



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio Mesquita Filho”



Faculdade de Odontologia de Araraquara

ADINAE L TRINDADE JUNIOR

**EFEITO DO ACRÉSCIMO DE NANO-HIDROXIAPATITA NAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, MECÂNICAS E ANTIBIOFILME DO
CIMENTO PORTLAND COM ÓXIDO DE ZIRCÔNIO**



Araraquara

2014



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio Mesquita Filho”



Faculdade de Odontologia de Araraquara

ADINAE L TRINDADE JUNIOR

**EFEITO DO ACRÉSCIMO DE NANO-HIDROXIAPATITA NAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, MECÂNICAS E ANTIBIOFILME DO
CIMENTO PORTLAND COM ÓXIDO DE ZIRCÔNIO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2014

Trindade Junior, Adinael

Efeito do acréscimo de nano-hidroxiapatita nas propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme do cimento portland com óxido de zircônio / Adinael Trindade Junior. - Araraquara: [s.n.], 2014.

42 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Endodontia 2. Materiais dentários 3. Propriedades físicas. 4.
Testes de sensibilidade microbiana I.Título

ADINAEI TRINDADE JUNIOR

**EFEITO DO ACRÉSCIMO DE NANO-HIDROXIAPATITA NAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, MECÂNICAS E ANTIBIOFILME DO
CIMENTO PORTLAND COM ÓXIDO DE ZIRCÔNIO**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

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

2º examinadora: Profª. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

3º examinadora: Profª. Dra. Yara Terezinha Corrêa Silva Sousa

Araraquara, 18 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

ADINAEI TRINDADE JUNIOR

- NASCIMENTO** 13/05/1988
Cardoso – São Paulo
- FILIAÇÃO** Adinael Trindade
Maria José Gomes Trindade
- 2006 – 2010** Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL
- 2011 – 2011** Programa de Aperfeiçoamento Profissional em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
- 2012 – 2014** Curso de Especialização em Endodontia
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia –
FAEPO
- 2012 – 2014** Curso de Mestrado em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Esta tese é dedicada aos que fizeram possível a realização de mais este importante passo em minha vida.

Em primeiro lugar, Deus, por me abençoar e proporcionar toda força, sabedoria, paciência e determinação para poder estar aqui hoje.

Aos meus pais, Adinael e Maria José, a quem devo tudo o que sou hoje, por sempre me escutarem, aconselharem e, principalmente, me acalmarem, nunca deixando de demonstrar todo o apoio em minhas decisões, independente de quais fossem e do quão difícil seria para eles, seja por estar longe ou passando por experiências novas e difíceis. Muito obrigado por terem me acompanhado de longe nesse novo caminho em minha vida. Desde que sai de casa em 2006, sinto que cresci muito, na maioria das vezes pelo caminho mais difícil, mas que hoje sou uma pessoa muito melhor do que antes, e devo muito disso a vocês. Tem dia que a saudade é grande, a vontade de estar em casa perto de vocês aperta no peito, mas ao final, é parte da vida.

As minhas irmãs, Christiane e Fabiana, por estarem sempre na torcida, por me escutarem e incentivarem, sempre sabendo o melhor momento de dar um abraço cheio de segurança e tranquilidade. Amo vocês, meninas.

Aos meus pequenos, Igor, Nathália, Camilla e Henrique, por todos os momentos deliciosos de tio que me proporcionam. Voltar pra casa aos feriados e encontrá-los recarrega a bateria, enche de energia e renova o fôlego para podermos lidar com as obrigações de gente grande, lembrando que tudo tem seu ritmo e que algumas vezes, as soluções mais simples são as mais eficientes.

À Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, por toda paciência e orientação nesses dois anos de mestrado. Os conhecimentos e experiências compartilhados foram de extrema importância para minha formação como aluno pesquisador. Sua dedicação e respeito com seus orientados, assim como disposição para realização de experimentos e auxílio com toda a parte teórica da dissertação é única. Considero-me uma pessoa de muita sorte e me sinto honrado por ter sido escolhido para ser seu orientado.

Agradecimentos

Aos Amigos

Aos meus cunhados, Alessandro e Sinomar, por tudo incentivo e companheirismo. Vocês é parte da família.

Aos tios e primos, próximos ou distantes, por toda a torcida e votos de confiança, sempre interessados e preocupados comigo. Um beijo e abraço em cada um de vocês.

Um beijo especial para as primas Natali, Marina e Daniela, que acompanharam de perto as alegrias e apertos desses dois anos de pós-graduação. Que nossa convivência continue prazerosa e cheia de diversão, como sempre foi.

Aos queridos e insubstituíveis amigos de sempre, Bruna, Marília, Nyége, Flávio e Rodrigo, pelas risadas e confraternizações nos feriados, pelas viagens e ótima hospitalidade em suas casas, por conviverem com as particularidades que cada um nós temos de forma tão harmônica, por serem sempre um ombro amigo, pronto para rir, chorar ou reclamar, partilhando das nossas alegrias e tristezas, por nos entenderem com uma simples troca de olhares e serem tão verdadeiros. Quanto mais velha, melhor fica nossa amizade. Que nossos encontros vá muito além dos 16 anos que nos trouxeram juntos até aqui. A amizade de vocês é muito importante pra mim. Amo vocês.

Aos amigos do curso de especialização pelos bons momentos em aulas, clínicas e confraternizações nesses 23 meses de convivência. Um abraço em especial ao grande amigo Bruno, que acabou se tornando mais do que um companheiro de curso, mas também de apartamento, dividindo muitas histórias e momentos no decorrer desses meses, sempre quebrando um pouco da tensão do mestrado na semana de curso. Um forte abraço.

As queridas amigas Gisselle, Roberta e Raqueli pelos ensinamentos e orientações logo que entrei nesse meio acadêmico. Fui muito bem recebido e isso é de uma ajuda inestimável quando se chega a um ambiente totalmente novo onde não se conhece ninguém. Tenho um carinho muito grande por vocês.

Camila Espir, Leticia e Carol Venção, amigonas e companheiras das tribulações de mestrado e especialização. Compartilhar os erros e acertos com vocês tornaram o mestrado bem menos impossível de se concretizar. Fico feliz por tê-las como amigas nessa importante etapa.

Um agradecimento especial a dois importantes amigos, Jônatas, conterrâneo e companheiro de apartamento, por ter me acolhido em sua casa e me trazido para o curso de inverno, onde conheci a faculdade. E Guilherme, que me recebeu desde as portas da faculdade e me apresentou aos amigos de pós-graduação e professores. Sem vocês, o caminho para chegar até aqui teria sido bem mais longo. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas da faculdade Bernardo, Ana Livia, Paula, Fernando, Matheus, Natália, Alana, Camila Nascimento, Adriana Ortega, Ariele, Miriam, Kátia, Kennia, Elisandra, Tiago, Vinicius Ibiapina, Vinicius Paiva, Suzane, Gustavo, Daniel, Guilherme e Jonatan. Meu agradecimento pelo convívio e aprendizagem ao decorrer desses dois anos.

Aos Professores

Ao Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, pelo apoio e incentivo constante, sempre com paciência, calma e humildade. Tenho o senhor como um segundo orientador, que foi de suma importância para toda a formação que obtive nesse período, sendo um exemplo como pesquisador, professor e clínico. Sou imensamente grato por ter tido sua participação durante essa importante fase.

À Profa. Dra. Gisele Faria, pela grande amizade e momentos alegres que sempre passamos juntos. Sempre muito disposta e atenta a qualquer pedido, é um exemplo a ser seguido como pessoa e como profissional.

Ao Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert e Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho pelos conhecimentos dados durante o curso. O carinho, dedicação e humildade que têm com cada aluno que passam pelos senhores é algo que marca e sempre nos lembra de como devemos nos portar quando diante do próximo.

Ao Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo e Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, pela convivência e ensinamentos.

Ao docente Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis por todo apoio e ajuda com parte dos experimentos dessa dissertação.

A Instituição

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 obrigado pela confiança depositada em mim.

Aos Funcionários

Aos funcionários Creusa, Cida, Marinho, Alessandra, Vanderlei, Lucinha e Edineide. Agradeço a amizade, convívio e aprendizagem proporcionados.

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

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

Trindade-Junior A. Efeito do acréscimo de nano-hidroxiapatita nas propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme do cimento Portland com óxido de zircônio [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Resumo

A substituição do óxido de bismuto por óxido de zircônio (ZrO_2) e o acréscimo de hidroxiapatita nanoparticulada (HAN) podem favorecer propriedades do Cimento Portland (CP). Este estudo objetiva comparar propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme do CP com ZrO_2 , acrescido de HAN. Os materiais avaliados foram: **G1** – MTA Angelus; **G2** – CP/ ZrO_2 ; **G3** – CP/ ZrO_2 /HAN10%; **G4** – CP/ ZrO_2 /HAN20%. O pH foi analisado em phmetro digital, a solubilidade pela perda de massa e o tempo de presa pelo teste de Gilmore. A resistência à compressão foi avaliada por meio de ensaio mecânico. Amostras dos materiais foram radiografadas com uma escala de alumínio para análise da radiopacidade. Para a avaliação antibiofilme os materiais foram colocados em contato com biofilme de *E. faecalis* formado em blocos de dentina, e avaliado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFCmL⁻¹). Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey com 5% de significância. G2 e G3 apresentaram pH mais elevado. Maior solubilidade foi observada para G3 e G4. O tempo de presa inicial foi menor para G1 e o tempo de presa final para G3. Todos os materiais apresentaram radiopacidade superior a 3 mm Al. A resistência à compressão foi maior para G2 nos períodos avaliados. Nenhum cimento foi capaz de neutralizar completamente o biofilme bacteriano, mas G3 e G4 proporcionaram maior redução bacteriana. Conclui-se que a associação CP/ ZrO_2 e CP/ ZrO_2 com 10% de HAN apresentam propriedades físico-químicas adequadas e que o acréscimo de HAN melhora a atividade antibiofilme de *E faecalis*.

Palavras-chave: Endodontia, Materiais dentários, Propriedades físicas, Teste de sensibilidade microbiana.

Trindade-Junior A. Effect of nano-hydroxyapatite in the physicochemical, mechanical and antibiofilm properties of Portland cement and zirconium oxide [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Abstract

The bismuth oxide replacement by zirconium oxide (ZrO_2) and the addition of hydroxyapatite nanoparticle may improve the Portland Cement (PC) properties. This study aimed evaluate the physicochemical, mechanical and antibiofilm of *Enterococcus faecalis* properties of Portland Cement (PC) association with zirconium oxide (ZrO_2), added with hydroxyapatite nanoparticles (HAN). The analysed materials were: **G1** –MTA Angelus; **G2** – PC/ ZrO_2 ; **G3** – PC/ ZrO_2 /HAN10%; **G4** – PC/ ZrO_2 /HAN20%. The pH was measure with a digital phmeter and the solubility by the weight loss. Setting time was assayed by Gilmore needle. Compressive strength was tested in universal testing machine. Materials samples were radiographed alongside an aluminum (Al) step wedge. For the antibiofilm test, the samples were place in direct contact with *E. faecalis* biofilm over dentine blocks, and assessed by colony forming units (CFU mL⁻¹). The results were submitted to ANOVA and Tukey's test at 5% significance. G2 and G3 showed the higher pH in both experimental periods. Bigger solubility was noted for G3 and G4. The initial setting time was shorter for G1, and the final setting time for G3 and G4. All material presented radiopacity greater than 3 mmAl. Compressive strength was better for G2 in both experimental periods. No cement was able to completely neutralize the bacterial biofilm, however G3 and G4 exhibited higher bacteria reduction. The PC/ ZrO_2 and PC/ ZrO_2 with HAN 10% association presented the better physicochemical and mechanical properties, and the association with HAN improves the *E. faecalis* antibiofilm activity

Keywords: Endodontics, Dental materials, Physical properties, Microbial sensitivity tests.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 CAPÍTULO 1 Efeito do Acréscimo de Nano-Hidroxiapatita nas Propriedades Físico-químicas, Mecânicas e Antibiofilme do Cimento Portland com Óxido de Zircônio	16
3 DISCUSSÃO.....	36
4 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA), descoberto e introduzido na odontologia em meados dos anos 90, tem sido amplamente indicado como material retroburador em cirurgias parodontodônticas e selamento de perfurações por apresentar biocompatibilidade, estabilidade dimensional e radiopacidade (Tanomaru-Filho et al.³¹, 2007).

O MTA, constituído em 75% de cimento Portland (CP), 20% de óxido de bismuto (Bi_2O_3) e 5% de sulfato de cálcio (CaSO_4) (Al-Hezaimi et al.², 2009) pode ser encontrado na coloração cinza ou branca, sendo a principal diferença entre eles a menor quantidade de alumínio (Al_2O_3), magnésio (MgO) e ferro (FeO) encontrada no branco (Parirokh, Torabinejad²², 2010). O pó é composto por partículas hidrofílicas que, na presença de água, formam um gel coloidal com pH inicial de 10,2, que toma presa em aproximadamente 4 horas (Camilleri et al.⁷, 2005; Camilleri, Pitt Ford⁸, 2006). O MTA apresenta baixa ou nenhuma solubilidade (Danesh et al.¹², 2006; Torabinejad et al.³², 1995) mesmo em avaliações a longo prazo (Fridland, Rosado¹⁶, 2005).

Sendo o CP o material base na constituição do MTA, acrescido do Bi_2O_3 com função radiopacificadora (Asgary et al.⁴, 2004), novas combinações surgem, uma vez que a adição do Bi_2O_3 provoca alterações nas propriedades físico-químicas e mecânicas do cimento, interferindo diretamente na resistência à compressão, pH, solubilidade e tempo de presa (Coomaraswamy et al.¹⁰, 2007; Song et al.²⁹, 2006). Cutajar et al.¹¹ (2011) e Gomes Cornelio et al.¹⁷ (2011) indicam o óxido de zircônio (ZrO_2) como radiopacificador alternativo, visando aperfeiçoar as propriedades físico-químicas e biológicas do MTA.

Cutajar et al.¹¹ (2011) avaliaram propriedades físico-químicas e mecânicas da associação de CP com diferentes concentrações de ZrO_2 , entre 0 a 50 %, manipulado com proporção pó/liquido de 0,3. Dentre os grupos avaliados, a concentração de 30 % de ZrO_2 apresentou o melhor conjunto de propriedades, com satisfatória radiopacidade e resistência à

compressão, tempo de presa, baixa absorção de água e baixa solubilidade, tendo suas propriedades equiparadas ao MTA.

Gomes Cornelio et al.¹⁷ (2011) avaliaram a citotoxicidade de CP puro e associado à radiopacificadores, como Bi_2O_3 , ZrO_2 e tungstato de cálcio (CaW_4), em linhagens celulares de fibroblastos e osteoblastos. Os resultados mostraram que os cimentos associados aos diferentes radiopacificadores não foram tóxicos e ZrO_2 apresentou a melhor compatibilidade e o menor grau de toxicidade. Hungaro Duarte et al.¹⁸ (2012) avaliaram o CP puro e associado aos mesmos radiopacificadores, demonstrando que a associação ao ZrO_2 apresenta liberação de íons cálcio e pH semelhante ao MTA, assim como radiopacidade e baixa solubilidade, com aumento do tempo de presa.

Camilleri et al.⁶ (2011) analisaram pH, a microestrutura e liberação de cálcio da associação do CP com 30% de ZrO_2 . A liberação de hidróxido de cálcio elevou o pH (entre 11,7 e 12,4) e a microestrutura mostrou composição por silicato de cálcio hidratado, hidróxido de cálcio e pequena quantidade de monossulfato, confirmando que a associação era semelhante ao MTA.

A hidroxiapatita (HA) tem sido estudada tanto na forma micro como nanoparticulada (HAN), após ter demonstrado potencial biocompatível (Sanosh²⁶, 2009), além de servir como matriz guia para regeneração óssea, preenchendo os pré-requisitos de ser biodegradável, osteoindutor e osteocondutor (Ciobanu et al.⁹, 2011; Tripathi et al.³⁴, 2012).

Wang et al.³⁵ (2013) avaliaram o desempenho do Poli(lático-co-ácido glicólico) (PLGA), comumente utilizado como matriz para regeneração óssea, com e sem o revestimento de uma camada de hidroxiapatita nanoparticulada na cicatrização de defeitos ósseos confeccionados em ratos, observando a viabilidade e proliferação do tecido ósseo. A análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou uma deposição complexa e mais estruturada sobre os *scaffolds* tratados com nano hidroxiapatita, assim como maior

viabilidade e proliferação celular. No modelo in vivo, após o período de 12 semanas, o grupo tratado com PLGA revestido por nano hidroxiapatita apresentava o defeito ósseo completamente cicatrizado e com uma formação óssea mais madura, mostrando que o emprego de nano hidroxiapatita sobre matriz de PLGA para formação óssea aumenta significativamente os resultados.

Sadat-Shojai et al.²⁵ (2013) avaliaram o efeito da associação de nano hidroxiapatita as propriedades reológicas e biológicas do polihidroxibutirato (PHB), também utilizado como *scaffolds* para regeneração óssea. Estudos in vitro mostraram que as propriedades reológicas foram satisfatórias, com maior proliferação e diferenciação celular quando comparado ao PHB sem tratamento, justificado no estudo pela maior aderência celular a superfície rugosa da nano hidroxiapatita.

A associação de hidroxiapatita nanoparticulada também tem sido empregada a superfície de implantes. Shi et al.²⁸ (2012) avaliaram a resposta de osteoblastos, in vitro, frente a implantes com superfície porosa tratada com nano hidroxiapatita. A análise em difração de raio-x (XRD) caracterizou a superfície como cristais puros de nano hidroxiapatita. Também foi notado um aumento na proliferação celular, proteína, atividade ALP e liberação de osteocalcina quando comparado ao grupo controle, comprovando que a deposição de nano hidroxiapatita sobre a superfície de implantes aumenta a indução de osteoblastos.

A escolha da partícula nano baseia-se no estudo apresentado por Dasgupta et al.¹³ (2013), onde testes físico-químicos e biológicos foram realizados com partículas de HA em diferentes tamanhos, 168 nm, 1,48 μm e 5,01 μm . Os testes de resistência à compressão, dureza e resistência à fratura mostram que os valores obtidos são maiores quando utilizados as menores partículas. Maior superfície de contato, energia reativa e máxima absorção de água também foi demonstrada pelo grupo de hidroxiapatita nanoparticulada. Os testes celulares aplicados, MEV, MTT (3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio) e imunohistoquímica,

mostraram melhor desempenho celular para o grupo nano, assim como maior proliferação osteoblástica, confirmando a influência exercida pelo tamanho da partícula empregada.

Aksakal et al.¹ (2013) compararam os resultados expressos por implantes fixados em tibia de ovelha tendo sua superfície tratada com hidroxiapatita nanoparticulada, 25 nm, e microparticulada, 25 µm. Os resultados atingidos mostraram maior fixação e a formação de um osso mais maduro ao final de um período pós operatório de 12 semanas para o grupo de nano hidroxiapatita, assim como bons resultados para teste de *pull out*, histopatológico e XRD.

Além das propriedades biológicas já estudadas, na tentativa de avaliar a atividade antimicrobiana da forma nanoparticulada, Evliyaoglu et al.¹⁴ (2011) avaliaram o efeito da HAn associada à prata por meio da confecção de filme de revestimento na luz de cateteres urinários aplicado em coelhos com infecção urinária, observando menor formação de biofilme bacteriano no grupo experimental comprovando a propriedade antimicrobiana das nanopartículas. Outro estudo (Sutha et al.³⁰, 2013) avaliou o poder antimicrobiano de HAn associada a partículas quitosana (CS) para o recobrimento de superfície de implantes, mostrando halo de inibição no teste de difusão em ágar com cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme de *E.faecalis* da associação de CP e ZrO₂ com diferentes concentrações de HAn, buscando uma nova opção a ser empregada como material retro-obturador.

2 CAPÍTULO 1

EFEITO DO ACRÉSCIMO DE NANO-HIDROXIAPATITA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, MECÂNICAS E ANTIBIOFILME DO CIMENTO PORTLAND COM ÓXIDO DE ZIRCÔNIO.*

*Artigo será submetido para publicação no periódico International Endodontic Journal

Resumo

Objetivo: Avaliar propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme de *Enterococcus faecalis* da associação de Cimento Portland (CP) com óxido de zircônio (ZrO_2) e do acréscimo de hidroxiapatita nanoparticulada (HAN).

Metodologia: Os materiais avaliados foram: **G1** – MTA Branco (Angelus, Brasil); **G2** – CP (70%) + ZrO_2 (30%); **G3** - CP (60%) + ZrO_2 (30%) + HAN (10%); **G4** - CP (50%) + ZrO_2 (30%) + HAN (20%). O pH foi analisado em phmetro digital e a solubilidade pela perda de massa. O tempo de presa foi analisado pelo teste de Gilmore. A resistência à compressão foi avaliada por meio de ensaio mecânico. Amostras dos materiais foram radiografadas com uma escala de alumínio para análise da radiopacidade. Para a avaliação antibiofilme os materiais foram colocados em contato com biofilme de *E. faecalis*, e avaliado por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCmL⁻¹). Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey com 5% de significância.

Resultados: G2 e G3 apresentaram maior pH. Maior solubilidade foi observada para G3 e G4. O tempo de presa inicial foi menor para G1 e o tempo de presa final foi menor para G3. Todos os materiais apresentaram radiopacidade superior a 3 mm Al. A resistência à compressão foi maior para G2. Nenhum cimento foi capaz de neutralizar completamente o biofilme bacteriano, mas G3 e G4 proporcionaram maior diminuição bacteriana.

Conclusão: A associação CP/ ZrO_2 e CP/ ZrO_2 com 10% de HAN apresentam propriedades físico-químicas adequadas e sua associação com HAN melhora a atividade antibiofilme de *E faecalis*.

Palavras-chave: Endodontia, Materiais Dentários, Propriedades Físicas, Teste de Sensibilidade Microbiana.

Introdução

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é composto por Cimento Portland (CP) e óxido de bismuto (Bi_2O_3) e apresenta propriedades físico-químicas adequadas (Parirokh & Torabinejad 2010) e biocompatibilidade (Keiser *et al.* 2000). O MTA induz formação de tecido mineralizado (Torabinejad *et al.* 1997; Shabahang *et al.* 1999), sendo indicado como material reparador de perfurações e em obturações retrógradas (Bates *et al.* 1996; Fischer *et al.* 1998; Nakata *et al.* 1998).

A substituição do Bi_2O_3 do MTA tem sido proposta, uma vez que este interfere na solubilidade, pH e tempo de presa (Song *et al.* 2006). A associação de CP com 30% de óxido de zircônio (ZrO_2) apresenta adequada radiopacidade, porosidade, solubilidade e resistência à compressão (Cutajar *et al.* 2011). Resultados favoráveis e potencial bioativo foram demonstrados para a associação de CP com ZrO_2 (Gomes Cornelio *et al.* 2011).

Novos materiais como sílica e hidroxiapatita são incorporados para aperfeiçoar propriedades físico-químicas e antimicrobianas de materiais (Akbari *et al.* 2013). A hidroxiapatita pode melhorar a bioatividade (Sanosh 2009), sendo usada na confecção de matriz para regeneração óssea por ser biodegradável, osteoindutora e osteocondutora (Ciobanu *et al.* 2011; Tripathi *et al.* 2012). Ainda, é adicionada em materiais odontológicos ou superfície de implantes (Li *et al.* 2013; Zakir *et al.* 2013). Dasgupta *et al.* (2013) avaliou as propriedades apresentadas pela hidroxiapatita micro e nanoparticulada, observando melhor conjunto de propriedades físicas, mecânicas e biológicas no grupo com partículas de tamanho de 168 ± 0.086 nm.

A atividade antimicrobiana da hidroxiapatita nanoparticulada (HAN) tem sido avaliada (Evliyaoglu *et al.* 2011; Sutha *et al.* 2013). Evliyaoglu *et al.* 2011, observaram que nanopartículas de hidroxiapatita usadas na confecção de cateteres urinários preveniram a

formação de biofilme. (Sutha *et al.* 2013) demonstraram efeito antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* da associação de HAn e quitosana (CS) incorporada a implantes.

Este estudo tem como objetivo avaliar propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme de *E faecalis* das associações de CP com ZrO_2 e adição de diferentes concentrações de HAn. A hipótese nula é a que a adição de hidroxiapatita nanoparticulada não melhora propriedades da associação do CP com ZrO_2 .

Material e Métodos

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

Tabela 1 - Materiais avaliados e proporções pó/líquido.

Grupo	Material	Proporção pó/líquido
1 – MTA	MTA Angelus (MTA)	1g/320 μ L
2 – CP/ZrO_2	CP (70%) + ZrO_2 (30%)	1g/320 μ L
3 - CP/ ZrO_2/HAn10%	CP (60%) + ZrO_2 (30%) + HAn (10%)	1g/330 μ L
4 - CP/ ZrO_2/HAn20%	CP (50%) + ZrO_2 (30%) + HAn (20%)	1g/340 μ L

MTA: Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil

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

ZrO_2 : Óxido de Zircônio: Sigma AldrichCorp. St. Louis, MO, Estados Unidos da América

HAn: Hidroxiapatita Nanoparticulada: HAn - Laboratório de nanotecnologia, Instituto de Física de São Carlos, SP, Brasil

Nanopartícula de Hidroxiapatita

A partícula de hidroxiapatita introduzida nos grupos experimentais possui dimensão de 50 nm.

Tempo de presa

Para avaliação do tempo de presa, anéis metálicos com 10 mm de diâmetro por 1 mm de altura foram preenchidos com cimentos (n=6). A avaliação do tempo de presa seguiu as normas ISO-6876 (2001) e ASTM (2000), com análises a cada 3 minutos durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e a cada 15 minutos desse período em diante. 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. Após determinação do tempo de presa inicial, as medições continuaram até o tempo de presa final. Os espécimes foram mantidos a 37°C durante as medições. Para determinação do tempo de presa final, os procedimentos foram repetidos usando a agulha de Gilmore de $456 \pm 0,5$ g de massa e diâmetro na ponta de $1 \pm 0,1$ mm.

Resistência à compressão

Para o teste de resistência à compressão, os corpos de prova (n=6) foram confeccionados baseado nas normas BSI-6039 (1981). Os cimentos foram colocados em molde cilíndrico com 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro. O conjunto foi mantido na estufa (37°C e 100% umidade) por 3 horas, quando as amostras foram removidas do molde. As amostras permaneceram na estufa até o período de 24 horas e 21 dias. O teste de resistência à compressão foi realizado na máquina de ensaios Emic DL 2000 (Emic Equipamentos e Sistemas de Ensaio, São José dos Pinhais – PR, Brasil) com célula de carga de 5 kN a uma

velocidade de 0,5 mm/min. A tensão máxima suportada em MPa foi calculada usando a força máxima suportada e o diâmetro dos cilindros ($\text{MPa} = \text{N}/\text{mm}^2$).

Radiopacidade

A análise da radiopacidade (n=6) foi realizada segundo norma ISO-6876 (2001). Foram confeccionadas amostras com dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm altura para cada material, as quais foram mantidas a 37°C e 100% de umidade, por 48 horas. Após, as amostras foram radiografadas ao lado de uma escala de alumínio com espessura de 2 a 16 mm sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY). As radiografias foram realizadas em aparelho de raios-X GE 1000 (General Electric, Milwaukee, WI) operando a 60 kV, 7 mA e 18 pulsos por segundo, com distância focal de 30 cm. As imagens obtidas foram digitalizadas e analisadas usando o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Foram selecionadas as áreas de cada degrau da escala de alumínio e dos cimentos para determinar a equivalência da radiopacidade dos cimentos em milímetros de alumínio, de maneira similar a realizada por Vivan *et al.* (2009).

Solubilidade

A análise da solubilidade foi baseada na norma ISO-6876 (2001), onde as amostras (n=10) foram confeccionadas com diâmetros de 7 mm por 1 mm de espessura, com a colocação de 5 cm de fio de nylon no cimento durante a inserção do material no molde. 2 e 7 dias após a manipulação, as amostras foram removidas do molde. Após a remoção dos resíduos ou partículas soltas, as amostras foram colocadas em um dessecador com sílica por uma hora; Os discos juntamente com o fio dental foram pesados em balança de precisão modelo Adventure (Ohaus Corp., Parsippany, NJ, USA) para a obtenção da massa inicial.

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

O excesso de água foi removido com auxílio de papel absorvente e as amostras foram colocadas em dessecador com sílica por 24 horas para realização de nova pesagem para obtenção da massa final. A estabilização da massa de cada amostra foi constatada após um novo ciclo de 24 horas no dessecador com sílica. A solubilidade dos cimentos correspondeu à perda de massa identificada para cada amostra, expressa como porcentagem da massa original.

pH

Realizado de acordo com Faria-Junior *et al.* (2013) As amostras (n=10) foram confeccionadas com dimensões de 7 mm de diâmetro e 1 mm de altura foram confeccionados. O pH foi avaliado 2 e 7 dias após a manipulação. As amostras foram imersas em frascos plásticos contendo 10 mL de água deionizada cujo pH foi aferido previamente (6,5). Os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 37°C. As mensurações de pH foram realizadas após 5 e 15 horas da imersão dos discos com o pHmetro previamente calibrado. Após cada mensuração, realizada em triplicata, a média do pH de cada grupo em cada período experimental foi calculada.

Teste de Atividade Antibiofilme

O teste de atividade antimicrobiana sobre contato direto com o biofilme também foi realizado segundo Faria-Junior *et al.* (2013). Incisivos centrais bovinos foram utilizados para

formação do biofilme. As raízes foram seccionadas longitudinalmente. Blocos de dentina com dimensões de 5 x 5 x 0,7 mm (largura x comprimento x altura) foram obtidos utilizando um disco diamantado (Isomet – Buheler, LakeBluff, IL, USA) a baixa velocidade sob irrigação. Os blocos foram e colocados em um tudo de ensaio contendo água destilada para esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os procedimentos microbiológicos e manipulação dos blocos de dentina se deram dentro de uma capela de fluxo laminar (Veco Flow Ltda, Campinas, SP, Brasil). Uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi utilizada para formar o biofilme. Após a confirmação da pureza da cepa por coloração Gram e morfologia de colônia, os micro-organismos foram reativados em 4 mL de meio estéril Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e mantidos a 37°C por 12 horas. A densidade óptica da suspensão foi calibrada em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) para $DO_{600}=0,2$, que equivale a 10^8 UFCmL⁻¹.

Os blocos de dentina foram colocados em placas de cultura de 24 poços, onde cada poço recebeu 200 µL da suspensão padronizada e 1,8 mL de meio BHI, deixando os blocos de dentina submersos. As placas foram mantidas em incubadora (model Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil) sob constante agitação e microaerofilia a 37°C por 14 dias. O meio BHI de cada poço era completamente trocado a cada 48 horas, sem adição de novos micro-organismos para assegurar nutrientes suficientes para o crescimento bacteriano.

Após o período pós manipulação de 2 e 7 dias, amostras de cada material foram removidas do molde, esterilizadas por luz UV e posicionadas sobre um bloco de dentina contendo biofilme, que havia sido previamente enxaguado em solução salina para remoção de bactérias planctônicas. O conjunto bloco de dentina/amostra de cimento foram posicionados em uma placa de 48 poços. Sobre cada amostra foi depositada 20 µL de solução salina estéril

para evitar desidratação da amostra. As placas foram mantidas a 37°C pelos períodos de 5 e 15 horas de contato. Seis discos de cada material foram usados para cada período. O grupo controle não teve contato do biofilme com qualquer cimento, para posterior comparação dos resultados. Transcorrido o tempo de contato, os discos de cimento foram removidos e os blocos de dentina com biofilme remanescente, incluindo os blocos do grupo controle, foram individualmente colocados em tubos de ensaio com 1 mL de solução salina estéril e duas pérolas de vidro. Os tubos foram agitados em vortex (model Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil) por 1 min para desprendimento do biofilme remanescente.

A seguir, diluição decimal seriada de *E. faecalis* foi obtida. Ao final das diluições, três alíquotas de 20 µL de cada diluição foi inoculada em uma placa Petri com meio ágar *m-Enterococcus* (Difco Laboratories – Becton Dickinson and Company - USA) e armazenadas em ambiente de microaerofilia por 48 horas a 37°C.

A leitura de cada placa resultou na média de UFCmL⁻¹ nas três áreas de crescimento bacteriano, nas diluições com crescimento entre 5 e 50 colônias por campo. A partir dessas médias, o número de UFCmL⁻¹ foi calculado para cada cimento em cada período. Os dados foram submetidos a transformação logarítmica na base 10 e os resultados apresentados como a média dos seis espécimes por grupo.

Para todos os testes, 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

Tempo de presa

Na Tabela 2 observa-se que o grupo do MTA apresentou o menor tempo de presa inicial referente aos demais grupos ($p < 0,05$), que foram semelhantes entre si. Já o menor tempo de presa final foi apresentado pelo grupo CP/ZrO₂/HAn10%, e o maior, pelo grupo MTA.

Tabela 2 - Valores médios (minutos) e desvio-padrão dos diferentes cimentos para tempo de presa inicial e final.

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	CP/ZrO ₂ /HAn10%	CP/ZrO ₂ /HAn20%
Presa Inicial	23,67 ^a (± 3,445)	42,00 ^b (± 4,050)	40,33 ^b (± 3,670)	40,17 ^b (± 3,061)
Presa Final	170,7 ^D (± 5,391)	151,8 ^C (± 8,976)	100,5 ^A (± 3,082)	119,2 ^B (± 9,283)

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

Resistência à compressão

Os resultados obtidos apontam uma semelhança estatística entre o MTA e o CP/ZrO₂ no período de 24 horas. Para o período de 21 dias, o grupo CP/ZrO₂ apresentou os maiores valores ($p < 0,05$). O menor valor em ambos os períodos experimentais foram expressos pelo grupo CP/ZrO₂/HAn20%, como mostram os números na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios (MPa) e desvio-padrão dos diferentes cimentos para resistência a compressão após 24 horas e 21 dias.

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	CP/ZrO ₂ /HAn10%	CP/ZrO ₂ /HAn20%
24 horas	19,63 ^a (± 2,165)	23,29 ^a (± 3,232)	14,41 ^b (± 3,209)	4,943 ^c (± 1,489)
21 dias	29,51 ^B (± 4,580)	45,77 ^A (± 2,734)	30,90 ^B (± 5,321)	19,76 ^C (± 1,949)

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

Radiopacidade

Os grupos CP/ZrO₂ e CP/ZrO₂/HAn20% apresentaram menor radiopacidade quando comparados aos demais grupos. Os grupos do MTA e CP/ZrO₂/HAn10% apresentaram as maiores radiopacidades ($p > 0,05$), com base na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios (mmAl) e desvio-padrão dos diferentes cimentos referentes a radiopacidade.

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	CP/ZrO ₂ /HAn10%	CP/ZrO ₂ /HAn20%
mmAl	4,524 ^a (± 0,3745)	3,708 ^b (± 0,07050)	4,182 ^a (± 0,2951)	3,548 ^b (± 0,2018)

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

Solubilidade

Os maiores valores de solubilidade foram mostrados pelos CP/ZrO₂/HAn10% e CP/ZrO₂/HAn20% tanto no período de 2 como 7 dias, acima das normas de solubilidade para cimentos dentários. A menor solubilidade foi apresentada pelo grupo MTA e CP/ZrO₂ nos períodos de 2 e 7 dias. Valores na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios (%) e desvio-padrão da perda de massa dos diferentes cimentos para solubilidade nos períodos de 2 e 7, após 15 horas de imersão.

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	CP/ZrO ₂ /HAn10%	CP/ZrO ₂ /HAn20%
2 Dias	3,709 ^a	3,492 ^a	5,968 ^b	6,456 ^b
	(± 0,9187)	(± 0,4701)	(± 1,186)	(± 1,157)
7 Dias	5,542 ^A	5,974 ^A	7,911 ^B	7,638 ^B
	(± 1,221)	(± 1,324)	(± 1,175)	(± 1,394)

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

pH

O grupo MTA apresentou o menor valor de pH para o período experimental de 2 dias ($p < 0,05$). No tempo experimental de 7 dias pós-manipulação, os grupos se mostraram estatisticamente semelhante no período de 5 horas, e o MTA apresentou menos pH em relação aos outros grupos em 15 horas de imersão. Todos os grupos se mostraram superior ao grupo controle, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios (pH) e desvio-padrão dos diferentes cimentos para pH após 2 e 7 dias, 5 e 15 horas.

Grupos	MTA	CP/ZrO ₂	CP/ZrO ₂ /HAn	CP/ZrO ₂ /HAn	Controle
			10%	20%	
2 Dias	10,44 ^b	11,16 ^a	11,22 ^a	11,25 ^a	7,193 ^c
	(± 0,3011)	(± 0,1205)	(± 0,1235)	(± 0,0900)	(± 0,1026)
15 horas	10,99 ^B	11,30 ^A	11,30 ^A	11,38 ^A	7,450 ^C
	(± 0,0784)	(± 0,1006)	(± 0,1189)	(± 0,0697)	(± 0,0970)
7 Dias	10,58 ^a	10,55 ^a	10,71 ^a	10,68 ^a	7,562 ^b
	(± 0,2777)	(± 0,0990)	(± 0,1279)	(± 0,1836)	(± 0,2655)
15 horas	10,54 ^B	10,87 ^A	11,06 ^A	10,87 ^A	7,297 ^C
	(± 0,3724)	(± 0,1409)	(± 0,1152)	(± 0,2955)	(± 0,2091)

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

Teste de Atividade Antibiofilme

No tempo experimental de 2 dias pós manipulação, os grupos CP/ZrO₂/HAn10% e CP/ZrO₂/HAn20% apresentaram os melhores resultados em ambos os períodos, 5 e 15 horas, sendo que em 5 horas, CP/ZrO₂/HAn10% foi estatisticamente semelhante ao MTA e CP/ZrO₂.

No tempo experimental de 7 dias pós manipulação, os grupos apresentaram-se estatisticamente semelhantes entre si. Todos os cimentos apresentaram ação antibiofilme. (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios (UFC/mL) e desvio-padrão dos diferentes cimentos referentes a atividade antibiofilme.

Grupos		MTA	CP/ZrO ₂	CP/ZrO ₂ /HAn 10%	CP/ZrO ₂ /HAn 20%	Controle
2 Dias	5 horas	6,117 ^b (± 0,5849)	6,391 ^b (± 0,3679)	5,796 ^{ab} (± 0,1241)	5,379 ^a (± 0,3384)	7,110 ^c (± 0,3594)
	15 horas	6,509 ^B (± 0,6635)	6,712 ^B (± 0,2284)	4,997 ^A (± 0,2040)	5,446 ^A (± 0,2606)	7,730 ^C (± 0,8958)
7 Dias	5 horas	5,757 ^a (± 0,1568)	6,318 ^{ab} (± 0,3616)	5,961 ^a (± 0,3859)	6,023 ^a (± 0,5603)	6,765 ^b (± 0,5377)
	15 horas	5,651 ^A (± 0,3835)	5,384 ^A (± 0,3636)	5,358 ^A (± 0,4362)	5,351 ^A (± 0,3424)	6,916 ^C (± 0,3674)

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

Discussão

A inclusão materiais nanoparticulados tem sido realizada (Sanosh 2009; Li *et al.* 2013; Zakir *et al.* 2013) com objetivo de aperfeiçoar propriedades mecânicas (Dasgupta *et al.* 2013) e antimicrobianas (Evliyaoglu *et al.* 2011) de biomateriais.

No presente estudo, o MTA mostrou tempo de presa final de 170 ± 5 min, concordando com estudos anteriores (Parirokh & Torabinejad 2010; Grazziotin-Soares *et al.*

2013). A adição de HAn a 10% a associação de CP/ZrO₂ diminuiu o tempo de presa final. Uma possível explicação para a diminuição no tempo de presa pode ser a presença do composto nanoparticulado (HAn), que atuando como um material de preenchimento acelera o processo de hidratação devido a maior área de contato (Akbari *et al.* 2013).

Menor resistência à compressão foi observada para CP/ZrO₂/HAn10% e CP/ZrO₂/HAn20% quando comparado ao MTA no período de 24 horas. Na análise após 21 dias de presa, MTA e CP/ZrO₂/HAn10% foram similares e mostraram aumento na resistência quando comparado ao período de 24 horas (Camilleri 2008). O acréscimo de um material de preenchimento que diminui a porosidade do cimento pode resultar no aumento de sua resistência à compressão (Akbari *et al.* 2013). A adição de 10% de HAn proporcionou aumento na resistência à compressão do CP/ZrO₂ aos 21 dias, após seu período hidratação. No entanto, este resultado pode ter sido influenciado pela proporção pó/líquido e manipulação (Basturk *et al.* 2013), uma vez que o acréscimo de 20% de HAn não promoveu aumento na resistência à compressão, possivelmente devido a maior quantidade de água necessária para manipulação.

A adição 30% de ZrO₂ promove radiopacidade satisfatória para um material retro-obturador (Cutajar *et al.* 2011), segundo a norma ISO-6876 (2001). A radiopacidade do MTA e CP/ZrO₂/HAn10% é similar e maior que os demais grupos ($p < 0,05$). Ainda, todos os cimentos avaliados apresentaram radiopacidade acima dos 3 mm de alumínio mínimo exigido pelas normas de cimentos dentários (Camilleri *et al.* 2013; Grech *et al.* 2013).

A análise da solubilidade mostra menor solubilidade para o grupo do MTA (Torabinejad *et al.* 1995; Danesh *et al.* 2006) sendo similar ao CP/ZrO₂ no período de 2 dias e ao CP/ZrO₂/HAn10% no período de 7 dias ($p > 0,05$). O CP/ZrO₂/HAn20% apresentou a maior solubilidade em ambos os períodos avaliados, fato que também pode estar relacionado

à maior proporção de água necessária para sua manipulação (Fridland & Rosado 2003; Fridland & Rosado 2005).

O MTA e CP apresentam em sua composição o óxido de cálcio (CaO), precursor o hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), responsável pela liberação de íons hidroxila e elevação do pH do meio (Duarte *et al.* 2003). As associações de CP/ZrO₂/HAN10% e CP/ZrO₂/HAN20% demonstraram o maior valor de pH nos períodos avaliados. Camilleri *et al.* (2011) estudaram o processo de hidratação da associação de CP/ZrO₂ e MTA ProRoot quando imersos em HBSS, mostrando a presença de cálcio hidratado, hidróxido de cálcio e traços de etringita, relacionados à liberação de íons hidroxila e elevação do pH durante a hidratação do cimento.

O *E. faecalis* apresenta habilidade de sobreviver em meio alcalino de 11,1, além da capacidade de formar biofilme (Evans *et al.* 2002). O teste antimicrobiano por difusão em ágar, apesar de consagrados na literatura (Gomes *et al.* 2004; Morgental *et al.* 2011), apresenta limitações relacionadas à solubilidade e capacidade de difusão do material no meio (Nawal *et al.* 2011), além de dificuldade de avaliação de um material após presa. A metodologia desenvolvida por Faria-Junior *et al.* (2013) permite avaliação da propriedade antimicrobiana sobre bactérias na forma de biofilme, após a reação de presa dos cimentos, diferente dos estudos que avaliam ação antibacteriana na forma planctônica (Eldeniz *et al.* 2006).

Os cimentos avaliados não foram capazes de reduzir completamente o *E. faecalis*. Os grupos que mostraram maior ação diante o biofilme foram as associações contendo 10% e 20% de HAN, em relação ao MTA e CP/ZrO₂ ($p < 0,05$). No período experimental de 7 dias, todos os cimentos mostraram semelhança estatística e superior ao controle. Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2012), relataram que o pH de CP puro ou adicionado a diferentes radiopacificadores, como ZrO₂, atinge valores de 10,2. Assim como Faria-Junior *et al.* (2013)

o presente estudo demonstrou valores de pH semelhantes para o MTA e CP/ZrO₂/HAN10%, próximos ao necessário para atuação sobre *E. faecalis*. (McHugh *et al.* 2004).

A ação antimicrobiana de nanopartículas contra a formação de biofilme de *E. faecalis* tem sido estudada (Evliyaoglu *et al.* 2011; DaSilva *et al.* 2013; Wu *et al.* 2014), demonstrando que a atuação depende da forma de emprego das nanopartículas (Wu *et al.* 2014) e do tempo de contato (Shrestha & Kishen 2012). Segundo Wu *et al.* (2014), um maior tempo permite maior interação entre as cargas negativas da parede celular bacteriana e as cargas positivas das nanopartículas.

Ran *et al.* (2013) descreve que o pH do meio tem importância no efeito sobre *E. faecalis*, uma vez que a bomba de prótons presente na parede celular bacteriana, permite sua sobrevivência excretando H⁺ do citoplasma celular para manutenção da alcalinidade. Diante dos presentes resultados, a adição de 10% de HAN ao CP contendo ZrO₂ como radiopacificador demonstra adequadas propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme.

Conclusão

A associação de CP com ZrO₂ e HAN 10% proporciona propriedades físico-químicas, mecânicas e antibiofilme adequadas, com potencial para uso alternativo ao MTA.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio financeiro da FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – número de processo 2012/11318-9.

Referências

- Akbari M, Zebarjad SM, Nategh B, Rouhani A (2013) Effect of nano silica on setting time and physical properties of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* **39**, 1448-51.
- America Society for Testing and Materials Standard test method for time and setting of hydraulic-cement paste by Gilmore needles (2000), ASTM C266-03. Philadelphia.
- Basturk FB, Nekoofar MH, Gunday M, Dummer PM (2013) The effect of various mixing and placement techniques on the compressive strength of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* **39**, 111-4.
- Bates CF, Carnes DL, del Rio CE (1996) Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *Journal of Endodontics* **22**, 575-8.
- British Standards Stitution (1981) Specification for Denta Glass Ionomer Cements BS 6039.
- Camilleri J (2008) The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *International Endodontic Journal* **41**, 151-7.
- Camilleri J, Cutajar A, Mallia B (2011) Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dental Materials* **27**, 845-54.
- Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D (2013) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dental Materials* **29**, 580-93.
- Ciobanu CS, Massuyeau F, Constantin LV, Predoi D (2011) Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 degrees C. *Nanoscale Research Letters* **6**, 613.
- Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J (2011) Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dental Materials* **27**, 879-91.
- 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. *International Endodontic Journal* **39**, 213-9.
- Dasgupta S, Tarafder S, Bandyopadhyay A, Bose S (2013) Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* **33**, 2846-54.

- DaSilva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A (2013) Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *Journal of Endodontics* **39**, 249-53.
- Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga S de C (2003) pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **95**, 345-7.
- Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Orstavik D (2006) Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *Journal of Endodontics* **32**, 345-9.
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* **35**, 221-8.
- Evliyaoglu Y, Kobaner M, Celebi H, Yelsel K, Dogan A (2011) The efficacy of a novel antibacterial hydroxyapatite nanoparticle-coated indwelling urinary catheter in preventing biofilm formation and catheter-associated urinary tract infection in rabbits. *Urological Research* **39**, 443-9.
- Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *International Endodontic Journal* **46**, 755-62.
- Fischer EJ, Arens DE, Miller CH (1998) Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. *Journal of Endodontics* **24**, 176-9.
- Fridland M, Rosado R (2003) Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *Journal of Endodontics* **29**, 814-7.
- Fridland M, Rosado R (2005) MTA solubility: a long term study. *Journal of Endodontics* **31**, 376-9.
- Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC *et al.* (2004) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Brazilian Dental Journal* **15**, 30-5.
- Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *Journal of Endodontics* **37**, 203-10.
- Grazziotin-Soares R, Nekoofar MH, Davies TE *et al.* (2013) Effect of bismuth oxide on white mineral trioxide aggregate: chemical characterization and physical properties. *International Endodontic Journal*.

- Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013) Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dental Materials* **29**, e20-8.
- Guerreiro-Tanomaru JM, Cornelio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M (2012) pH and Antimicrobial Activity of Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dentistry* **2012**.
- International Organization for Standardization. (2001) Dental root sealing materials ISO 6876.
- Keiser K, Johnson CC, Tipton DA (2000) Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Endodontics* **26**, 288-91.
- Li Q, Deacon AD, Coleman NJ (2013) The impact of zirconium oxide nanoparticles on the hydration chemistry and biocompatibility of white Portland cement. *Dental Material Journal* **32**, 808-15.
- McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD (2004) pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *Journal of Endodontics* **30**, 218-9.
- Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM (2011) Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **44**, 1128-33.
- Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC (1998) Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *Journal of Endodontics* **24**, 184-6.
- Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR (2011) A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *International Endodontic Journal* **44**, 307-13.
- Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *Journal of Endodontics* **36**, 16-27.
- Ran S, He Z, Liang J (2013) Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts. *Archives of Oral Biology* **58**, 1667-76.
- Sanosh KP, Min-Cheol Chub, A. Balakrishnana, Yong-Jin Leea, T.N. Kima, Seong-Jai Chob (2009) Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. *Current Applied Physics* **9**, 1459-62.

- Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P (1999) A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of Endodontics* **25**, 1-5.
- Shrestha A, Kishen A (2012) The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *Journal of Endodontics* **38**, 1275-8.
- Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S (2006) Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **102**, 809-15.
- Sutha S, Kavitha K, Karunakaran G, Rajendran V (2013) In-vitro bioactivity, biocorrosion and antibacterial activity of silicon integrated hydroxyapatite/chitosan composite coating on 316L stainless steel implants. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* **33**, 4046-54.
- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics* **21**, 349-53.
- Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP (1997) Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *Journal of Endodontics* **23**, 225-8.
- Tripathi A, Saravanan S, Pattnaik S, Moorthi A, Partridge NC, Selvamurugan N (2012) Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **50**, 294-9.
- Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM *et al.* (2009) Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiol and Endodontics* **108**, e35-8.
- Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B (2014) Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics* **40**, 285-90.
- Zakir M, Al Kheraif AA, Asif M, Wong FS, Rehman IU (2013) A comparison of the mechanical properties of a modified silorane based dental composite with those of commercially available composite material. *Dental Materials* **29**, e53-9.

3 DISCUSSÃO

Desenvolvido no início dos anos 90 por Torabinejad (Torabinejad et al.³³, 1993), o Mineral Trióxido Agregado (MTA) é indicado para obturação retrógrada (Al-Kahtani et al.³, 2005), selamento de perfurações radiculares (Main et al.²¹, 2004), plug apical (Saunders²⁷, 2008) entre outras aplicações por suas propriedades físico-químicas e biológicas.

A adição do óxido de bismuto (Bi_2O_3) como radiopacificador no MTA prejudica suas propriedades físico-químicas (Coomaraswamy et al.¹⁰, 2007). Desta forma, Gomes Cornelio et al.¹⁷ (2011) avaliaram a citotoxicidade de diferentes radiopacificadores associados ao CP em cultura celular. A análise do Bi_2O_3 , óxido de zircônio (ZrO_2) e tungstato de cálcio (CaWO_4) em culturas de fibroblastos e osteoblastos, demonstrou que a associação de CP e ZrO_2 apresenta potencial para o uso alternativo como material retro-obturador.

A adição de HAn em biomateriais tem ocorrido em função de suas propriedades osteoindutoras e osteocondutora (Sanosh²⁶, 2009), biocompatibilidade (Wang et al.³⁵, 2013), e atividade antibacteriana (Evliyaoglu et al.¹⁴, 2011). O tamanho da partícula utilizada foi embasado nos resultados encontrados por Dasgupta et al.¹³ (2013) que avaliaram propriedades de HA em diferentes tamanhos, encontrando o melhor conjunto de propriedades físicas e biológicas para as nanopartículas.

O grupo de CP/ ZrO_2 associado a 10% de HAn merece destaque quanto as suas propriedades avaliadas, apresentando radiopacidade semelhante ao MTA (4,54 mm de Al para MTA e 4,18 mm para CP/ ZrO_2 /HAn10%), pH alcalino e resistência à compressão, assim como reduzido tempo de presa final. Os resultados de tempo de presa, resistência à compressão podem ser explicados pela adição de HAn que por apresentar uma maior superfície de contato, acelera a hidratação e aumenta os núcleos de cristalização do cimento, reduzindo o tempo de presa e aumentando a resistência à compressão (Popovich²³, 1979;

Ramachandran.²⁴, 1984). Os resultados apresentados no teste de pH, além de estar relacionado a solubilidade do material (Faria-Junior et al.¹⁵, 2013). A relação química entre os componentes do CP e da HAn ainda não elucidados, indicando a necessidade de estudos sobre interações químicas dos componentes.

A associação de CP com ZrO₂ 30% apresenta valores semelhantes ao MTA para solubilidade, tempo de presa, pH e resistência à compressão (Camilleri et al.⁶, 2011; Cutajar et al.¹¹, 2011). Apesar do menor valor em relação ao encontrado por Camilleri et al.⁶ (2011), a radiopacidade do CP/ZrO₂ foi superior a 3 mm de Al, mínimo exigido pela norma ISO-6876¹⁹ (2001). A solubilidade do MTA e CP/ZrO₂ foram semelhantes em ambos os períodos experimentais, 2 e 7 dias pós-manipulação. Tais resultados confirmam a associação de CP/ZrO₂ como material retro-obturador alternativo, uma vez que as propriedades avaliadas são semelhantes às apresentadas pelo MTA comercial.

Os grupos de CP/ZrO₂/HAn10% e CP/ZrO₂/HAn20% apresentaram maior solubilidade, acima dos padrões da norma ISO-6876¹⁹ (2001) referente à solubilidade dos cimentos odontológico, fato que pode ser justificado pela maior quantidade de água necessária para adequada manipulação do material, como demonstrado por (Basturk et al.⁵, 2013). Apesar dos valores elevados de pH e a radiopacidade mínima exigida pelas normas adotadas como parâmetro, a associação de CP/ZrO₂/HAn20% apresentou baixa resistência a compressão e maior tempo de presa quando comparado ao grupo de CP/ZrO₂/HAn10%.

A HAn demonstra resultados iniciais adequados para adição em biomateriais reparadores endodônticos. No entanto, estudos adicionais tornam-se necessários para avaliação das demais propriedades. Seu emprego na área de implantes/próteses, ou como *scaffolds* para regeneração óssea (Lima et al.²⁰, 2011; Wang et al.³⁵, 2013; Xavier Filho et al.³⁶, 2013) demonstra estimular maturação e densidade de formação. A incorporação da HAn

em biomateriais reparadores endodônticos pode melhorar as propriedades de osteoindução e osteocondução (Ciobanu et al.⁹, 2011).

Na análise antimicrobiana dos grupos pelo teste antibiofilme desenvolvido segundo (Faria-Junior et al.¹⁵, 2013), nenhum cimento foi capaz de eliminar bactérias do biofilme de *E. faecalis*. Os cimentos experimentais com 10% e 20% de HAn mostraram maior ação no período experimental de 2 dias pós presa em relação aos grupo MTA e CP/ZrO₂. Aos 7 dias, todos os cimentos foram estatisticamente semelhante e superior ao controle.

A literatura é escassa quanto ao relato do potencial antimicrobiano apresentando pelas partículas de HA. Os trabalhos existentes publicados podem embasar o resultado encontrado, onde foi notado a inibição da formação de biofilme quando a luz de cateteres urinários implantados em coelhos com infecção urinária foram revestidos por uma camada de HAn sintetizada com prata (Evliyaoglu et al.¹⁴, 2011) e a eficácia na inibição de culturas gram positivas e gram negativas pelo método de difusão em ágar quando HAn, em conjunto com partículas quitosana, inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* (Sutha et al.³⁰, 2013).

O conjunto de resultados apresentado pelo grupo experimental de CP com ZrO₂ e 10% de HAn foram satisfatórios e estimulam a execução de estudos para avaliação de outras propriedades físico-químicas e mecânicas do cimento, como infiltração bacteriana, solubilidade e pH em retrocavidade, fluidez e testes de *push out* para verificação da aderência do cimento à dentina apical.

A pesquisa do potencial de bioatividade do composto também deve compor parte nos próximos estudos a serem realizados, com imersão em HBSS e avaliação em da superfície em MEV, XRD, testes de viabilidade celular, citotoxicidade, indução de proliferação de células ósseas e testes *in vivo*, em subcutâneo de ratos, mostrando a resposta inflamatória do organismo diante o cimento.

CONCLUSÃO

A associação de CP com ZrO_2 e a adição de HAn 10% proporciona propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas e atividade antibiofilme, com potencial para uso alternativo ao MTA.

REFERÊNCIAS*

1. Aksakal B, Kom M, Tosun HB, Demirel M. Influence of micro- and nano-hydroxyapatite coatings on the osteointegration of metallic (Ti6Al4 V) and bioabsorbable interference screws: an in vivo study. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2013 May 21. [epub ahead of print].
2. Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Simon JH, Rotstein I. MTA preparations from different origins may vary in their antimicrobial activity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107(5): e85-8.
3. Al-Kahtani A, Shostad S, Schifferle R, Bhambhani S. In-vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral trioxide aggregate in permanent teeth with simulated immature apices. *J Endod*. 2005; 31(2): 117-9.
4. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. A comparative study of white mineral trioxide aggregate and white Portland cements using X-ray microanalysis. *Aust Endod J*. 2004; 30(3): 89-92.
5. Basturk FB, Nekoofar MH, Gunday M, Dummer PM. The effect of various mixing and placement techniques on the compressive strength of mineral trioxide aggregate. *J Endodontics*. 2013; 39(1): 111-4.
6. 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.
7. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater*. 2005; 21(4): 297-303.
8. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006; 39(10): 747-54.
9. Ciobanu CS, Massuyeau F, Constantin LV, Predoi D. Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 degrees C. *Nanoscale Res Lett*. 2011; 6(1): 613.
10. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod*. 2007; 33(3): 295-8.

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

11. 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.
12. Danesh G, Dammaschke T, Gerth HU, Zandbiglari T, Schafer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *Int Endod J.* 2006; 39(3): 213-9.
13. Dasgupta S, Tarafder S, Bandyopadhyay A, Bose S. Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite. *Mater Sci Eng. C, Mater Biol Appl.* 2013; 33(5): 2846-54.
14. Evliyaoglu Y, Kobaner M, Celebi H, Yelsel K, Dogan A. The efficacy of a novel antibacterial hydroxyapatite nanoparticle-coated indwelling urinary catheter in preventing biofilm formation and catheter-associated urinary tract infection in rabbits. *Urol Res.* 2011; 39(6): 443-9.
15. Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 755-62.
16. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod.* 2005; 31(5): 376-9.
17. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011; 37(2): 203-10.
18. Hungaro 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): 394-7.19.
19. International Standardization Organization. ISO 6876: dental root sealing materials. Geneva: ISO; 2001. p.7-8.
20. Lima CC, Silva TD, Santos L, Nakagaki WR, Loyla YC, Resck MC, et al. Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Braz J Biol.* 2011; 71(1): 115-9.
21. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod.* 2004; 30(2): 80-3.
22. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010; 36(1): 16-27.
23. Popovich G. Concrete making. Washington: McGraw-Hill Book; 1979.
24. Ramachandran VS. Concrete admixtures handbook. New Jersey: Noyes; 1984

25. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Jamshidi A, Irani S. Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: a comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013; 33(5): 2776-87.
26. Sanosh KP, Chub M-C, Balakrishnana A, Leea Y-J, Kima TN, Chob S-J. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. *Curr Appl Phys*. 2009; 9(6): 1459-62.
27. Saunders WP. A prospective clinical study of periradicular surgery using mineral trioxide aggregate as a root-end filling. *J Endod*. 2008; 34(6): 660-5.
28. Shi J, Dong LL, He F, Zhao S, Yang GL. Osteoblast responses to thin nanohydroxyapatite coated on roughened titanium surfaces deposited by an electrochemical process. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2012 Jul 26. [Epub ahead of print].
29. Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(6): 809-15.
30. Sutha S, Kavitha K, Karunakaran G, Rajendran V. In-vitro bioactivity, biocorrosion and antibacterial activity of silicon integrated hydroxyapatite/chitosan composite coating on 316L stainless steel implants. *Mater Sci Eng. C, Mater Biol Appl*. 2013; 33(7): 4046-54.
31. Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Guerreiro Tanomaru JM, Goncalves M. Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *J Endod*. 2007; 33(3): 249-51.
32. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995; 21(7): 349-53.
33. 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.
34. Tripathi A, Saravanan S, Pattnaik S, Moorthi A, Partridge NC, Selvamurugan N. Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2012; 50(1): 294-9.
35. Wang DX, He Y, Bi L, Qu ZH, Zou JW, Pan Z, et al. Enhancing the bioactivity of Poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold with a nano-hydroxyapatite coating for the treatment of segmental bone defect in a rabbit model. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 1855-65.
36. Xavier Filho L, Olyveira GM, Basmaji P, Costa LM. Novel electrospun nanofibers/PHB scaffolds for bone tissue regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013; 13(7): 4715-9.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, 18 de março de 2014

Adinael Trindade Junior