, et al. In vitro study of the proliferation and growth of human bone marrow cells on apatite-wollastonite-2 M glass ceramics. *Acta Biomater*. 2010; 6(6): 2254-63.
52. Martinez IM, Velasquez PA, De Aza PN. Synthesis and stability of α -tricalcium phosphate doped with dicalcium silicate in the system Ca₃(PO₄)₂-Ca₂SiO₄. *Mater Charact*. 2010; 61(7): 761-7.
53. Meseguer-Olmo L, Aznar-Cervantes S, Mazon P, De Aza PN. In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells of human bone marrow origin seeded on a novel bioactive ceramics in the Ca₂SiO₄-Ca₃(PO₄)₂ system. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23(12): 3003-14.

54. Miyazaki T, Kim HM, Kokubo T, Kato H, Nakamura N, Ohtsuki C. Bonelike apatite formation on niobium oxide gel in a simulated body fluid. *Bioceramics*. 2001; 43(192-195): 43-6.
55. Miyazaki T, Kim HM, Kokubo T, Ohtsuki C, Nakamura N. Apatite-forming ability of nionium oxide gels in a simulated body fluid. *J AM Ceram Soc Jpn*. 2001; 109(1275): 929-33.
56. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J*. 2007; 18(1): 3-7.
57. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010; 36(3): 16–27.
58. Peters CI, Peters OA. Occlusal loading of EBA and MTA root-end fillings in a computer-controlled masticator: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J*. 2002; 35(1): 22-9.
59. Porter ML, Bertó A, Primus CM, Watanabe I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. *J Endod*. 2010; 36(3): 524–8.
60. Rodrigues DC, Gilbert JL, Hasenwinkel JM. Two-solution bone cements with cross-linked micro and nano-particles for vertebral fracture applications: effects of zirconium dioxide content on the material and setting properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 92(1): 13-23.
61. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95(4): 483-9.
62. Saldaña L, Méndez-Vilas A, Jiang L, Multigner M, González-Carrasco JL, Pérez-Prado MT, et al. In vitro biocompatibility of an ultrafine grained zirconium. *Biomaterials*. 2007; 28(30): 4343-54.
63. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2005; 31(2): 97–100.
64. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement. *J Endod*. 2010; 36(7): 1210–5.
65. Shibata K, Kamegai A. Titanium in dentistry: biocompatibility of titanium. Tokyo: Quintessence; 1988.

66. Taddei P, Tinti A, Gandolfi MG, Rossi PL, Prati C. Vibrational study on the bioactivity of portland cement-based materials for endodontic use. *J Mol Struct.* 2009; 924–926: 548–54.
67. Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, Bosso R, Reis JM, Duarte MA, et al. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012; Aug 23. Epub.
68. Tolentino E, Lameiras FS, Gomes AM, Silva CAR, Vasconcelos WL. Effects of high temperature on the residual performance of Portland cement concretes. *Mat Res.* 2002; 5(3): 301-7.
69. 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.
70. Torabinejad M, White DJ, inventores; Loma Linda University, cessionário. Tooth filling material and use. United States patent US 5769638. 1995 May 16.
71. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013 Jul 12. doi: 10.1111/iej.12167. Epub ahead of print.
72. Vivian RR, Ordinola-Zapata R, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110(2): 250–6.
73. Wang Z, Lee YH, Wu B, Horst A, Kang Y, Tang YJ, et al. Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere.* 2010; 80(5): 525-9.
74. Ward LP, Strafford KN, Wilks TP, Subramanian C. The role of refractory element based coatings on the tribological and biological behaviour of orthopaedic implants. *J Mater Proc Tech.* 1996; 56(1-4): 364-74.
75. Wucherpfennig AL, Green DB. Mineral Trioxide vs. Portland Cement: two biocompatible filling materials. *J Endod.* 1999; 25(4): 308.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 20 de janeiro de 2014

Roberta Bosso