



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



BERNARDO CESAR COSTA

**ANÁLISE DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A
DIFERENTES RADIOPACIFICADORES**

Araraquara

2016



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



BERNARDO CESAR COSTA

**ANÁLISE DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A
DIFERENTES RADIOPACIFICADORES**

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

2016

Costa, Bernardo Cesar

Análise de cimentos à base de silicato de cálcio associado a diferentes radiopacificadores / Bernardo Cesar Costa.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

70 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

BERNARDO CESAR COSTA

**ANÁLISE DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A
DIFERENTES RADIOPACIFICADORES**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

2° examinador: Prof. Dr.(a) Anamaria Pessoa Pereira Leite

3° examinador: Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes

4° examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti - Filho

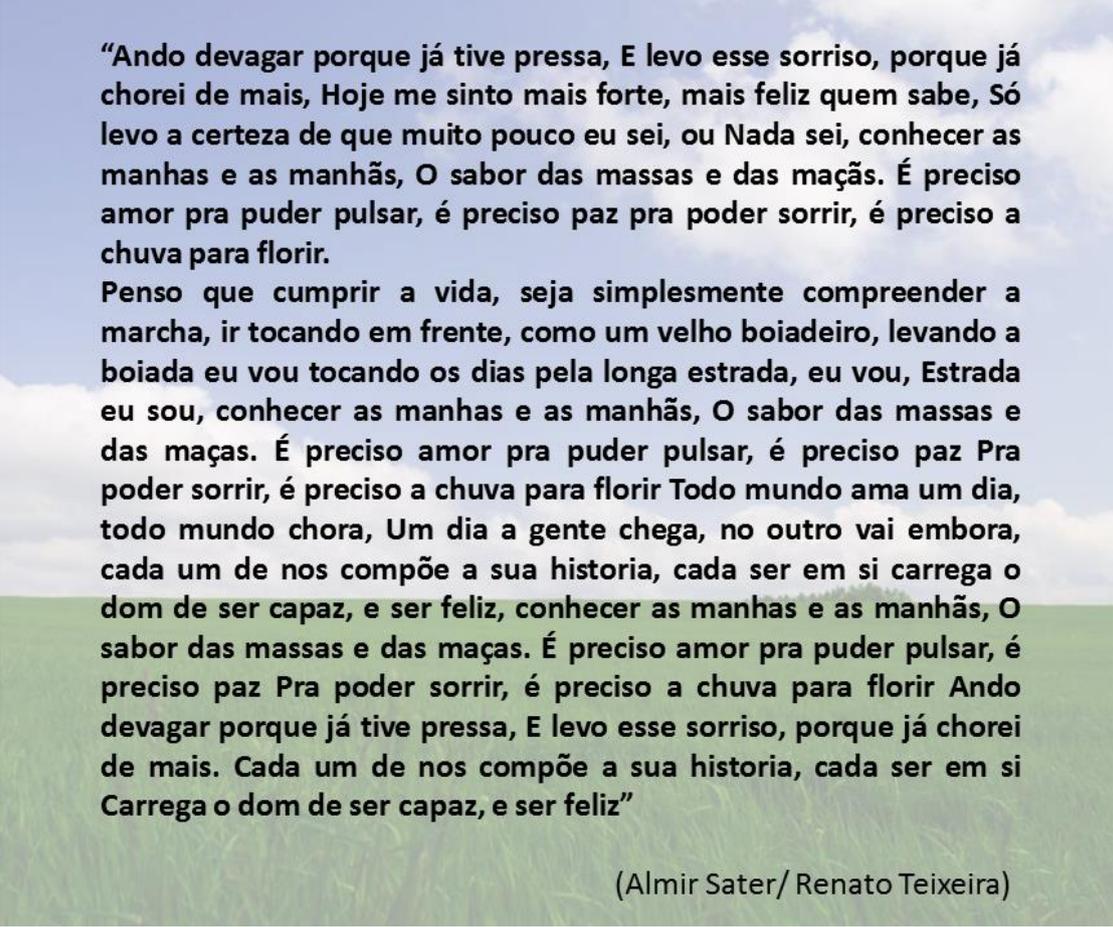
5° examinador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo

Araraquara, 16 de setembro de 2016

DADOS CURRICULARES

BERNARDO CESAR COSTA

- NASCIMENTO** 24/01/1977
Juiz de Fora – Minas Gerais
- FILIAÇÃO** Edson Costa
Elisabeth Cesar Costa
- 1998 – 2002** Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Nova Friburgo – FONF
- 2004 – 2005** Curso de especialização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP
- 2010 – 2012** Curso de Mestrado em Clínica Odontologia – ênfase em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Juiz de Fora – UFJF
- 2013 – 2016** Curso de Doutorado em Odontologia – Área de Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP



“Ando devagar porque já tive pressa, E levo esse sorriso, porque já chorei de mais, Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou Nada sei, conhecer as manhas e as manhãs, O sabor das massas e das maçãs. É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir.

Penso que cumprir a vida, seja simplesmente compreender a marcha, ir tocando em frente, como um velho boiadeiro, levando a boiada eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou, Estrada eu sou, conhecer as manhas e as manhãs, O sabor das massas e das maçãs. É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, Um dia a gente chega, no outro vai embora, cada um de nos compõe a sua historia, cada ser em si carrega o dom de ser capaz, e ser feliz, conhecer as manhas e as manhãs, O sabor das massas e das maçãs. É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir Ando devagar porque já tive pressa, E levo esse sorriso, porque já chorei de mais. Cada um de nos compõe a sua historia, cada ser em si Carrega o dom de ser capaz, e ser feliz”

(Almir Sater/ Renato Teixeira)

Dedicatória

Dedico esta tese a **Deus**. Acredito que somos capazes de conquistar aquilo que faz nossos corações bater mais forte, podemos superar obstáculos extraordinariamente grandes, desmedidos. Superamos qualquer medo, quando realmente queremos uma determinada coisa e enfrentamos adversidades espinhosas quando, internamente, desejamos muito. Mas, tudo isso torna-se impossível, irrealizável sem as mãos de Deus.

À **Nossa Senhora Aparecida e Santo Antônio**, por tudo e por todas as bênçãos que venho recebendo.

Aos meus pais, **Elisabeth e Edson**, que sempre de forma sacrificante, muito honesta e exemplar me proporcionaram condições emocionais, físicas, espirituais e financeiras, oferecendo orientação, apoio, educação e muito amor, fazendo sentir-me confiante e capaz de buscar meus objetivos.

À minha esposa amada, **Janaina**, por aceitar enfrentar esse desafio ao meu lado. Mesmo nos momentos mais difíceis de saúde, dúvidas e fraquezas esteve sempre ao meu lado, sendo meu esteio, meu arrimo. Sem dúvidas, um presente de Deus na minha vida. Ao seu lado tudo se torna mais bonito, mais alegre e importante. Sem você esse momento não faria o menor sentido. Te amo.

À minha filha querida, **Maria Sophia** por quem sinto um amor imensamente profundo, verdadeiro e impossível de se medir, difícil de compreender. Você simboliza de forma muito clara a presença de Deus na minha vida. Nossa afinidade é inimaginável, tomamos banho juntos, dormimos juntos, brincamos juntos, almoçamos juntos, andamos de bicicleta... Nossa amizade, parceria, amor e carinho parece sempre ter existido. Papai te ama.

Aos meus irmãos, **Fabiana e Leonardo**, que fazem parte de mim. Caminharam ao meu lado desde a infância, em momentos de extrema alegria e de grandes tristezas, brincamos e brigamos juntos. Vocês me ensinaram como é importante aprender a dividir: dividimos brinquedos, quarto, guarda-roupas e

sentimentos de amor pelos nossos pais. Hoje no final das contas, vocês somam muito na minha vida. São exemplos de pessoas retas e amigas. Vocês representam de forma genuína o sentido de verdadeiros irmãos.

Ao meu sobrinho querido que esta chegando, **Gabriel**, que simboliza esse novo momento, um milagre que só Deus pode explicar e que chegue com muita saúde, vida e torne nossa família ainda mais feliz.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, por me receber de maneira sincera e humana. Seu apoio, aliado ao seu respeito e reconhecimento abriu um universo de oportunidades, gerando um crescimento pessoal e profissional sem precedentes, mostrado sempre de maneira muito clara os melhores caminhos. Sua sabedoria e capacidade de ser objetivo me fizeram ter mais foco e tudo isso aumentou ainda mais minha admiração pelo grande professor, pesquisador e, sobretudo pelo grande ser humano que você é. Sem sua ajuda não teria chegado até aqui.

Agradecimentos

Aos meus avôs, **Mario e Delorme** (in memoriam) e **João e Cecília** (in memoriam), que nos deixaram muito cedo, mas ensinaram muito como o respeito e educação que os mais antigos tanto primavam.

Aos meus cunhados (a), **Aurélio e Marcilene**, por completarem a vida de meus irmãos e fortalecerem nossa família. Somos mais felizes com vocês por perto.

Aos meus queridos sogros, **Aldir e Ângela**, por apoiarem, respeitando sempre nossas decisões nos incentivando a buscar nossos caminhos, mesmo que, na maioria das vezes esses caminhos sejam distantes. Entendo, como Pai, como deve ser difícil ficar longe da filha. Mas, tenham certeza que acordo todos os dias com uma monumental vontade de ver a Janaina realizada e feliz.

A minha cunhada **Sabrina**, sua filha **Maria Catarina** e seu marido **André** por me acolherem, maternalmente nos braços da família Moreira. A alegria e espontaneidade de vocês me completa. Obrigado pelo carinho sempre.

Aos meus **tios, primos e primas**, da família Costa pelos momentos em família sempre com muita alegria.

Aos meus **amigos** que mesmo distantes estiveram sempre presentes em minha vida.

À minha tia **Etel**, seu filho **Tiago** e seu marido **Toninho** por serem apoiadores a qualquer tempo e circunstâncias. Muito obrigado pelo carinho que sempre recebi de vocês.

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. Elaine M. Sgavioli Massucato e vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pela Chefe de Departamento Prof.(a) Alessandra Nara de Souza Rastelli e vice-chefe Prof.(a) Dr.(a) Juliane Maria Guerreiro Tanomaru.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia**, representado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior.

Aos colegas da Pós-Graduação, **Alejandro, Ariel, Ariele, Camila Nascimento, Camila Espir, Carol Venção, Tiago, Paula, Guilherme X, Fernando, Kátia, Miriam, Keli, Juliana, Natália, Eric Hernán, Fernanda, Gabriela, Giovanna, Jader, Juliana, Keli, Kennia, Lauriê, Lucas, Luciana, Marcela, Mariana, Matheus, Patrícia, Rafaela, Roberto, Victor, Raqueli.**

Às amigas e parceiras de pós-graduação **Elisandra, Roberta, Gisselle e Ana Lívia**. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Sou muitíssimo grato pela ajuda que recebi. Muito obrigado.

Aos meus grandes amigos **Lelis e Guilherme Oliveira**, obrigado pela amizade sincera, pelas conversas e pelo convívio. Certamente, vocês fizeram minha passagem por Araraquara ser muito mais agradável.

Um agradecimento especial para **Alessandra e Adinael** (in memoriam). Que estejam em um lugar especial e que Deus dê muita força àqueles familiares que ficaram. Saudades!

À **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pela amizade e co-orientação em meu trabalho você foi fundamental para a realização deste projeto.

À **Profa. Dra. Gisele Faria**, pelos momentos de boa conversa e imensa ajuda no exame de qualificação. Suas considerações sempre claras e inteligentes foram fundamentais. Obrigado.

Ao docente **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert**, quando iniciei minha caminhada na endodontia, na especialização em Bauru, conheci um

professor apaixonado pela profissão. Naquela época, em 2004, o Prof. Alceu plantou uma sementinha da endodontia em mim. Hoje, depois de 12 anos vejo que, na verdade ele plantou uma floresta inteira e você, certamente, é a árvore mais frondosa e querida que ele deixou aqui para nós. Obrigado por dividir todo esse legado e amizade comigo.

Ao **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho** pelo exemplo de organização, entusiasmo e conhecimento. Conviver com você durante esses anos foi uma oportunidade impar de aprendizado clínico e de vida. Tenha certeza que você é um grande exemplo para mim.

Ao **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, pela amizade. Sua experiência de vida é espetacular. Você sabe perfeitamente entender o grito de liberdade e a força da vida em movimento. Essas qualidades cativam as pessoas que estão próximas de você. Você sabe, como ninguém, administrar as distâncias físicas e humanas. Seu carinho comigo e com minha família ai em Araraquara tornou nossa passagem por ai leve, agradável e cheia de momentos prazerosos.

À **Prof.(a) Dr(a) Anamaria Pessoa Pereira Leite** pelo apoio oferecido durante meus primeiros passos como professor substituto. Você acreditou que eu poderia ir além e me deu forças para buscar maiores conquistas. Obrigado pela confiança em mim depositada.

Ao **Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes** pela amizade e afinidade. “A afinidade não é o mais brilhante, mas, é o mais sutil, delicado e penetrante dos sentimentos. Ter afinidade é muito raro. Mas, quando existe, não precisa de códigos verbais para se manifestar. Existe antes do conhecimento, irradia durante e permanece depois que as pessoas deixaram de estar juntas.” Estas palavras de Artur da Távola traduzem de forma brilhante meu sentimento por você meu amigo. Você ocupa um lugar muito, muito especial em minha vida. Obrigado sempre e por tudo Ivaldo.

Ao **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, por compartilhar seu conhecimento, demonstrado sempre de maneira reflexiva e racional sua forma de compreender a endodontia e a vida.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, **Creusa, Bel, Cida, Marlene, Neuza, Marinho, Vanderlei, Priscila e Lucinha**. Obrigado pela ajuda, convivência e boa vontade em ajudar sempre.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **José Alexandre e Cristiano** pela paciência e orientação em inúmeros momentos.

Aos funcionários da Biblioteca, **Inês, Silvia, Eliane, Ceres, Marley e Adriano** pelo carinho e orientação..

Ao **CNPQ**, pela concessão da bolsa de estudos em nível Doutorado.

Agradeço também a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram nesse trabalho.

Costa BC. Análise de cimentos à base de silicato de cálcio associado a diferentes radiopacificadores [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 2016.

Resumo

O MTA e cimento Portland (PC) são cimentos de silicato de cálcio. O óxido de bismuto presente na MTA pode afetar as propriedades físico-químicas e biológicas do material. Novos radiopacificadores como óxido de itérbio (Yb_2O_3) e o tungstato de cálcio (CaWO_4) podem melhorar propriedades do material. No capítulo 1, foram realizadas avaliações de propriedades físico-químicas, citotoxicidade e potencial bioativo do MTA Angelus (MTA), cimento de silicato de cálcio (CSC) e CSC com 30% de óxido de Itérbio ($\text{CSC}/\text{Yb}_2\text{O}_3$). O tempo de presa inicial e final foi avaliado com agulhas Gilmore. A resistência à compressão foi analisada em máquina de ensaios mecânicos. A radiopacidade foi verificada com radiografias dos materiais e escala de alumínio. O teste de solubilidade e escoamento foram realizados de acordo com ISO 6876/2002. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e Tukey (5% de significância). A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio MTT e corante Vermelho Neutro, enquanto o potencial de mineralização por meio da atividade de fosfatase alcalina e vermelho de Alizarina. Os dados foram submetidos aos testes Anova e Tukey e Bonferroni (5% de significância). O potencial bioativo foi avaliado em microscopia eletrônica de varredura.

No capítulo 2, materiais à base de silicato tricálcico (TSC) associado ao tungstato de cálcio (CaWO_4) e Yb_2O_3 foram avaliados em comparação ao MTA (Angelus, Londrina, Brasil) e ao TSC. O tempo de presa inicial e final foi avaliado com agulhas Gilmore. A solubilidade foi analisada após imersão em água destilada. A radiopacidade foi avaliada por meio de radiografias dos materiais com escala de alumínio. O tempo de presa foi mensurado por agulhas de Gilmore. O pH foi avaliado por peagâmetro digital. A bioatividade foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura após imersão em

PBS. A alteração volumétrica (em mm³) foi avaliada em cavidades preenchidas com os materiais experimentais e escaneadas em Micro-CT (SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica) após 7 e 30 dias de imersão em água destilada. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, com 5% de significância. Conclui-se que o Yb₂O₃ associado ao cimento de silicato de cálcio promove radiopacidade adequada é citocompatível e apresenta potencial bioativo. Além disso, a associação do cimento de silicato tricálcico ao CaWO₄ e ao Yb₂O₃ promove radiopacidade, solubilidade, capacidade de alcalinização e baixa alteração dimensional, sugerindo seu uso como radiopacificador de materiais à base de silicato de cálcio.

Palavras-chave: Materiais dentários. Propriedades físicas e químicas. Cimento de silicato.

Costa BC. Analysis of calcium silicate cement based associated with different radiopacifiers [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 2016.

Abstract

The MTA and Portland cement (PC) are calcium silicate cements. Bismuth oxide in the MTA composition may affect physicochemical and biological properties. The ytterbium oxide (Yb_2O_3) and calcium tungstate CaWO_4 may improve the performance of the material. In Chapter 1, it was evaluated some physicochemical properties, bioactive potential and cytotoxicity of MTA Angelus (MTA), calcium silicate cement (CSC) CSC and 30% ytterbium oxide (CSC / Yb_2O_3). The setting time initial and final was evaluated with Gilmore needles. Compressive strength was analyzed on a mechanical testing machine. The radiopacity was observed with X-rays of the materials and aluminum scale. Solubility and flow tests were conducted based on ISO 6876/2002. The data were submitted to ANOVA and Tukey test (5% significance). Cell viability was assessed by MTT assay and Neutral Red dye, while the mineralization potential were evaluated by alkaline phosphatase activity and alizarin red. The data were submitted to tests One and Two Way ANOVA and Tukey and Bonferroni (5% significance). The bioactive potential was evaluated in scanning electron microscopy. In chapter 2, tricalcium silicate based (TSC) associated with calcium tungstate (CaWO_4) and Yb_2O_3 were evaluated in comparison to the MTA (Angelus, Londrina, Brazil) and pure TSC. The setting time initial and final was evaluated with Gilmore needles. Solubility was assessed after immersion in distilled water. The radiopacity was assessed by radiographs of materials with aluminum scale. The pH was measured by digital pH meter. The bioactivity was assessed by scanning electron microscopy after immersion in PBS. The volumetric change (in mm^3) was evaluated in cavities filled with experimental materials and scanned in Micro-CT (SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Belgium) after 7 and 30 days of immersion in distilled water. The data were submitted to ANOVA and Tukey's test at 5% significance. We concluded that Yb_2O_3

combined with calcium silicate cement provides adequate radiopacity is citocompatível and presents bioactive potential. Furthermore, the combination of tricalcium silicate cement to CaWO_4 and Yb_2O_3 promotes radiopacity, solubility, alkalinizing ability and low dimensional change suggesting its use as radiopacifier calcium silicate based materials.

Keywords: Dental materials. Physical and chemical properties. Silicate cement.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	19
3 PUBLICAÇÃO 1	20
4 PUBLICAÇÃO 2	39
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um cimento de silicato de cálcio indicado para tratamento de perfurações (Juarez Broon et al.²⁹, 2006), pulpotomia (Bortoluzzi et al.³, 2009), capeamento pulpar direto (Nair et al.³⁴, 2009), rizogênese incompleta (de Lima et al.¹⁴, 2007; Orosco et al.³⁵, 2010) e apicificações (Floratos et al.¹⁵, 2013), sendo composto por cimento Portland (CP) associado ao radiopacificador óxido de bismuto (Hwang et al.²⁷, 2009).

Considerando-se que o principal componente do MTA é o CP, vários estudos têm demonstrado que as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas destes materiais são semelhantes. Assim, MTA e CP são cimentos de silicato de cálcio (CSC) com propriedades semelhantes (Holland et al.²⁴, 2001; Islam et al.²⁸, 2006; Saidon et al.³⁸, 2003).

O silicato tricálcico (53,1%), silicato dicálcico (22,5%), óxido de bismuto Bi_2O_3 (21,6%) e traços de sulfato de cálcio são os principais componentes do MTA (Gandolfi et al.¹⁷, 2010; Saidon et al.³⁸, 2003). Desta forma, cimentos à base de silicato tricálcico são propostos como materiais alternativos ao MTA (Camilleri et al.⁸, 2013; Grech et al.²¹, 2013) uma vez que o silicato tricálcico é responsável pela bioatividade do material (Camilleri et al.⁸, 2013). Após a reação com água, ocorre a hidratação do silicato tricálcico e, conseqüentemente a formação do silicato de cálcio hidratado e do hidróxido de cálcio (Camilleri et al.⁷, 2011).

O mecanismo de ação biológica para o MTA, CP e hidróxido de cálcio foi semelhante em tecido subcutâneo de ratos (Holland et al.²⁴, 2001). A citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo também são semelhantes para MTA e CP (Saidon et al.³⁸, 2003). Propriedades físicas e mecânicas do MTA e CP apresentam semelhança, exceto para a radiopacidade, onde o CP apresenta resultados inferiores (Islam et al.²⁸, 2006)

A radiopacidade é uma propriedade essencial de um material retrobturador. A radiopacidade do MTA corresponde a 7,17 mm de alumínio (Torabinejad et al.⁴², 1995). O CP contendo 20% de Bi_2O_3 apresenta radiopacidade aceitável (Kim et al.³⁰, 2008). Porém a presença de Bi_2O_3 no MTA reduz a liberação de hidróxido de cálcio, aumenta a solubilidade e causa deterioração na estabilidade dimensional do material (Cutajar et al.¹², 2011).

Além disso, menor viabilidade celular foi demonstrada para a associação do CSC ao Bi_2O_3 em relação ao óxido de zircônio e tungstato de cálcio (Gomes Cornelio et al.¹⁹, 2011). Desta forma, novos radiopacificadores têm sido propostos como alternativa ao Bi_2O_3 .

O Bi_2O_3 presente no MTA, pode ser substituído por várias concentrações de óxido de zircônio (ZrO_2) no CP (Camilleri et al.⁷, 2011). Essa combinação na proporção de 30% deste radiopacificador demonstra radiopacidade, resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade similar ao ProRoot MTA (Cutajar et al.¹², 2011). A associação CP + 30 % de Bi_2O_3 e o MTA branco apresentaram radiopacidade (5,88 e 5,72 mm de Al, respectivamente), seguido por CP + óxido de zircônio ZrO_2 (3,87 mm de Al) e CP + iodofórmio (3,50 mm de Al) (Bortoluzzi et al.³, 2009).

O Itérbio (Yb) é um elemento macio, maleável e bastante dúctil que exibe um brilho prateado e reage lentamente com a água. O Yb nanoparticulado em solução de NaYbF_4 , usado como contraste em tomografias computadorizadas, demonstrando baixa citotoxicidade, além de ser, facilmente, excretado sem remanescentes detectáveis nos corpos de animais (Xing et al.⁴⁴, 2012).

O trifluoreto de itérbio (YbF_3) foi incorporado ao cimento ionômero de vidro (CIV) e demonstrou um aumento de 1% para 2% na dureza superficial do material, além da redução do tempo de presa e do tempo de trabalho (Prentice et al.³⁶, 2006). Em outro estudo a radiopacidade do YbF_3 foi comparada ao dióxido de titânio, quartzo, zircônia, Bi_2O_3 , sulfato de bário, demonstrando que pelo menos 30% de YbF_3 foram suficientes para se conseguir uma radiopacidade satisfatória, sem alterar as propriedades do cimento experimental (Collares et al.¹⁰, 2010).

Tungstato de cálcio (CaWO_4) têm sido empregado como radiopacificador em cimentos para uso na Endodontia. Recentemente, esse composto foi incorporado ao cimento MTA HP (Angelus, Londrina, Brasil). O MTA HP, em lançamento pela Angelus (Brasil). O material apresenta as mesmas indicações que o cimento MTA. (Silva et al.⁴⁰, 2016; Camilleri et al.⁸, 2013)

Em recente estudo, foi demonstrado que um cimento à base de silicato de cálcio o associado ao radiopacificador CaWO_4 apresenta propriedades físico-químicos semelhantes ao MTA Angelus, como tempo de presa, baixa solubilidade, pH alcalino e ainda libera íons cálcio (Bosso-Martelo et al.⁴, 2016).

Além disso, essa associação apresenta potencial bioativo e composição semelhante ao MTA Angelus (Collares et al.¹⁰, 2010).

O potencial bioativo dos CSC tem sido demonstrado. Após imersão de dois cimentos à base de silicato de cálcio e o ProRoot MTA branco em PBS, precipitados de cristais de apatita na interface material-dentina foram observados aumentando de acordo com o tempo de imersão. (Shokouhinejad et al.³⁹, 2012).

A estrutura e composição química do precipitado formado após a imersão do ProRoot MTA branco é formada de carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio quando imerso em água destilada e de fosfato de cálcio quando imerso em PBS (Han et al.²³, 2010). Alguns autores observaram que o MTA em contato com soluções de fosfato, resultava na formação de cristais de apatita (Martin et al.³², 2007; Reyes-Carmona et al.³⁷, 2009). Os íons de cálcio liberado pelo MTA reagem com o fosfato do PBS, resultando na formação de hidroxiapatita ou apatita carbonada (Bozeman et al.⁵, 2006; Gandolfiet al.¹⁷, 2010). Os cimentos à base de silicato de cálcio são descritos como materiais bioativos, estáveis e capazes de promover formação de cristais de hidroxiapatita (Han et al.²³, 2010)

A microtomografia computadorizada (micro CT) representa um importante meio de para avaliação de propriedades de materiais, apresentando características não destrutiva e tridimensional. Este método tem sido usado para análise de diversas propriedades, como alterações volumétricas de materiais, presença de falhas em obturações, forma e limpeza do canal radicular, entre outras (Hammad et al.²², 2009; Metzger et al.³³, 2010; Somma et al.⁴¹, 2011). A alta resolução proporcionada pela microtomografia pode ser usada para análise de materiais e técnicas em endodôntia, aperfeiçoando a avaliação de materiais (De-Deus¹³, 2012).

Dentre algumas propriedades, a solubilidade apresentada pelo material retrobturador deve seguir normas da American National Standar Institut / American Dental Association, / American Dental Association (ANSI/ADA) sendo inferior a 3% (ANSI/ADA Specification no. 57¹, 2000; Hungaro Duarte et al.²⁶, 2012).

A microtomografia computadorizada tem sido proposta para análise da solubilidade de forma alternativa, o uso da por meio da quantificação da alteração volumétrica (Cavenago et al.⁹, 2014).

Novos radiopacificadores como óxido de itérbio (Yb_2O_3) e tungstato de cálcio (CaWO_4) podem ser associados aos cimentos de silicato de cálcio e ao silicato de tricálcico. Propriedades físico-químicas e biológicas destas novas associações devem ser avaliadas visando o desenvolvimento de uma novas propostas de biomateriais.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- 1- Investigar o tempo de presa, solubilidade, resistência à compressão, radiopacidade, escoamento, citotoxicidade e potencial bioativo do MTA Angelus (MTA), cimento de silicato de cálcio (CSC) e CSC associado ao radiopacificador óxido de itérbio (CSC/Yb₂O₃) em concentração de 30% - *publicação 1.*
- 2- Avaliar as propriedades de solubilidade, radiopacidade, tempo de presa, pH, além do potencial bioativo e alteração volumétrica em Micro-CT de materiais à base de silicato tricálcico (STC) associado aos radiopacificadores tungstato de cálcio (CaWO₄) e o óxido de itérbio (Yb₂O₃) em comparação ao MTA (Angelus, Londrina, Brasil) e ao STC – *publicação 2.*

3 PUBLICAÇÃO 1

Óxido de Itérbio como radiopacificador de cimentos à base de silicato de cálcio. Propriedades físico-químicas e biológicas*

Resumo

Objetivo Avaliar propriedades físico-químicas, citotoxicidade e potencial bioativo do MTA Angelus (MTA), cimento de silicato de cálcio (CSC) e CSC com 30% de óxido de Itérbio (CSC/Yb₂O₃).

Materiais e métodos O tempo de presa inicial e final foi avaliado com agulhas Gilmore. A resistência à compressão foi analisada em máquina de ensaios mecânicos. A radiopacidade foi verificada com radiografias dos materiais e escala de alumínio. Os testes de solubilidade e escoamento foram realizados baseados na ISO 6876/2002. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e Tukey (5% de significância). A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio MTT e corante vermelho neutro, e o potencial de mineralização por meio da atividade de fosfatase alcalina e vermelho de alizarina. Os dados foram submetidos aos testes Anova e Tukey e Bonferroni (5% de significância). O potencial bioativo foi avaliado em microscopia eletrônica de varredura.

Resultados Os materiais apresentaram tempo de presa inicial e escoamento semelhantes. O CSC/Yb₂O₃ apresentou menor solubilidade. MTA apresentou menor resistência à compressão e radiopacidade semelhante ao CSC/Yb₂O₃. Todos os materiais promoveram viabilidade celular e a atividade da enzima fosfatase alcalina foi semelhante. A análise em MEV mostrou estruturas sugerindo a presença de depósitos de fosfato de cálcio na superfície dos materiais, demonstrando potencial bioativo.

Conclusão O Yb₂O₃ associado ao cimento de silicato de cálcio apresenta propriedades físico-químicas adequadas, é citocompatível e demonstra potencial bioativo, sugerindo seu uso como radiopacificador de materiais à base de silicato de cálcio.

Relevância clínica CSC/Yb₂O₃ apresenta potencial para uso como radiopacificador de de materiais de silicato de cálcio.

Palavras-chave Cimento Portland. Radiopacidade. Cimento de silicato de cálcio. Agente radiopacificador.

* Artigo submetido para publicação no periódico Clinical Oral Investigation

Introdução

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um material à base de cimento Portland (CP), composto por silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, silicato de cálcio [1] associado ao óxido de bismuto como radiopacificador [2]. O MTA apresenta várias indicações clínicas como tratamento de perfurações [3], pulpotomias [4], capeamento pulpar direto [5], rizogênese incompleta [6, 7] e apicificações [8]. O CP é um cimento de silicato de cálcio (CSC) com propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas semelhantes ao MTA [9-11].

O óxido de bismuto (Bi_2O_3) presente no MTA reduz a liberação de hidróxido de cálcio, aumenta a solubilidade e causa deterioração na estabilidade dimensional do material [12]. Além disso, menor viabilidade celular foi demonstrada para a associação do CSC ao Bi_2O_3 em relação ao óxido de zircônio (ZrO_2) e tungstato de cálcio (CaWO_4) [13]. O Bi_2O_3 tem sido responsável pela descoloração dos dentes por interagir com o colágeno dos tecidos dentais duros [14] além de reagir com o hipoclorito de sódio usado no tratamento endodôntico [15]. Desta forma, novos radiopacificadores têm sido estudados como alternativa ao Bi_2O_3 .

Substâncias contendo Itérbio (Yb) são empregadas em exames por imagem [16]. O Yb é um metal macio, maleável e bastante dúctil que reage lentamente com a água. Nanopartículas de Yb (NaYbF_4) apresentam baixa citotoxicidade e não causam dano tecidual [17]. A incorporação do trifluoreto de Itérbio (YbF_3) ao cimento ionômero de vidro promoveu aumento da dureza do material, além da redução do tempo de presa e de trabalho [18]. A utilização do YbF_3 na concentração de 30% foi suficiente para promover radiopacidade satisfatória, sem alterar as propriedades de um cimento experimental [19].

A associação do CP ao YbF_3 demonstrou radiopacidade superior a 4 mm/Al e aumento na resistência à compressão do material [20]. A natureza deste metal não é crítica para ligação do DNA, clivagem do DNA e não apresentam citotoxicidade [21].

Os cimentos à base de CSC são descritos como materiais bioativos, estáveis e capazes de promover formação de cristais de hidróxiapatita [22]. A análise da estrutura e composição química desses materiais mostrou a formação de carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio quando imerso em água destilada e a formação de fosfato de cálcio quando imerso em PBS [23]. O MTA em contato com soluções fosfatadas promove a formação de cristais de apatita [24-26]. Os íons cálcio liberados pelo MTA reagem com o fosfato do PBS, resultando na formação de hidroxiapatita ou apatita carbonada [27, 28].

O objetivo deste estudo foi avaliar propriedades físico-químicas e biológicas da associação do Yb_2O_3 ao cimento à base de silicato de cálcio.

Materiais e métodos

Para avaliação das propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais experimentais (Tabela 1), serão realizados os seguintes ensaios.

Avaliação das propriedades físico-químicas

Tempo de presa

O teste de tempo de presa foi realizado segundo a ISO 6876/2002. Foram confeccionados 6 corpos-de-prova para cada material com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. Uma agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e $2 \pm 0,1$ mm de diâmetro de ponta foi utilizada para o tempo de presa inicial e uma outra agulha de Gilmore com massa de $456 \pm 0,5$ g e $2 \pm 0,1$ mm de diâmetro de ponta foi utilizada para o tempo de presa final, segundo a ASTM C-266-03 (2007). Os materiais foram mantidos na estufa a 37°C durante o experimento. O tempo de presa foi determinado como a média de tempo entre o início da manipulação e o tempo transcorrido até que a agulha não promovesse marcas na superfície dos cimentos.

Solubilidade

Moldes circulares foram confeccionados tendo como base as medidas preconizadas por Carvalho-Júnior et al. [29], apresentando 1,5 mm de espessura e 7,75 mm de diâmetro interno. Cada molde foi posicionado sobre lamínula de vidro recoberta por uma película de papel celofane e preenchido com o material a ser avaliado ($n=6$). Um fio de nylon foi incluído na massa dos cimentos. O conjunto foi armazenado em estufa com temperatura de 37°C por 15 horas, até a completa presa do material. Os corpos de prova foram removidos dos moldes, pesados em balança de precisão HM-200 (A & D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA) até estabilização da massa (massa inicial) e suspensos por meio da fixação 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 para assim serem pesados novamente até estabilização da massa, obtendo-se a massa final. A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa original. As pesagens foram repetidas três vezes para cada amostra.

Resistência à compressão

Para o teste de resistência à compressão, os corpos de prova ($n=6$) foram confeccionados de acordo com Islam et al. [10]. Os cimentos foram colocados dentro de um molde de forma cilíndrica com 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro. O conjunto foi colocado na estufa. Após 3 horas as amostras foram removidas do molde e a superfície plana de cada amostra foi delicadamente lixada com uma lixa de papel de granulometria 600. As amostras ficaram na estufa (37°C e 95% umidade) até o período de 24 horas e 21 dias, as quais foram submetidas ao teste de compressão em uma máquina de ensaios Emic DL (Emic Equipamentos e Sistemas de Ensaio, São José dos Pinhais – PR, Brasil) com uma célula de carga de 5KN a uma velocidade

de 0,5mm/minuto. A tensão máxima suportada em MPa foi calculada (MPa) usando a força máxima suportada e o diâmetro dos cilindros ($1Pa=1N/1m^2$).

Radiopacidade

O teste de radiopacidade foi realizado segundo Tanomaru-Filho et al. [30]. Foram utilizados anéis metálicos com diâmetro interno de 10 mm e altura de 1 mm, sendo confeccionados 6 corpos de prova para cada material. Após a manipulação, os materiais foram colocados nos anéis preenchendo-os. Esses anéis foram mantidos a 37°C e 100% de umidade, por 48 horas, para que tomassem presa. Após esse período de tempo, foi posicionado um disco de cada material e uma escala de alumínio sobre um filme oclusal onde foram radiografados. As radiografias foram realizadas com um aparelho de Raios-X GE 1000 (General Electric, Milwaukee, WI) operando a 50 kV, 10 mA e 18 pulsos por segundo, com distância focal de 33 cm, em filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY). Os filmes foram revelados com solução nova em uma reveladora automática, digitalizados com escâner e avaliados usando o software UTHSCSA ImageTool for Windows version 3.00, onde foram selecionadas as áreas de cada degrau da escala de alumínio e dos cimentos para determinar a equivalência da radiopacidade dos cimentos em milímetros de alumínio.

Escoamento

O teste de escoamento foi realizado de acordo com a norma ISO 6876:2002. Após a manipulação dos materiais, 0,05 mL de cimento foi colocado no centro de uma placa de vidro. Outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o cimento e um peso de 100 gramas sobre a placa superior, totalizando 120 g mantidos por 10 minutos. A média entre o maior e menor diâmetro do cimento entre as placas de vidro foi mensurada. A diferença entre os valores do maior e menor diâmetro foi menor que 1 mm para todas as amostras. Para cada material avaliado foram realizadas 6 amostras. A área ocupada pelo cimento também foi utilizada para análise do escoamento. Para isso, os corpos de prova foram fotografados ao lado de uma régua milimetrada e as imagens foram avaliadas no programa UTHSCSA Image Tool for Windows Versão 3.00 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>) para cálculo a área do cimento em mm².

Avaliação das propriedades biológicas

Cultura de células e preparação dos extratos dos materiais

As células Saos-2 (ATCC HTB-85) foram cultivadas em frascos T-75 (Jetbiofil, Elgin, SR, EUA), contendo o meio D-MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA),

penicilina (100 IU / mL) (Sigma-Aldrich), estreptomicina (100 ug / mL) (Sigma-Aldrich) em 95% de atmosfera úmida, 5% de CO₂ e 37 ° C até confluência.

Para o preparo dos materiais, um grama de pó foi pesado e manipulado com água destilada sobre uma placa de vidro estéril. Após a preparação, o material foi adaptado no fundo do poço de uma placa de 12 poços e hidratada com gaze umidificado. As placas foram então mantidas a 37°C durante 15 horas para permitir a reação de presa completa dos materiais. Após este tempo, as placas foram expostas à luz ultravioleta durante 30 minutos, para desinfecção e 5 mL de meio de cultura DMEM, sem FBS, foi colocado em cada poço das placas, e mantido durante 24 horas (37°C, 95% umidade e 5% de CO₂). Após 24 horas, para observar dose-resposta de cada material foram realizadas diluições dos extratos (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8) em D-EMEM sem PBS.

Ensaio MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Este ensaio baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o tetrazólio amarelo, solúvel em água 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich) em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional à quantidade de células vivas. Após a contagem e plaqueamento das células osteoblásticas Saos-2 (1x10⁵ células / ml) em placas de 96 poços com meio de cultura D-MEM com FBS a 10%, as células foram expostas durante 24 horas aos extratos dos cimentos (200 ul/ poço) em diluições de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 e controle (células não expostas aos extratos). Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por 100 uL de MTT (0,55 mg/ml) com incubação de 3 horas. Em seguida, cada poço foi lavado com 200 ul de tampão de fosfato 1X (PBS 1X, Sigma-Aldrich), e 100 uL de álcool isopropílico (HCl 0.04N álcool isopropílico, Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada poço para solubilizar o formazan. A densidade óptica (OD = 570 nm) foi medida utilizando um leitor de microplacas automatizado. Três experimentos independentes foram realizados (n=12 por grupo).

Ensaio de vermelho neutro (NR)

Vermelho neutro é um corante vital que é incorporado por endocitose e acumula-se nos lisossomos de células que têm as suas membranas intactas. Para esse ensaio, 1x10⁵ células/ml foram plaqueadas em placas de 96 poços com meio D-MEM com FBS a 10%, as quais foram incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas durante 24 horas aos extratos dos cimentos (200 ul/ poço) que foram substituídos por 100 uL de solução de 50 ug de NR / ml (Sigma-Aldrich), seguido por incubação a 37°C, 95% de humidade e 5% de CO₂ durante 3 horas. Em seguida, a solubilização foi realizada com 100 uL da solução (50% etanol e 1% de ácido acético) (Sigma-Aldrich). As densidades ópticas foram medidas em espectrofotómetro (Elx800) a 570 nm de comprimento de onda [31]. Três experimentos

independentes foram realizados (n=12 por grupo). De acordo com os resultados de MTT e vermelho neutro, a diluição de cimento selecionada para as análises subsequentes foi de 1: 8.

Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada pelo kit comercial Labtest (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O princípio do método é a hidrólise de monofosfato de timolftaleína por fosfatase alcalina produzida pelas células, o que irá liberar a cor azul da timolftaleína em meios alcalinos. Após 24 horas do plaqueamento (1×10^5 células / mL em placas de 96 poços), células Saos-2 foram expostas ao extrato dos cimentos na diluição de 1: 8, ao longo do período de 1, 3 e 7 dias. Os materiais eluídos foram renovados a cada dois dias durante todos os 7 dias de exposição das amostras. Depois de cada período experimental, todos os extratos de cimento foram removidos e as células lavadas com 200 μ L de PBS 1X, seguido pela adição de 200 μ L de uma solução de sulfato de lauril e sódio (1% em água destilada, Sigma-Aldrich) a cada poço. As amostras passaram por um período de repouso de 30 minutos à temperatura ambiente. De acordo com a recomendação do fabricante, 5 μ L de cada amostra foi transferido em solução de sulfato de lauril e para microtubos (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), contendo substrato e o tampão de enzima. Os sistemas foram incubadas a 37 ° C durante 10 min e adicionou-se 500 μ L de reagente de cor.—A densidade óptica foi avaliada em leitor de microplacas automático (ELx800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 590 nm. O ensaio foi realizado em sextuplicata e repetida três vezes de forma independente (N = 18 / grupo). Os dados foram expressos como a atividade de ALP normalizada pelo número de células viáveis no respectivo período de cultura (DO = 570 nm) [32].

Coloração vermelho de Alizarina (ARS)

O corante vermelho de alizarina é usado para identificar os depósitos de cálcio em culturas de células. A fim de avaliar a quantidade de cálcio depositado pelas células expostas aos diferentes materiais à base de silicato de cálcio, células Saos-2 foram contadas e plaqueadas (1×10^4 células/ml) em placas de cultura de 12 poços. Para este experimento o meio de cultura foi suplementado com 50 μ g/mL de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich) e 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich). Durante 21 dias, o meio D-MEM, com e sem os extratos de cimento (diluição 1:8), foi renovado a cada dois dias.

Após este período o meio foi aspirado, os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com paraformaldeído a 10% (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente durante 15 minutos. As monocamadas foram então lavadas duas vezes com água destilada antes de se adicionar 1 mL do corante vermelho de alizarina (2% - pH 4,1 da Sigma-Aldrich) e, assim, mantida à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após este período, o corante foi aspirado e os poços lavados 4 vezes com água destilada (1 mL). As placas foram então, ligeiramente inclinadas para

favorecer a aspiração e deixadas por 2 minutos para facilitar a remoção do excesso de água, e foram imediatamente fotografadas (Canon EOS-1D, a Canon Inc, Tóquio, Japão) e analisadas com o programa ImageTool (Faculdade de Odontologia da Universidade do Texas Health Science Center, San Antonio, TX, EUA). Três experimentos independentes foram realizados (n=12 por grupo).

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e Tukey com 5% de significância para os testes físico-químicos e mecânicos. Comparações da viabilidade celular, atividade da ALP foram analisadas por Two-way análise de variância (ANOVA) com pós-teste Bonferroni. Comparações de vermelho de alisarina foram realizadas por ANOVA one-way seguido por teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

Potencial bioativo

Os materiais foram manipulados e adaptados em moldes cilíndricos medindo 1 mm de altura x 7,5 mm de diâmetro, permanecendo em estufa a 100% de umidade e 37° C. Após esse período de presa, as amostras ficaram completamente imersas numa solução de PBS (para 500ml de água destilada; NaCl anidro - 90g, Na₂HPO₄ - 13,65g, Na₂H₂PO₂H₂O - 2,42g). Os corpos de prova permaneceram imersos no PBS e acomodados numa incubadora a 37°C durante 28 dias. Após esse período, foi colocada sílica gel e soda lima em um recipiente, próximo às amostras, e mantidas na estufa por 12 horas para remoção do excesso de umidade dos materiais, que, posteriormente, foram revestidas de carbono para que houvesse condutividade elétrica. A avaliação microestrutural da superfície dos cimentos foi realizada por meio da visualização em microscópio eletrônico de varredura MEV (JEDL, JSM-6610LV Scanning Electron Microscope, USA) no modo de elétrons secundários.

Resultados

Avaliação das propriedades físico-químicas

Avaliando o tempo de presa, a associação CSC/Yb₂O₃, CSC puro e o MTA foram semelhantes quanto ao TPI ($p>0,05$). O CSC puro e a associação CSC/Yb₂O₃ apresentaram menores valores de TPF que o MTA ($p<0,05$). No teste de solubilidade, todos os materiais apresentaram valores abaixo de 3%, preconizados pela norma ISO 6876. O MTA e CSC/Yb₂O₃ foram semelhantes ($p>0,05$).

A associação de CSC/Yb₂O₃ e CSC puro foram semelhantes ($p>0,05$) quanto à resistência à compressão do CSC puro nos dois períodos experimentais (24 horas e 21 dias). MTA apresentou menor resistência à compressão ($p<0,05$). Em relação ao teste de radiopacidade, a associação CSC/Yb₂O₃ foi semelhante ao MTA ($p>0,05$) como mostra a tabela 2. Exceto o CSC

puro, todos os materiais apresentaram uma radiopacidade superior a 3 mm/Al, como sugerido pela ISO 6876.

O escoamento foi similar para o MTA, CSC/Yb₂O₃ e CSC puro (6,87 mm, 6,11 mm e 6,53 mm, respectivamente), quanto ao diâmetro. Porém, CSC/Yb₂O₃ apresentou o maior escoamento na análise de área (40,40 mm²).

Avaliação das propriedades biológicas

Ensaio MTT

O teste de viabilidade celular mostrou que o MTA, CSC e CSC/Yb₂O₃ não apresentaram efeito citotóxico, uma vez que a viabilidade celular foi superior ($p < 0,05$) ou semelhante ao do grupo controle ($p > 0,05$) em todas as diluições. (Fig. 1A).

Ensaio de vermelho neutro (NR)

O ensaio NR mostrou também que o MTA, CSC e CSC/Yb₂O₃ não apresentaram efeito citotóxico, uma vez que a viabilidade celular foi superior ($p < 0,05$) ou semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$), exceto para a diluição de 1:1, onde houve menor viabilidade celular para os materiais em relação ao grupo controle. Na diluição de 1:8, a proliferação celular foi significativamente mais elevada para o material CSC/Yb₂O₃ em comparação aos demais ($p < 0,05$). Foi observada na diluição 1:8, maior viabilidade celular em relação ao grupo controle para o grupo CSC/Yb₂O₃. Assim, a diluição 1:8 foi selecionada para os experimentos subsequentes (Fig. 1B).

Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A menor viabilidade celular e atividade da fosfatase alcalina foi observada no primeiro dia de exposição (Fig 2A e 2B). A atividade de ALP, para todos os grupos, foi aumentada após esse período (Fig. 2B). No terceiro dia de exposição observou-se uma maior atividade de ALP para os grupos MTA e CSC quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$). No sétimo dia de exposição, todos os grupos foram semelhantes ao controle para a atividade de fosfatase alcalina ($p > 0,05$).

Coloração do vermelho de alisarina (ARS)

Todos os materiais induziram a uma maior produção de nódulos mineralizados quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 2D). Os grupos MTA e CSC produziram mais nódulos mineralizados entre os materiais avaliados ($p < 0,05$) (Fig. 2C).

Potencial bioativo

Foram observadas estruturas que sugerem a presença de depósitos de fosfato de cálcio na superfície dos materiais, demonstrando seu potencial bioativo (Figura 3).

Discussão

O radiopacificador presente no MTA (Bi_2O_3) aumenta a porosidade do material e diminui a longevidade do cimento [33]. O Yb é um metal com grande potencial radiopacificador devido ao seu elevado número atômico ($Z=70$). Em relação ao tempo de presa inicial, todos os materiais foram semelhantes ($p<0,05$). O CSC puro e CSC/ Yb_2O_3 apresentaram menores valores de tempo de presa final que o MTA. Antonijevic et al. [20] observaram menor tempo de presa inicial para a associação de CSC com YbF_3 , quando comparado ao CSC puro [20].

A escolha de um radiopacificador é fundamental para diferenciação do material das áreas adjacentes [34]. Neste estudo, a associação CSC/ Yb_2O_3 apresentou radiopacidade semelhante ao MTA, (5,02 e 5,34 mm/Al respectivamente) ($p>0,05$) e superior ao CSC puro (1,60 mm/Al). Exceto o CSC puro, todos os materiais apresentaram uma radiopacidade superior a 3mm/Al, conforme sugerido pela ISO 6876 [35]. O MTA contém cerca de 25% de óxido de bismuto e o CSC foi associado a 30% de óxido de itérbio, proporcionando adequada radiopacidade ao material.

Para o presente estudo foi acrescentado 30% do radiopacificador óxido de Itérbio, em percentual de massa, ao CSC (CSC/ Yb_2O_3). Essa porcentagem de 30% está em acordo com valores descritos no trabalho de Collares et al. [19] e próxima a quantidade de Bi_2O_3 encontrada no MTA [36]. Os resultados deste estudo mostraram que a associação do CSC/ Yb_2O_3 e o MTA apresentaram radiopacidade superior a 3 mm/Al, conforme recomenda a especificação 57 da ANSI/ADA [37].

A associação do CSC/ Yb_2O_3 não modificou a resistência mecânica do CSC ($p>0,05$), provavelmente por não causar alteração no mecanismo de hidratação do CSC. No entanto, a resistência à compressão desses materiais foi superior à do MTA nos dois períodos experimentais ($p<0,05$). Prentice et al. [18] utilizaram o Fluoreto de Itérbio (YbF_3) e observaram uma modificação positiva nas características do cimento de ionômero de vidro, aumentando sua superfície de dureza [18]. Todos os materiais apresentaram aumento dos valores de resistência à compressão no período de 24 horas para 21 dias. De acordo com o Islam et al. [10], isto ocorre devido a presa contínua dos materiais, o que resulta em maior estabilidade ao longo do tempo [10]. O MTA apresentou os menores valores para a resistência à compressão, causada talvez pela presença do radiopacificador Bi_2O_3 , que aumenta a porosidade do CP [33], diminuindo sua resistência á compressão.

Nesse estudo, o escoamento foi similar para os materiais quando analisados pelo diâmetro. Porém, a associação de CSC/ Yb_2O_3 apresentou o maior escoamento na análise por área ($p<0,05$). Estes resultados sugerem que a associação de Yb_2O_3 ao CSC pode promover maior facilidade para aplicação clínica.

O Potencial bioativo do MTA é, parcialmente atribuída à capacidade de mineralização de componentes do CP [24]. A hidratação do CP resulta na deposição de hidróxido de cálcio na

superfície do material, que por sua vez produz hidroxiapatita, na presença de fluidos contendo fosfato [27, 38]. No presente estudo, foram observadas estruturas que sugerem a presença de depósitos de fosfato de cálcio na superfície de todos os materiais. Estes resultados sugerem potencial biológico para o CSC e sua associação CSC/Yb₂O₃. A interação dos materiais reparadores com as células osteogênicas apresenta importância fundamental para os processos de reparo [39].

MTA, CSC e CSC/Yb₂O₃ não apresentaram efeito citotóxico em células da linhagem humana de osteoblastos Saos-2. Mestieri et al. [40] observaram em células da polpa dental humana (hDPC) que a associação de CP com óxido de nióbio Nb₂O₅ apresentou menor viabilidade celular no primeiro dia de exposição, que foi aumentando com o tempo [41]. Resultados semelhantes também foram encontrados por Cornélio-Gomes et al. [42] que avaliaram nas mesmas diluições e mesma linhagem celular o Biodentine (Septodont), MTA Plus (Avalon) e cimentos experimentais de silicato de cálcio (CSC) com resina associados com óxido nióbio (Nb₂O₅) como radiopacificadores [42].

Antonijevic et al. [20] avaliaram a biocompatibilidade de 3 cimentos bioativos endodônticos (MTA, Dentsply, Tulsa, OK), Bioaggregate (BA; Innovative Bioceramics, Vancouver, BC, Canadá), e Biodentine (BD; Septodont, St Maur des Fosses, França)), investigando o efeito de cimentos e associações na diferenciação de células mesenquimais e mostraram que o YbF₃ não alterou a integridade das células retiradas de ossos longos (fêmur e tíbia) de ratos [20].

Foi observada na diluição 1:8, maior viabilidade celular em relação ao grupo controle para o grupo CSC/Yb₂O₃. Assim, uma vez que não foi observada diferença estatística significativa entre os materiais MTA e CSC, a diluição 1:8 foi selecionada para os experimentos de bioatividade (Fig. 1B).

O ensaio NR complementou os resultados do ensaio de MTT, demonstrando que os extratos dos materiais MTA, CSC e CSC/Yb₂O₃ não apresentaram efeito citotóxico na mesma linhagem celular avaliada, exceto para a diluição 1:1, onde foi observada menor viabilidade celular em relação ao grupo controle. Foi observada na diluição de 1:8 maior viabilidade celular para o CSC/Yb₂O₃ em reação aos outros grupos.

ALP é uma das principais enzimas expressas durante a maturação precoce de osteoblastos e desempenha um papel importante na deposição mineral [43]. Após três dias de exposição aos extratos de cimentos, a atividade da ALP aumentou para as células Saos-2 especialmente para os grupos MTA e CSC, os quais mostraram diferença significativa comparados ao controle. No sétimo dia, todos os materiais foram semelhantes ao controle ($p > 0,05$). A capacidade do MTA para induzir a deposição de cálcio além de sua bioatividade e potencial para induzir a diferenciação osteogênica tem sido demonstrada [44, 45].

O vermelho de alizarina é um corante que identifica a deposição de cálcio em cultura de células. No presente estudo, todos os materiais e controle produziram nódulos mineralizados após 21 dias de cultura de células em meio osteogênico ($p < 0,05$) (Fig. 2D). A associação CSC/Yb₂O₃ apresentou a menor atividade de mineralização, mas superior ao grupo controle ($p < 0,05$).

Com base nos resultados, o Yb₂O₃ pode ser considerado um potencial agente radiopacificador para ser utilizado em associação com CSC, pois apresentou propriedades físico-químicas adequadas. Ainda, demonstra biocompatibilidade e bioatividade. Estudos adicionais devem ser realizados a respeito da análise química dos cimentos incluídos neste estudo.

Concluí-se que o Yb₂O₃ associado ao cimento de silicato de cálcio apresenta propriedades físico-químicas adequadas, é citocompatível e demonstra potencial bioativo, sugerindo seu uso como radiopacificador de materiais à base de silicato de cálcio.

Agradecimentos

Suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflito de interesse

Os autores afirmam explicitamente que não há conflitos de interesse em conexão com este artigo.

Referências

1. Kulan P, Karabiyik O, Kose GT, Kargul B (2016) Biocompatibility of Accelerated Mineral Trioxide Aggregate on Stem Cells Derived from Human Dental Pulp. *J Endod* 42:276-279.
2. Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, Son HH, Oh WM (2009) Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107:e96-102.
3. Juarez Broon N, Bramante CM, de Assis GF, Bortoluzzi EA, Bernardineli N, de Moraes IG, Garcia RB (2006) Healing of root perforations treated with Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and Portland cement. *J Appl Oral Sci* 14:305-311.
4. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N (2008) Mineral Trioxide Aggregate with or without Calcium Chloride in Pulpotomy. *J Endod* 34:172-175.
5. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU (2009) Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping

- with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. 2008. *Int Endod J* 42:422-444.
6. de Lima MV, Bramante CM, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N (2007) Endodontic treatment of dens in dente associated with a chronic periapical lesion using an apical plug of mineral trioxide aggregate. *Quintessence Int* 38:e124-128.
 7. Orosco FA, Bramante CM, Garcia RB, Bernardineli N, de Moraes IG (2010) Sealing ability, marginal adaptation and their correlation using three root-end filling materials as apical plugs. *J Appl Oral Sci* 18:127-134.
 8. Floratos SG, Tsatsoulis IN, Kontakiotis EG (2013) Apical barrier formation after incomplete orthograde MTA apical plug placement in teeth with open apex--report of two cases. *Braz Dent J* 24:163-166.
 9. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E (2001) Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J* 12:109-113.
 10. Islam I, Chng HK, Yap AU (2006) Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod* 32:193-197.
 11. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS (2003) Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95:483-489.
 12. 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.
 13. 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. *J Endod* 37:203-210.
 14. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimaraes BM, Duarte MA (2014) Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod* 40:1235-1240.
 15. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J (2015) Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investig* 19:2201-2209.
 16. Liu Y, Ai K, Liu J, Yuan Q, He Y, Lu L (2012) A high-performance ytterbium-based nanoparticulate contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:1437-1442.
 17. Xing H, Bu W, Ren Q, Zheng X, Li M, Zhang S, Qu H, Wang Z, Hua Y, Zhao K, Zhou L, Peng W, Shi J (2012) A NaYbF₄: Tm³⁺ nanoprobe for CT and NIR-to-NIR fluorescent bimodal imaging. *Biomaterials* 33:5384-5393.

18. Prentice LH, Tyas MJ, Burrow MF (2006) The effect of ytterbium fluoride and barium sulphate nanoparticles on the reactivity and strength of a glass-ionomer cement. *Dent Mater* 22:746-751.
19. Collares FM, Ogliari FA, Lima GS, Fontanella VR, Piva E, Samuel SM (2010) Ytterbium trifluoride as a radiopaque agent for dental cements. *Int Endod J* 43:792-797.
20. Antonijevic D, Jeschke A, Colovic B, Milovanovic P, Jevremovic D, Kisic D, vom Scheidt A, Hahn M, Amling M, Jokanovic V, Busse B, Djuric M (2015) Addition of a Fluoride-containing Radiopacifier Improves Micromechanical and Biological Characteristics of Modified Calcium Silicate Cements. *J Endod* 41:2050-2057.
21. Chen GJ, Wang ZG, Qiao X, Xu JY, Tian JL, Yan SP (2013) Synthesis, DNA binding, photo-induced DNA cleavage, cytotoxicity studies of a family of heavy rare earth complexes. *J Inorg Biochem* 127:39-45.
22. Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Razmi H, Sajadi S, Davies TE, Saghiri MA, Gorjestani H, Dummer PM (2012) Bioactivity of EndoSequence root repair material and bioaggregate. *Int Endod J* 45:1127-1134.
23. Han L, Okiji T, Okawa S (2010) Morphological and chemical analysis of different precipitates on mineral trioxide aggregate immersed in different fluids. *Dent Mater J* 29:512-517.
24. Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN (2007) Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod* 33:1347-1351.
25. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT (2009) Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod* 35:731-736.
26. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR (2007) Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *J Endod* 33:272-275.
27. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD (2006) Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod* 32:425-428.
28. 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.
29. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD (2007) Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod* 33:1110-1116.

30. Tanomaru-Filho M, Bier CA, Tanomaru JM, Barros DB (2007) Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and the TC system. *J Appl Oral Sci* 15:131-134.
31. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG (2012) A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 45:12-18.
32. Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimaraes FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2012) Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* 38:971-976.
33. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP (2007) Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* 33:295-298.
34. Tanomaru-Filho M, Bosso R, Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Radiopacity and flow of different endodontic sealers. *Acta Odontol Latinoam* 26:121-125.
35. British Standard Institution (2002) Dental root canal sealing materials. BS EN ISO 6876.
36. Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 36:16-27.
37. ANSI/ADA (2000) Specification no. 57: endodontic sealing materials. Chicago, IL: ANSI/ADA.
38. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M (2016) Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig* 20:83-90.
39. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, Tay FR (2014) In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod* 40:255-260.
40. Mestieri LB, Gomes-Cornelio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2015) Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci* 23:467-471.
41. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornelio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM (2014) Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci* 22:554-559.
42. Cornelio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2015) Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and experimental calcium silicate-based cements in human osteoblast-like cells. *Int Endod J*

43. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM (2014) Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod* 40:1217-1222.
44. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T (2008) The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod* 34:1057-1060.
45. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD (2011) Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod* 37:1691-1695.

Tabela 1 Materiais experimentais, procedência e proporções empregadas

Material	Fabricante
Cimento Silicato de cálcio (CSC)	CPB-40 estrutural Votoran, Votorantin cimentos, Camargo Correa Cimentos S.A., Pedro Leopoldo, MG, Brasil), Proporção: 1g pó: 330 µL água destilada
CSC + 30% Óxido de Itérbio* (CSC/Yb ₂ O ₃)	*Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil Proporção: 1g pó: 330 µL água destilada
MTA Angelus (MTA)	MTA, Angelus, Londrina, Brasil Proporção: 1g pó: 330 µL água destilada

Tabela 2 Valores médios e desvio-padrão dos testes de tempo de presa, solubilidade e resistência à compressão.

Testes	CSC	CSC / Yb₂O₃	MTA
Tempo de presa inicial (min)	25,60 ^a (±1,34)	25,60 ^a (±2,60)	25,00 ^a (±2,82)
Tempo de presa final (min)	93,40 ^a (±5,41)	97,20 ^a (±1,35)	209,0 ^b (±1,58)
Solubilidade	1,14 ^b (±1,11)	0,05 ^a (±0,06)	0,03 ^a (±0,05)
Resistência à compressão 24 horas (MPa)	47,96 ^a (±7,45)	39,46 ^a (±5,78)	16,13 ^b (±3,95)
Resistência à compressão 21 dias (MPa)	56,73 ^a (±19,83)	59,64 ^a (±14,60)	32,01 ^b (±7,76)

Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística significativa (p>0,05)

Tabela 3 - Valores médios e desvio-padrão dos testes de radiopacidade e escoamento.

Testes	CSC	CSC / Yb₂O₃	MTA
Radiopacidade (mm/Al)	1,60 ^b (±0,27)	5,02 ^a (±0,43)	5,34 ^a (±0,50)
Escoamento (mm)	6,53 ^a (±0,69)	6,11 ^a (±0,66)	6,87 ^a (±0,40)
Escoamento (mm ²)	31,47 ^b (±8,08)	40,40 ^a (±9,82)	30,98 ^b (±5,11)

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

Legenda das figuras

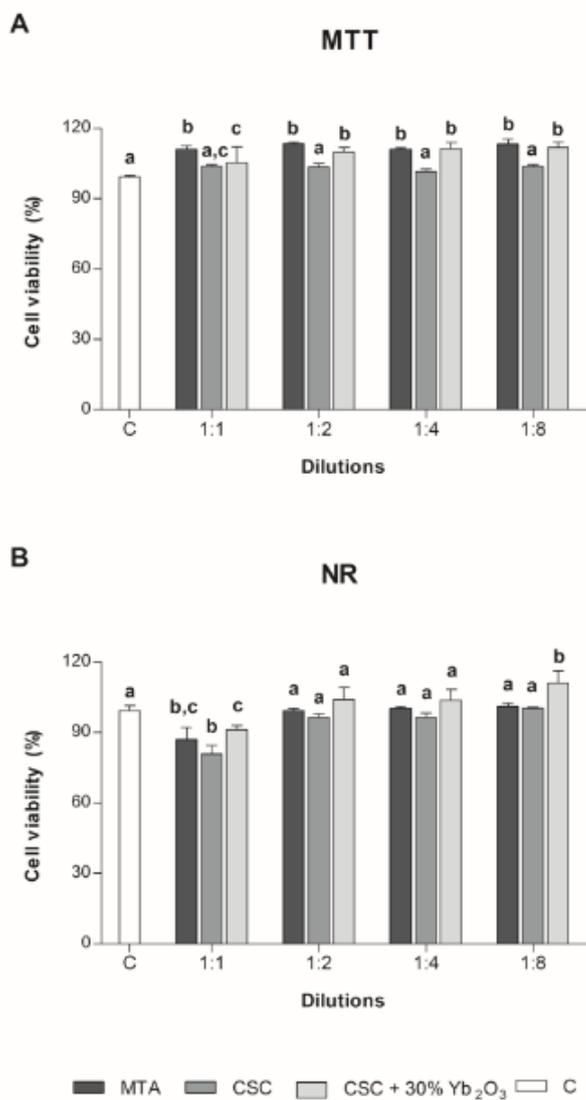


Fig. 1 Viabilidade das células osteoblásticas humanas (Saos-2) avaliada pelos ensaios de MTT (A) e NR (B) após 24 horas de exposição a diferentes diluições dos cimentos (1:1, 1:2; 1:4 e 1:8) CSC, CSC/Yb₂O₃ e MTA, ao meio de cultura sem SFB (controle). Barras com diferentes letras representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e grupo controle. ANOVA e Bonferroni ($p < 0.05$). CSC = cimento silicato de cálcio, CSC+30%Yb₂O₃ = CSC mais 30% de radiopacificador óxido de íterbio e MTA = Mineral Trióxido Agregado e C = controle.

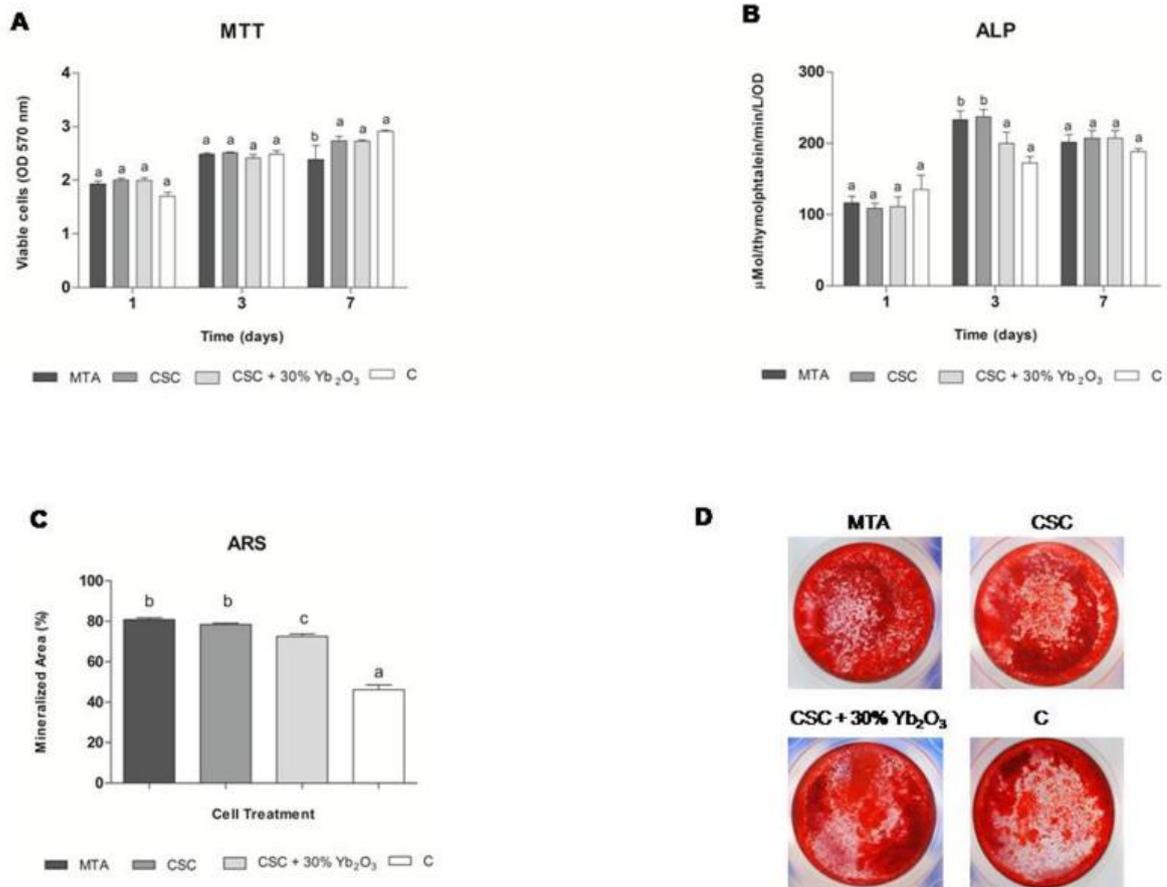


Fig. 2 (A) Viabilidade celular da linhagem celular Saos-2 e (B) Atividade da fosfatase alcalina (ALP) avaliadas após exposição aos extratos de cimentos CSC, CSC/Yb₂O₃ e MTA na diluição de 1:8, e meio de cultura (controle) nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Barras com diferentes letras representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e grupo controle. ANOVA e Bonferroni ($p < 0.05$). (C) Análise estatística da área mineralizada formada após exposição da linhagem Saos-2 aos extratos de cimentos CSC, CSC/Yb₂O₃ e MTA na diluição de 1:8, e meio de cultura osteogênico (controle). (D) Imagens da área mineralizada corada pelo vermelho de alisarina 2%. Barras com diferentes letras representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e controle. ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). CSC = cimento silicato de cálcio, CSC+30%Yb₂O₃ = CSC mais 30% de radiopacificador óxido de itérbio e MTA = Mineral Trióxido Agregado e C = controle.

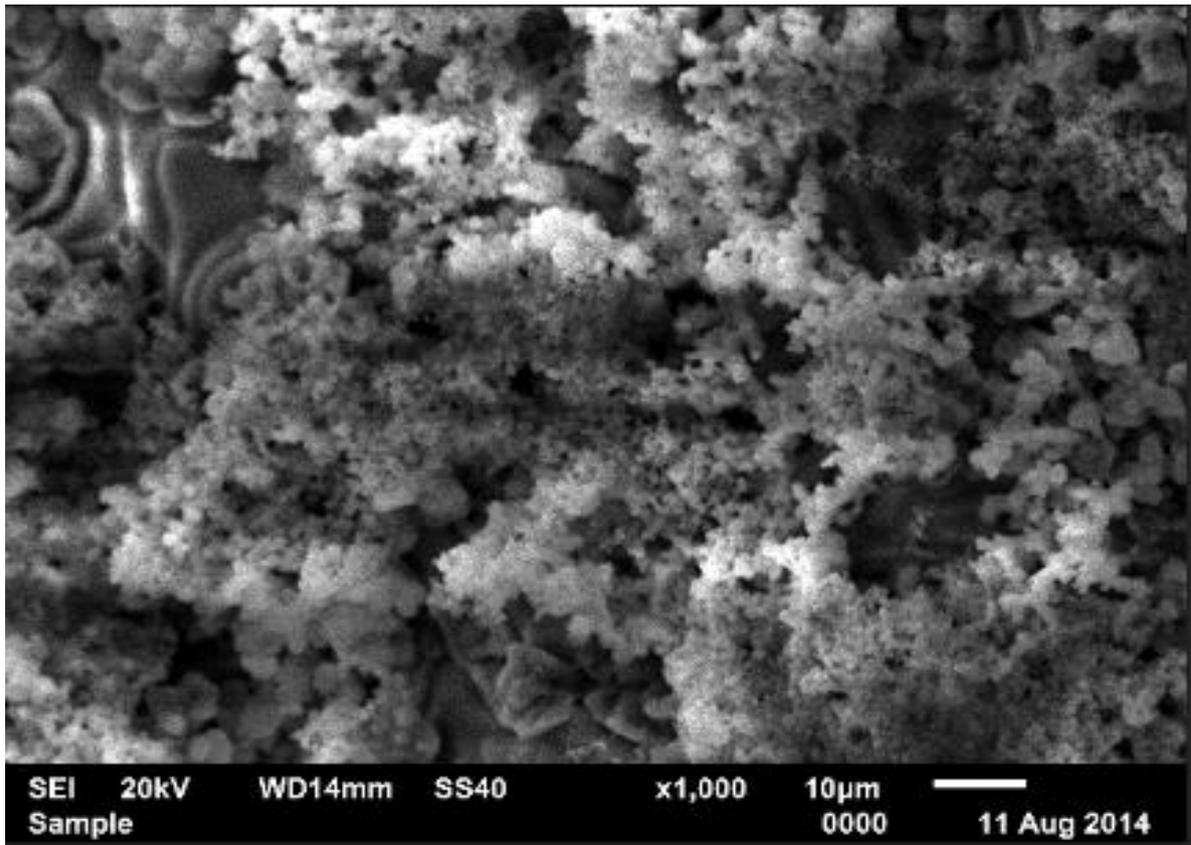


Fig 3 Estruturas esféricas, sugerindo a presença de depósitos de fosfato de cálcio.

4 PUBLICAÇÃO 2

Propriedades físico-químicas e potencial bioativo de cimentos à base de silicato tricálcico associado ao tungstato de cálcio e óxido de itérbio*

Resumo

Objetivo: Avaliar materiais à base de silicato tricálcico (STC) associado aos radiopacificadores tungstato de cálcio (CaWO_4) e o óxido de itérbio (Yb_2O_3) em comparação ao MTA (Angelus, Londrina, Brasil) e ao STC.

Materiais e métodos: A solubilidade foi analisada após imersão em água destilada. A radiopacidade foi avaliada por meio de radiografias dos materiais com escala de alumínio. O tempo de presa foi mensurado por agulhas de Gilmore e o pH por meio de peagômetro digital. O potencial bioativo foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura após imersão em PBS. A alteração volumétrica (em mm^3) foi avaliada por meio de Micro-CT (SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica) após 7 e 30 dias de imersão dos materiais em água destilada. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, com 5% de significância.

Resultados: A solubilidade foi similar entre os materiais ($p>0,05$). MTA e associações do STC apresentaram radiopacidade superior a 3 mm Al. MTA apresentou menor tempo de presa inicial ($p<0,05$) e STC+30% CaWO_4 menor tempo de presa final ($p<0,05$). Todos os materiais promoveram alcalinização do meio e apresentaram potencial bioativo.

* Artigo será submetido para publicação no periódico International Endodontic Journal e está formatado de acordo com as normas da revista

Quanto à análise da alteração volumétrica, os materiais apresentaram aumento de volume, com exceção do MTA após 7 dias e MTA e $\text{STC}+30\% \text{Yb}_2\text{O}_3$ após 30 dias

Conclusão: O cimento de silicato tricálcico associado aos radiopacificadores CaWO_4 e Yb_2O_3 apresentam potencial bioativo, boa radiopacidade, solubilidade, capacidade de alcalinização do meio e baixa alteração dimensional, apresentando potencial uso clínico como radiopacificador quando associado ao STC.

Palavras Chaves: *Silicato Tricálcico, Micro-CT, Propriedades Físico-químicas*

Introdução

Mineral trióxido agregado (MTA) é um material reparador composto por silicato tricálcico (53,1%), silicato dicálcico (22,5%) e óxido de bismuto Bi_2O_3 (21,6%) (Camilleri 2007; Gandolfi et al., 2010). Cimentos à base de silicato tricálcico são desenvolvidos como materiais alternativos ao MTA (Camilleri et al. 2013; Grech et al. 2013) uma vez que, o silicato tricálcico é responsável pela bioatividade do material (Camilleri et al. 2013).

Cimentos à base de silicato tricálcico são descritos como materiais bioativos, capazes de promover formação de cristais de hidróxiapatita (Han & Okiji 2013). Tay et al. 2007 e Reyes-Carmona et al. 2009 observaram a formação de cristais de apatita após contato do MTA com soluções fosfatadas (Martin et al., 2007; Reyes-Carmona et al. 2009).

O radiopacificador Bi_2O_3 presente no MTA reduz a liberação de hidróxido de cálcio, aumenta a solubilidade e causa deterioração na sua estabilidade dimensional (Camilleri et al. 2011). Além disso, este radiopacificador tem sido responsável pela descoloração dental por interagir tanto com o colágeno dos tecidos (Marciano et al. 2014) como com o hipoclorito de sódio (Camilleri 2014). Cimentos de silicato tricálcico com óxido de zircônio (ZrO_2) como agente radiopacificador demonstra potencial bioativo (Grech et al. 2013, Camilleri, 2014) e radiopacidade superior a 3 mm de alumínio (Camilleri et al. 2013).

O óxido de Itérbio (YbF_3) é um radiopacificador com alto poder de contraste e baixa toxicidade (Antonijevic et al. 2014). O Itérbio (Yb) tem

sido usado como contraste em exames de tomografia computadorizada devido a sua biocompatibilidade (Liu et al. 2012).

Tungstato de cálcio (CaWO_4) têm sido empregado como radiopacificador de cimentos reparadores como o cimento MTA-Caps (Acteon, Merignac, France) e MTA HP (Angelus, Londrina, Brasil) (Setbon et al. 2014; Silva et al. 2016). O radiopacificador CaWO_4 associado a um cimento de silicato de cálcio apresenta propriedades físico-químicos semelhantes ao MTA Angelus (Bosso-Martelo et al. 2016) e potencial bioativo (Bosso-Martelo et al. 2015).

Métodos alternativos como o Micro-CT são usados para análise físico-química de cimentos de silicato de cálcio (Cavenago *et al.* 2014 e Gandolfi et al. 2013). Cavenago *et al.* (2014) propuseram o uso da microtomografia computadorizada (Micro-CT) para quantificar a alteração volumétrica do MTA em obturações retrógradas (Cavenago et al. 2014). Gandolfi *et al.* 2013 analisaram propriedades físico-químicas de cimentos endodônticos empregando Micro-CT.

O objetivo deste estudo foi avaliar o pH, tempo de presa, radiopacidade, solubilidade, potencial bioativo com análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), e a alteração volumétrica por Micro-CT do silicato tricálcico quando associado ao radiopacificadores tungstato de cálcio e o óxido de itérbio. A hipótese nula é a de que o acréscimo dos radiopacificadores não altera as propriedades do cimento de silicato tricálcico.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Os materiais disponíveis no mercado e os cimentos experimentais avaliados nesse estudo foram espatulados conforme descrito na Tabela 1.

Métodos

Solubilidade

Moldes circulares foram confeccionados segundo Carvalho-Júnior et al. (Carvalho-Junior et al. 2007) com 1,5 mm de espessura e 7,75 mm de diâmetro interno (n=6). Um fio de nylon foi incluído na massa dos cimentos. O conjunto foi armazenado em estufa com temperatura de 37°C por período superior a 3 vezes o seu tempo de presa (15 horas). Os corpos de prova foram removidos dos moldes, pesados em balança de precisão HM-200 (A & D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA) até estabilização da massa (massa inicial) e suspensos por meio da fixação 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 para assim serem pesados novamente até estabilização da massa, obtendo-se a massa final. A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa original. As pesagens foram repetidas três vezes para cada amostra.

Radiopacidade

A radiopacidade foi avaliada segundo as normas ISO 6876:2002. Anéis de teflon com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura foram utilizados para confecção de corpos de prova de cada material. Os materiais foram mantidos a 37 ° C e umidade 100% durante 48 h. Após este período, foram colocados sobre um filme oclusal (insight-Kodak Comp, Rochester, NY, EUA), ao lado de um escala de alumínio com uma espessura variando de 2 a 16 mm. As radiografias foram realizadas em aparelho de raios-X GE 1000 (General Electric, Milwaukee, WI, EUA), programado com 50 kV, 10 mA, 18 pulsos por segundo a uma distância foco filme de 33 cm. Os filmes foram

processados em um revelador automático (A/T 2000®XR, Ar Techniques Inc., Hicksville, NY, EUA). Depois da digitalização da radiografia, a equivalência de alumínio para cada amostra foi determinada em milímetros, usando o UTHSCSA software ImageTool para Windows versão 3.0.

Tempo de presa

O tempo de presa foi avaliado empregando corpos de prova de 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. Uma agulha Gilmore ter $100 \pm 0,5$ g e uma ponta diâmetro de $2 \pm 0,1$ milímetros foi utilizada para determinar o tempo de presa inicial, conforme estabelecido pela ISO 6876: 2002 e foi usada uma agulha Gilmore de $456 \pm 0,5$ g com um diâmetro da ponta de $1 \pm 0,1$ milímetros para determinar o tempo de presa final, tal como estabelecido pela norma ASTM C-266-03. Os materiais foram mantidos numa estufa a 37°C e 95% de humidade durante o período de análise. O tempo de presa dos cimentos foi estabelecido calculando o tempo médio desde a espatulação dos materiais, até não mais ocorrer alteração da superfície do material pela agulha Gillmore.

pH

Para análise de pH, tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material ($n=10$). Cada tubo foi imerso em 10 ml de água destilada e mantido na estufa durante o período experimental, sendo que a cada período, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco com 10 ml de água destilada. As mensurações de pH foram realizadas após 3, 12, 24 horas, 7, 14 e 21 dias de imersão dos discos com o peagômetro Digimed (Digimed, Brasil) previamente calibrado. Após cada mensuração em triplicata, a média do pH de cada grupo em cada período experimental foi calculada. Os dados obtidos foram submetidos aos

testes ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5% ou por teste indicado segundo os dados obtidos.

Potencial bioativo

Os materiais foram manipulados e adaptados em moldes com 1 mm de altura X 7,5 mm de diâmetro, permanecendo em estufa a 100% de umidade e 37° C. Após um período de três vezes o tempo de presa final, cerca de 6 horas, as amostras ficaram completamente imersas numa solução de PBS (para 500ml de água destilada; NaCl anidro - 90g, Na₂HPO₄ – 13,65g, Na₂H₂PO₂H₂O – 2,42g). Os corpos de prova permaneceram imersos no PBS a 37°C durante 28 dias. Após esse período, foi colocada sílica gel e soda lima em um recipiente mantido na estufa por 12 horas para remoção do excesso de umidade dos materiais. Posteriormente, as amostras foram revestidas de carbono e a avaliação microestrutural da superfície dos cimentos foi realizada por meio da visualização em microscópio eletrônico de varredura MEV (JEDL, JSM-6610LV Scanning Electron Microscope, USA) no modo de elétrons secundários.

Alteração volumétrica

Cavidades medindo 1 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade foram confeccionadas em modelos de resina de poliéster (Maxi Rubber, Industria química LTDA, Diadema, São Paulo, Brasil) a partir de uma matriz metálica. As cavidades foram preenchidas com cada um dos materiais experimentais logo após sua manipulação e mantidas em estufa por 24 horas a 37°C e 95% de umidade e escaneadas posteriormente. Após esse primeiro de escaneamento, os moldes de resina com as cavidades preenchidas com os materiais permaneceram imersas em água destilada pelos períodos de 7 e 30 dias em estufa a 37°C. O segundo escaneamento foi realizado no período de 7 dias. Após 30 dias do espatulamento, foi realizado o terceiro escaneamento, ambos, utilizando

o microtomógrafo 1176 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Os parâmetros de escaneamento foram: voltagem de 50 kv, corrente de 500 μ A, 18 μ m de tamanho de voxel, filtro de alumínio com 0,5 mm de espessura e rotação de 360°.

A reconstrução das imagens foi realizada no programa *NRecon* (V1.6.9,8; Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica). Foi feita a sobreposição das amostras equivalentes (mesmo material), porém em períodos diferentes através do programa *Dataviewer* (V1.5.1.2; Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica) e a análise das imagens reconstruídas em 3D, foi realizada, utilizando o programa *CTAn* (V1.14.4.1; Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica).

A alteração sofrida pela material foi analisada pelo aumento ou diminuição de volume nos períodos de 7 e 30 dias, comparado ao escaneamento inicial, por meio de sobreposição de imagem, realizada pelo programa *Dataviewer* (V1.5.1.2; Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica). O formato da região de interesse selecionada foi circular (Round). A parte inferior (Botton) e superior (Top) do ROI foi estabelecida a partir do ponto de maior nitidez da imagem. Deste modo, avaliou-se uma extensão completa da cavidade preenchida pelo material com 3 milímetros. O cálculo para avaliar o percentual de alteração volumétrica foi realizado pela diferença em volume do valor de 7 e 30 dias subtraído do valor inicial.

Resultados

Solubilidade

Para o teste de solubilidade, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$), conforme Tabela 2.

Radiopacidade

STC+ 30% CaWO_4 , STC+30% Yb_2O_3 e MTA apresentaram valores de radiopacidade superiores ao STC puro ($p < 0,05$), conforme Tabela 2.

Tempo de presa

A adição do Yb_2O_3 ao STC diminuiu o tempo de presa inicial do STC puro ($p < 0,05$). STC+30% Yb_2O_3 , STC+ 30% CaWO_4 apresentaram menor tempo de presa final que o STC puro ($p < 0,05$), conforme Tabela 2.

pH

De acordo com a tabela 3, todos os materiais promoveram alcalinização do meio nos diferentes períodos de análise.

Potencial bioativo

A microscopia eletrônica de varredura mostrou depósitos de fosfato de cálcio na superfície de todos os materiais. O EDS mostrou altos picos de Ca e P, comprovando o potencial bioativo dos materiais após 28 dias de imersão em PBS, conforme Figura 1.

Alteração volumétrica

Os cimentos apresentaram aumento de volume, com exceção do MTA no período de 7 dias e MTA e STC+30% Yb_2O_3 no período de 30 dias, conforme Tabela 2.

Discussão

A solubilidade de um material retrobturador pode favorecer a infiltração bacteriana, comprometendo o sucesso do tratamento. (Wu et al. 1995). Modificações nas normas ISO 6876 (Fridland & Rosado 2005) e ANSI/ADA nº57 foram propostas (Carvalho-Junior et al. 2007) para a avaliação da solubilidade. O presente estudo utilizou espécimes de 7,75 mm de diâmetro após imersão em água destilada por 7 dias. Todos os materiais estão em acordo com as normas (ANSI/ADA), apresentando perda de massa menor que 3%. A baixa solubilidade observada para os materiais avaliados difere dos achados de Gandolfi et al. 2014 que encontraram alto valor de solubilidade para os cimentos de silicato tricálcico MTA Plus (Prevest Denpro Limited, Jammu, India, for Avalon Biomed Inc) e ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Specialties, Tulsa, OK). No entanto, nesse estudo, os cimentos foram imersos após um período de três vezes o tempo de presa, enquanto que Gandolfi et al. 2014 avaliaram as amostras após 70% do período de presa dos cimentos, o que pode justificar a diferença dos resultados. Os cimentos avaliados no presente estudo apresentaram solubilidade semelhante e o STC apresentou aumento de massa. Marciano et al. 2016 observaram que cimentos à base de silicato de cálcio associados ao CaWO_4 ou OZr_2 apresentam hidratação adequada e aumento de massa.

No presente estudo, STC+30% CaWO_4 , STC+30% Yb_2O_3 e MTA apresentaram valores de radiopacidade superiores a 3 mm de alumínio, conforme estabelecido pela ISO 6876/2002. Radiopacidade superior a 3 mm de alumínio foi observada para a associação de 30% de CaWO_4 a um

cimento à base de silicato de cálcio (Bosso-Martelo et al. 2016) e 30% de YbF_3 ao cimento Portland (Antonijevic et al. 2014). Cimento experimental com 30% de YbF_3 apresentou radiopacidade satisfatória (Collares et al. 2010).

O radiopacificador Yb_2O_3 reduziu o tempo de presa inicial e final do STC, e o radiopacificador CaWO_4 diminuiu significativamente o tempo de presa final do STC. Estes resultados sugerem que o Yb_2O_3 e CaWO_4 participam do mecanismo de hidratação do TSC, de forma mais instensa que o óxido de bismuto, presente no MTA, que não contribui com o processo de reação de hidratação do material (Camilleri 2007). A adição do CaWO_4 ao cimento Portland resultou no aumento significativo da resistência à compressão desse cimento (Tanomaru-Filho et al. 2012), além de reduzir seu tempo de presa (Bosso-Martelo et al. 2016). Enquanto que a adição do YbF_3 ao cimento Portland não alterou significativamente seu tempo de presa e sua resistência à compressão (Antonijevic et al. 2014).

O pH alcalino dos cimentos pode favorecer a atividade biológica de indução de mineralização (Danesh et al. 2006). Além disso, a liberação de íons hidroxila propicia um ambiente desfavorável para a proliferação e sobrevivência bacteriana (Gandolfi et al. 2012). Todos os materiais avaliados no presente estudo foram capazes de alcalinizar o meio. Valores de pH alcalino foram encontrados quando 20% de CaWO_4 , 30% de CaWO_4 e 30% YbF_3 foi adicionado a cimentos à base de silicato de cálcio (Húngaro Duarte et al. 2012, Bosso-Martelo et al. 2016. e Antonijevic et al. 2015).

Os cimentos à base de CSC e STC são descritos como materiais bioativos, estáveis e capazes de promover formação de cristais de hidróxiapatita (Han et al. 2010). A análise da estrutura e composição química desses materiais mostrou a formação de carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio quando imerso em água destilada e a formação de fosfato de cálcio quando imerso em PBS (Shokouhinejad et al. 2012). O MTA em contato com soluções fosfatadas promove a formação de cristais de apatita. Os resultados do presente estudo demonstram por microscopia eletrônica de varredura depósitos de fosfato de cálcio na superfície de todos os materiais. O EDS mostrou altos picos de Ca e P, comprovando o potencial bioativo dos materiais após 28 dias de imersão em PBS.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que os radiopacificadores não prejudicaram a capacidade de formação de depósitos de apatita na superfície do cimento, ou seja, não prejudicam seu potencial bioativo. A bioatividade avaliada por meio da medição da produção do hidróxido de cálcio e formação de fosfato de cálcio, quando em contato com fluidos corporais simulados demonstra que cimentos de silicato tricálcico são mais bioativos que o cimento Portland (Formosa et al. 2012).

A hidratação do silicato tricálcico resulta na formação de silicato de cálcio hidratado e hidróxido de cálcio, que na presença de fluidos fisiológicos, reagem e produzem principalmente hidroxiapatita (Camilleri 2011). As características de hidratação e o potencial bioativo do STC com 20% de ZrO_2 demonstra formação de hidroxiapatita na superfície do material, sem interferência do radiopacificador ZrO_2 na hidratação do STC (Camilleri et al. 2013).

A avaliação da solubilidade, de acordo com a alteração volumétrica analisada por meio de Micro-CT foi proposta por Cavenago et al. 2014. Desta forma, a microtomografia (Micro-CT)

computadorizada permitiu a análise da alteração volumétrica apresentada pelo material após imersão em água destilada. Exceto o MTA, todos os cimentos de STC apresentaram aumento de volume no período de análise de 7 dias. Não foi observada correlação direta da alteração volumétrica com solubilidade, uma vez que nesse período houve aumento na massa apenas para o STC puro, enquanto que para os demais materiais, uma pequena porcentagem de redução de massa foi identificada. No presente estudo, menor porção de cimento fica em contato com a água na metodologia de alteração volumétrica, simulando condição clínica, diferente do que ocorre no teste de solubilidade.

No período de 30 dias, os materiais STC+30% CaWO_4 e STC puro apresentaram aumento de volume. Nos dois períodos de análise, o cimento MTA apresentou redução de volume. O radiopacificador Bi_2O_3 presente no MTA reduz a liberação de hidróxido de cálcio, aumenta a solubilidade e causa deterioração na sua estabilidade dimensional (Camilleri et al. 2011), podendo contribuir com a diminuição de volume do MTA, uma vez que este material apresenta Bi_2O_3 em sua composição.

O cimento de silicato tricálcico associado aos radiopacificadores CaWO_4 e Yb_2O_3 apresentam potencial bioativo, boa radiopacidade, solubilidade adequada, capacidade de alcalinização do meio e baixa alteração dimensional, apresentando potencial uso clínico como radiopacificador quando associado ao STC.

Agradecimentos

Suporte financeiro do Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq).

Conflito de interesses

Os autores afirmam explicitamente que não há conflitos de interesse em conexão com este artigo.

Referências

1. ANSI/ADA (2000) Specification no. 57: endodontic sealing materials. Chicago, IL: ANSI/ADA.
2. Antonijevic D, Jeschke A, Colovic B *et al.* (2015) Addition of a Fluoride-containing Radiopacifier Improves Micromechanical and Biological Characteristics of Modified Calcium Silicate Cements. *J Endod* **41**(12), 2050-2057.
3. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L (2014) The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig* **18**(6), 1597-1604.
4. ASTM International C266–07 (2007) Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gillmore needles.
5. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M (2016) Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig* **20**(1), 83-90.
6. British Standard Institution (2002) Dental root canal sealing materials. BS EN ISO 6876
7. Camilleri J (2007) Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate *Int Endod J* **40**(6), 462-70

8. 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**(3), 231-240.
9. Camilleri J (2014) Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod* **40**(12), 2030-2035.
10. 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**(8), 845-854.
11. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D (2013) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* **29**(5), 580-593.
12. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD (2007) Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod* **33**(9), 1110-1116.
13. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA *et al.* (2014) Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* **47**(2), 120-126.
14. Collares FM, Ogliari FA, Lima GS, Fontanella VR, Piva E, Samuel SM (2010) Ytterbium trifluoride as a radiopaque agent for dental cements. *Int Endod J* **43**(9), 792-797.
15. 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**(3), 213-219.
16. Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J (2012) The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions *Dent Mater* **28** (5), 584-95.
 17. Fridland M, Rosado R (2005) MTA solubility: a long term study. *J Endod* **31**(5), 376-379.
 18. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, Prati C, Dummer PM (2013) 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Therafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J* **46**(3), 253-263.
 19. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C (2012) Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J* **45**(6), 571-579.
 20. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C (2014) Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate *J Endod* **40**(10), 1632-7.
 21. Gandolfi MG, Taddei P, Modena E, Siboni F, Prati C (2013) Biointeractivity-related versus chemi/physisorption-related apatite precursor-forming ability of current root end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **101**(7), 1107-1123.
 22. 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**(6), 659-668.

23. Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013) Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater* **29**(2), e20-28.
24. Han L, Okiji T (2013) Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* **46**(9), 808-814.
25. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT et al. (2012) Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate *J Endod* **38**(3), 394-7.
26. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimaraes BM, Duarte MA (2014) Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod* **40**(8), 1235-1240.
27. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J (2016) Calcium silicate-based sealers: Assessment of physicochemical properties, porosity and hydration *Dent Mater* **32**, e30-40.
28. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW *et al.* (2007) Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *J Endod* **33**(3), 272-275.
29. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT (2009) Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod* **35**(5), 731-736.

30. Setbon HM, Devaux J, Iserentant A, Leloup G, Leprince JG (2014) Influence of composition on setting kinetics of new injectable and/or fast setting tricalcium silicate cements. *Dent Mater* 30:1291-1303.
31. Silva EJ, Carvalho NK, Zanon M, Senna PM, G DE-D, Zuolo ML, Zaia AA (2016) Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz Oral Res* 30:
32. Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Razmi H, Sajadi S, Davies TE, Saghiri MA, Gorjestani H, Dummer PM (2012) Bioactivity of EndoSequence root repair material and bioaggregate. *Int Endod J* 45:1127-1134.
33. Tanomaru-Filho M, Bier CA, Tanomaru JM, Barros DB (2007) Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and the TC system. *J Appl Oral Sci* **15**(2), 131-134.
34. Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF et al. (2012) Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents *ISRN Dent* **2012**, 898051.
35. Wu MK, Wesselink PR, Boersma J (1995) A 1-year follow-up study on leakage of four root canal sealers at different thicknesses *Int Endod J* **28** (4), 185-9.
36. Xuereb M, Sorrentino F, Damidot D, Camilleri J.(2016) Development of novel tricalcium silicate-based endodontic cements with sintered radiopacifier phase *Clin Oral Investig* **20**, 967-82.

Tabelas

Tabela 1- Grupos experimentais

Grupo	Material e proporção	Fabricante
1	MTA Branco Proporção: segundo fabricante	MTA, Angelus, Londrina, Brasil
2	Silicato tricálcico* + 30% Óxido de Itérbio (Yb ₂ O ₃)** Proporção: 1 g: 0,39 mL	*Mineral Research Processing, Meyzieu, França **Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil
3	Silicato tricálcico* + 30% Tungstato de cálcio (CaWO ₄)** Proporção: 1 g: 0,34 mL	*Mineral Research Processing, Meyzieu, França **Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil
4	Silicato tricálcico Proporção: 1g:0,36mL	Mineral Research Processing, Meyzieu, França

Tabela 2: Médias e desvio padrão referentes aos testes de tempo de presa (TP) inicial e final, Alteração volumétrica (Alt vol), radiopacidade (RAD) e solubilidade (SOL).

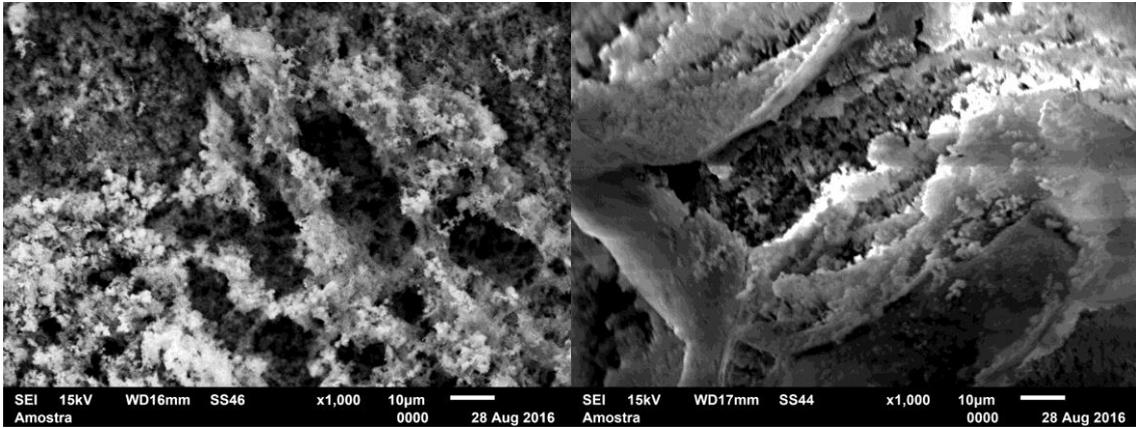
Testes	STC+ 30% CaWO ₄	STC+30% Yb ₂ O ₃	STC puro	MTA
TP inicial (min)	19,00 ^{ab} (1,09)	16,33 ^a (1,50)	23,00 ^b (0,0)	21,65 ^{ab} (6,89)
TP final (min)	128,8 ^a (0,98)	147,0 ^b (5,47)	277,0 ^d (0,0)	209,2 ^c (1,47)
Alt vol 7dias (mm ³)	0,5900 ^{ab} (0,49)	1,718 ^a (1,71)	2,382 ^a (0,85)	-0,486 ^b (1,02)
Alte vol 30dias (mm ³)	0,1533 ^{ab} (0,4626)	-0,8917 ^b (1,90)	1,975 ^a (0,66)	-0,510 ^b (1,66)
RAD (mm/Al)	4,732 ^b (0,32)	4,638 ^b (0,18)	1,7 ^d (0,06)	5,7 ^a (0,5)
SOL (%)	0,1343 ^a (0,21)	0,1349 ^a (0,78)	-0,05 ^a (1,95)	0,03 ^a (0,07)

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (p < 0,05).

Tabela 3: Média e desvio padrão referentes ao teste de pH.

Período	STC+ 30% CaWO ₄	STC+30% Yb ₂ O ₃	STC puro	MTA	Controle
3 h	8,689 ^b (0,353)	8,437 ^b (0,322)	9,441 ^a (0,449)	9,028 ^{ab} (0,674)	6,398 ^c (0,399)
12h	8,582 ^b (0,135)	8,723 ^{ab} (0,250)	8,635 ^b (0,565)	9,204 ^a (0,280)	6,469 ^c (0,222)
24h	7,599 ^{bc} (0,034)	7,932 ^a (0,354)	7,919 ^{ab} (0,330)	7,491 ^c (0,235)	6,360 ^d (0,233)
7d	8,081 ^c (0,141)	8,436 ^b (0,075)	10,96 ^a (0,087)	8,492 ^b (0,365)	6,471 ^d (0,225)
14d	8,182 ^b (0,147)	8,293 ^b (0,137)	9,111 ^a (0,161)	9,321 ^a (0,537)	6,439 ^c (0,251)
21d	8,366 ^a (0,081)	8,245 ^{ab} (0,122)	8,598 ^a (0,728)	7,725 ^b (0,237)	6,629 ^c (0,304)

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (p < 0,05)

Figuras**Figura 1:**

Estruturas esféricas, sugerindo a presença de depósitos de fosfato de cálcio na associação STC+30% Yb_2O_3 .

5 DISCUSSÃO

O MTA apresenta propriedade biológica adequada, contudo observa-se dificuldade de manipulação do material em função da consistência e escoamento (Vivan et al.⁴³, 2010). Associações alternativas têm sido analisadas, buscando um material à base de silicato de cálcio que mantenha as mesmas propriedades físico-químicas e biológicas (Formosa et al.¹⁶, 2012).

Novas propostas de radiopacificadores associados a materiais à base de silicato de cálcio têm sido discutidas. Os prejuízos causados ao MTA, pelo uso do Bi_2O_3 são relatados na literatura (Camilleri et al.⁶, 2011; Coomaraswamy et al.¹¹, 2007). Deste modo, o uso de radiopacificadores alternativos ao Bi_2O_3 foi uma proposta deste estudo.

O Yb_2O_3 e CaWO_4 apresentam bons resultados quando associados a CSC (Antonijevic et al.², 2014; Bosso-Martelo et al.⁴, 2016). 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.⁸, 2013), além disso, apresentam pH alcalino e liberam íons cálcio (Grech et al.²⁰, 2013). A associação do CP ao Zr_2O demonstra radiopacidade, resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade similares ao ProRoot MTA (Cutajar et al.¹², 2011). Ainda, a hidratação do CP acrescido de 30% de Zr_2O resulta em aumento do pH, liberação de íons cálcio e apresenta bioatividade (Camilleriet al.⁷, 2011).

O Yb_2O_3 tem sido usado como contraste em exames de tomografia computadorizada devido a sua biocompatibilidade quando comparado à Prata (Au), Bismuto (Bi) e Platina (Pt) (Liu et al.³¹, 2012). Além disso, Um material à base de silicato de cálcio (CSC) associado ao trifluoreto de itérbio (YbF_3) demonstrou radiopacidade adequada e aumentou a resistência à compressão do material (Antonijevic et al.², 2014). No presente estudo o Yb_2O_3 associado ao cimento de silicato de cálcio apresentou propriedades físico-

químicas adequadas, citocompatibilidade e potencial bioativo, sugerindo seu uso como radiopacificador de materiais à base de silicato de cálcio

O uso do radiopacificador CaWO_4 associado ao CP tem sido estudado vem sendo estudado como agente radiopacificador associado ao CP (Hungaro Duarte et al.²⁵, 2009). Sua análise se justifica, pois estudos mostram que este radiopacificador apresenta adequada biocompatibilidade (Gomes Cornelio et al.¹⁹, 2011). A análise geral dos resultados obtidas no presente trabalho demonstrou que, quando associado ao cimento de silicato tricálcio, os radiopacificadores Yb_2O_3 e CaWO_4 , apresentam radiopacidade, solubilidade adequada, capacidade de alcalinização, baixa alteração dimensional e potencial bioativo.

Em relação ao potencial bioativo, formação de uma camada de apatita representa ambiente ideal para a diferenciação de células e colonização de osteoblastos induzindo uma nova formação óssea. A apatita em conjunto com a liberação de ions Ca pode muito bem explicar os excelentes resultados clínicos do TSC, como o MTA (Gandolfi et al.¹⁸ 2014).

Além disso, a capacidade de formação de apatita pode proporcionar vantagens clínicas, melhorando o selamento com o passar do tempo, graças à deposição de fosfatos de cálcio na interface e no interior dos túbulos dentinários do canal radicular quando cimentos à base de MTA são usados como materiais de obturação de canais em associação com guta-percha. (Gandolfi et al.¹⁸ 2014).

As metodologias propostas neste estudo são modelos in vitro, que foram reproduzidas para avaliar as propriedades físicas, mecânicas e biológicas dos cimentos. Estudos adicionais in vivo devem ser conduzidos, buscando o desenvolvimento de biomateriais reparadores com propriedades físico-químicas e biológicas ideais.

6 CONCLUSÃO

O Yb_2O_3 associado ao cimento de silicato de cálcio apresenta propriedades físico-químicas adequadas, é citocompatível e demonstra potencial bioativo, sugerindo seu uso como radiopacificador de materiais à base de silicato de cálcio.

Os TSC associados aos radiopacificadores tungstato de cálcio e óxido de itérbio apresentam radiopacidade, solubilidade e escoamento adequados, capacidade de alcalinização e estabilidade volumétrica.

REFERÊNCIAS*

1. ANSI/ADA Specification no. 57: endodontic sealing materials. Chicago, IL: ANSI/ADA; 2000.
2. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L. The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(6): 1597-604.
3. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MA. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108(4): 628-32.
4. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(1): 83-90.
5. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod*. 2006; 32(5): 425-8.
6. Camilleri J. Evaluation of the effect of intrinsic material properties and ambient conditions on the dimensional stability of white mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod*. 2011; 37(2): 239-45.
7. Camilleri J, Cutajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater*. 2011; 27(8): 845-54.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.

8. 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.
9. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2014; 47(2): 120-6.
10. Collares FM, Ogliari FA, Lima GS, Fontanella VR, Piva E, Samuel SM. Ytterbium trifluoride as a radiopaque agent for dental cements. *Int Endod J.* 2010; 43(9): 792-7.
11. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod.* 2007; 33(3): 295-8.
12. 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.
13. De-Deus G. Research that matters - root canal filling and leakage studies. *Int Endod J.* 2012; 45(12): 1063-4.
14. de Lima MV, Bramante CM, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N. Endodontic treatment of dens in dente associated with a chronic periapical lesion using an apical plug of mineral trioxide aggregate. *Quintessence Int.* 2007; 38(2): e124-8.
15. Floratos SG, Tsatsoulis IN, Kontakiotis EG. Apical barrier formation after incomplete orthograde MTA apical plug placement in teeth with open apex--report of two cases. *Braz Dent J.* 2013; 24(2): 163-6.

16. Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J. The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dent Mater.* 2012; 28(5): 584-95.
17. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod.* 2014; 40(10): 1632-7.
18. 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.
19. 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.
20. 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. *Int Endod J.* 2013; 46(7): 632-41.
21. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013; 29(2): e20-8.
22. Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Evaluation of root canal obturation: a three-dimensional in vitro study. *J Endod.* 2009; 35(4): 541-4.
23. Han L, Okiji T, Okawa S. Morphological and chemical analysis of different precipitates on mineral trioxide aggregate immersed in different fluids. *Dent Mater J.* 2010; 29(5): 512-7.
24. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J.* 2001; 12(2): 109-13.

25. Hungaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35(5): 737-40.
26. 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.
27. Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(3): e96-102.
28. 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.
29. Juarez Broon N, Bramante CM, de Assis GF, Bortoluzzi EA, Bernardineli N, de Moraes IG et al. Healing of root perforations treated with Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and Portland cement. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(5): 305-11.
30. Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(1): e54-7.
31. Liu Y, Ai K, Liu J, Yuan Q, He Y, Lu L. A high-performance ytterbium-based nanoparticulate contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012; 51(6): 1437-42.
32. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M et al. Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *J Endod.* 2007; 33(3): 272-5.

33. Metzger Z, Zary R, Cohen R, Teperovich E, Paque F. The quality of root canal preparation and root canal obturation in canals treated with rotary versus self-adjusting files: a three-dimensional micro-computed tomographic study. *J Endod.* 2010; 36(9): 1569-73.
34. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. 2008. *Int Endod J.* 2009; 42(5): 422-44.
35. Orosco FA, Bramante CM, Garcia RB, Bernardineli N, de Moraes IG. Sealing ability, marginal adaptation and their correlation using three root-end filling materials as apical plugs. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(2): 127-34.
36. Prentice LH, Tyas MJ, Burrow MF. The effect of ytterbium fluoride and barium sulphate nanoparticles on the reactivity and strength of a glass-ionomer cement. *Dent Mater.* 2006; 22(8): 746-51.
37. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod.* 2009; 35(5): 731-6.
38. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(4): 483-9.
39. Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Razmi H, Sajadi S, Davies TE, Saghiri MA et al. Bioactivity of EndoSequence root repair material and bioaggregate. *Int Endod J.* 2012; 45(12): 1127-34.

40. Silva EJ, Carvalho NK, Zanon M, Senna PM, G DE-D, Zuolo ML, et al. Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1):
41. Somma F, Cretella G, Carotenuto M, Pecci R, Bedini R, De Biasi M, et al. Quality of thermoplasticized and single point root fillings assessed by micro-computed tomography. *Int Endod J.* 2011; 44(4): 362-9.
42. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod.* 1995; 21(12): 603-8.
43. Vivan RR, Zapata RO, 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.
44. Xing H, Bu W, Ren Q, Zheng X, Li M, Zhang S, et al. A NaYbF₄: Tm³⁺ nanoprobe for CT and NIR-to-NIR fluorescent bimodal imaging. *Biomaterials.* 2012; 33(21): 5384-93.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 16/09/2018

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 16 de setembro de 2016.

BERNARDO CESAR COSTA