

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**Avaliação do pH, liberação de íons cálcio e
atividade antibacteriana de um material
retrobturador de polimerização dual à base de Bis-
EMA/MTA**

Giane da Silva Linhares

Pelotas, 2012

GIANE DA SILVA LINHARES

**AVALIAÇÃO DO pH, LIBERAÇÃO DE
ÍONS CÁLCIO E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE UM MATERIAL
RETROBTURADOR DE
POLIMERIZAÇÃO DUAL À BASE DE
BIS-EMA/MTA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, Área de concentração
em Dentística da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de
Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Co-orientador: Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Pelotas, 2012

Dados de Catalogação da Publicação

L755a

Linhares, Giane da Silva

Avaliação do PH, liberação de íons cálcio e atividade antibacteriana de um material retrobturador de polimerização dual à base de Bis-EMA/MTA / Giane da Silva Linhares; orientador: Rogério de Castilho Jacinto; co-orientador: Maximiliano Sérgio Cenci. –

Pelotas: UFPel, 2012.

57 f. : tab. ; fig.

Dissertação (Mestrado) Dentística. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

1. MTA . 2. Atividade antibacteriana. 3. Liberação de cálcio. 4. Cirurgia Parendodôntica. 5. Bis-EMA. I. Jacinto, Rogério de Castilho (orient.). II. Cenci, Maximiliano Sérgio (co-orient.) III. Título.

D2

Bibliotecário: Fabiano Domingues Malheiro CRB -10/1955

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só

Prof^a. Dr^a. Fernanda Geraldês Pappen

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (suplente)

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais Catarina e Jorge
não apenas por terem me gerado, criado e
educado com tanto amor, mas também pelo apoio
e incentivo em todas as etapas da minha vida.
A vocês meu amor eterno e meu agradecimento.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por iluminar meu caminho

Aos meus irmãos Gisele e Rogério e aos meus cunhados Cláudio e Angélica por todo incentivo e carinho.

Ao meu namorado Sinval, pelo incentivo, compreensão em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pelotas por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Antonio Cesar Gonçalves Borges.

À Faculdade de Odontologia através de sua Diretora, Prof^a. Dr^a. Márcia Bueno Pinto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento dos professores, funcionários e colegas. Em especial, quero agradecer a secretária Fernanda pela dedicação, eficiência e atenção.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto, não só pelo conhecimento partilhado e auxílio indispensável para a realização desta pesquisa, mas também pela amizade e disponibilidade de ajudar em qualquer momento.

Ao co-orientador, Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, pelos ensinamentos valiosos repassados durante este período e pelo exemplo de professor e pesquisador.

Ao professor César Zanchi (Tino) pelo acompanhamento, durante todo o período da pesquisa.

Aos colegas, e agora amigos, Cleusa Jacottet, César Knabach, Rita Lamas e Mabel Salas pelo convívio e conhecimentos compartilhados. O apoio de vocês foi fundamental para conclusão desta pesquisa.

Ao responsável pelo Laboratório de Microbiologia, Prof. Dr. Rafael Guerra Lund, à funcionária Carmem, aos colegas Sonia Peralta e Françoise e aos alunos Pedro e Savio pela amizade e disposição em sempre ajudar. Minha gratidão pelo carinho e apoio.

Ao Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca, em especial a Prof^a. Dr^a. Adriana Etges, a Prof^a. Dr^a Sandra Tarquino e a funcionária Taiane (Tatá) que apoiaram as primeiras fases desta pesquisa e sugeriram detalhes que otimizaram e aprimoramento da metodologia desta pesquisa.

Ao Laboratório de Metrologia Química da UFPel, em especial ao Prof. Anderson Ribeiro, a Prof^a Mariana Vieira e a aluna de doutorado Camila Oliz pelo apoio técnico, integração e conhecimentos compartilhados.

Aos familiares e amigos pela amizade e carinho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta Dissertação de Mestrado.

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf).

Resumo

LINHARES, Giane da Silva. **Avaliação do pH, liberação de íons cálcio e atividade antibacteriana de um material retrobturador de polimerização dual à base de Bis-EMA/MTA** 2012. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A incorporação de resinas fotopolimerizadas ao agregado de trióxido mineral (MTA) tem sido proposta com o intuito de melhorar as suas propriedades e reduzir o tempo de presa. O objetivo do presente estudo foi avaliar o pH, a liberação de íons cálcio e a atividade antibacteriana de um material retrobturador experimental de polimerização dual a base de Bis-EMA/MTA (MTA-E) em comparação com o MTA-branco (MTA-B); e avaliar a influência da adição de CaCl_2 sobre estas propriedades. Tubos de polietileno com os materiais foram imersos em água deionizada. Para medir o pH da água foi utilizado um peagâmetro digital. O cálcio liberado foi determinado pela técnica de espectrometria de absorção atômica. O Teste do Contato Direto foi utilizado para avaliar a atividade antibacteriana dos materiais contra *E. faecalis* 30 min e 24 h após a manipulação. Todos os materiais apresentaram uma variação de pH de alcalino para quase neutro e foram capazes de liberar íons cálcio durante os 30 dias do estudo. MTA-E mostrou uma capacidade de liberação de íons cálcio significativamente menor que o MTA-B ($P < 0,05$). A liberação de cálcio do MTA-E + CaCl_2 5% foi semelhante ao MTA-B ($P > 0,05$). Todos os materiais foram 100% efetivos contra *E. faecalis* nos 30 minutos após a manipulação. Após 24h uma redução na atividade antibacteriana foi observada para o MTA-E, com ou sem a adição de CaCl_2 . O monómero Bis-EMA adicionado ao MTA formou um material com baixa capacidade de liberação de cálcio e menor atividade

antibacteriana do que MTA-B, apesar de manter um pH semelhante. No entanto, a adição de CaCl_2 melhorou a liberação de cálcio deste material.

Palavras-chave: MTA. Atividade antibacteriana. Liberação de cálcio. Cirurgia Parendodôntica. Bis-EMA.

Abstract

LINHARES, Giane da Silva. **Evaluation of pH, calcium release, and antibacterial activity of a dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material.** 2012. 57f., Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The incorporation of light-curable resins has been proposed for Mineral Trioxide Aggregate (MTA) to improve its properties and reduce its setting time. The aim of the present study was to assess the pH, calcium-ion release and antibacterial activity of an experimental dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material (E-MTA) in comparison with white-MTA (W-MTA); and to evaluate the influence of the addition of CaCl_2 on these properties. Polyethylene tubes filled with the materials were immersed in deionized water for the measurement of pH (digital pH meter) and calcium release (atomic absorption spectrophotometry). The evaluations were performed at 3 and 24 hours and 7, 15 and 30 days. The direct contact test was used for evaluation of antibacterial activity of the materials against *E. faecalis* 30 min and 24 h after manipulation. All materials presented a variation from an alkaline to nearly neutral pH, and were capable of releasing calcium ions along the 30 days of the study. E-MTA showed a significant lower calcium ion release capacity when compared to W-MTA ($P < 0.05$). The calcium release of E-MTA + 5% CaCl_2 was similar to W-MTA ($P > 0.05$). All materials were 100% effective against *E. faecalis* at 30 min after manipulation. Reduction in the antibacterial activity was observed for E-MTA with or without the addition of CaCl_2 after 24h. The monomer Bis-EMA added to MTA formed a material with lower capacity of calcium release and lower antibacterial activity than W-MTA, in spite of maintaining a similar pH. However, the addition of CaCl_2 improved the calcium release of this material.

Keywords: MTA. Antibacterial activity. Calcium release. Root-end surgery. Bis-EMA.

Lista de figuras

Projeto de pesquisa

Figura 1	Tampa da Cubeta	26
Figura 2	Aparato: Tampa da cubeta + tubo de polietileno	26
Figura 3	Inserção do cimento no tubo polietileno com auxílio do calcador de Paiva	26
Figura 4	Suspensão bacteriana colocada sobre a extremidade aberta do tubo de polietileno que contem o material	28
Figura 5	Caldo BHI na cubeta e o aparato inserido de forma a tampar a cubeta	28

Lista de tabelas

Projeto de pesquisa

Tabela 1. Materias testados, sua composição e proporção	22
---	----

Artigo científico

Table 1. Composition of materials used in the study	52
Table 2. Values of pH (mean±standard deviation, $n = 5$ for each material) of soaking water after immersion of the cements for different times	52
Table 3. Calcium released (mean±standard deviation, expressed as ppm, $n = 5$ for each material) in soaking water after immersion of the samples for different times	52
Table 4. Mean ($\pm$ standard deviation) Log_{10} Reduction in Viable Counts of <i>E. faecalis</i> Strains after Exposure to W-MTA, E-MTA, E-MTA +5%CaCl ₂ and E-MTA +10%CaCl ₂	52

Lista de abreviaturas e siglas

%	Percentual
®	Símbolo indicativo de marca registrada
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
<i>et al</i>	e outros
°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de Variância
Bis-EMA	Bisfenol A polietileno glicol dimetacrilato
Bis-GMA	Bisfenol glicidil metacrilato
CaOH	Hidróxido de cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CP	Corpo de prova
CQ	Canforoquinôna
DHEPT	Dihidroxi-etil-p-toluidino
EDAB	Etil 4-dimetilamino benzoato
FO	Faculdade de Odontologia
h	Hora
HEMA	2-hidróxi-etil metacrilato
Ltda	Limitada
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MTA	Agregado trióxido mineral
pH	Potencial hidrogeniônico
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
UFC	Unidade formadora colônia
V	Volume

Sumário

1 Projeto de pesquisa	16
1.1 Antecedentes	16
1.2 Justificativa	20
1.3 Objetivos	21
1.3.1 Objetivo geral	21
1.3.2 Objetivos específicos	21
1.4 Materiais e métodos	22
1.4.1 Materiais testados	22
1.4.2 Determinação do pH e liberação de íons cálcio	23
1.4.2.1 Determinação do pH	24
1.4.2.2 Determinação da liberação de íons cálcio	24
1.4.3 Atividade antimicrobiana	25
1.4.3.1 Cultivo da cepa padrão e preparo do inóculo	25
1.4.3.2 Preparo do aparato e inserção dos materiais	25
1.4.3.3 TCD	27
1.4.4 Tratamento estatístico	28
1.5 Orçamento financeiro da pesquisa	29
1.6 Cronograma do projeto de pesquisa	30
1.7 Local pesquisa	30

1.8 Propriedades das informações	30
1.9 Recursos financeiros disponíveis	31
1.9.1 Origem dos recursos	31
Referências	32
2 Relatório do trabalho de campo	36
3 Artigo científico	38
4 Conclusões	53
Referências	54

1 Projeto de pesquisa

1.1 Antecedentes

Os microrganismos são os principais agentes etiológicos das patologias de origem endodôntica e são capazes de perpetuar o processo patológico (KAKEHASHI et al., 1965). A cirurgia parendodôntica é um procedimento cirúrgico que envolve o periápice, sendo uma alternativa para resolução dos problemas não solucionados pelos tratamentos convencionais de canais radiculares (LEONARDO, 2008).

A apicectomia com obturação retrógrada está indicada em casos em que o tratamento endodôntico convencional fracassou ou em casos de impossibilidade de acesso ao canal radicular por via coronária. Tal conduta consiste no corte da porção apical da raiz de um dente e do preparo de uma cavidade na porção final do remanescente radicular. Em seguida, se realiza a obturação deste espaço com um material adequado, possibilitando um selamento que isole o canal dos tecidos perirradiculares (LEONARDO, 2008).

Um dos fatores principais no sucesso da obturação retrógrada é o material retrobturador a ser utilizado no preenchimento da cavidade. O que se espera de um material obturador ideal para retro-cavidades é que possua as seguintes propriedades: biocompatibilidade, bom selamento marginal, estabilidade dimensional, insolubilidade frente à presença dos fluidos perirradiculares, boa radiopacidade, fácil manipulação e inserção, tempo de presa curto, atividade antimicrobiana, e capacidade de estimular o reparo (TORABINEJAD et al., 1995a,TORABINEJAD; RIBEIRO,2008).

Alguns materiais já foram propostos como retrobturadores como o amálgama de prata, a guta-percha, os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, os cimentos com hidróxido de cálcio e os cimentos à base de agregado trióxido mineral (MTA). No entanto, nenhum material retrobturador reúne todas as propriedades ideais exigidas (VIVAN, 2009, PARIROKH;TORABINEJAD, 2010a). Por esta razão, há uma busca incessante por parte dos pesquisadores para o desenvolvimento de um material que se aproxime, ao máximo, do ideal (VIVAN, 2009).

O MTA foi desenvolvido experimentalmente, na Universidade de Loma Linda, Califórnia, EUA, por Mohamoud Torabinejad, em 1993. É um material constituído por finas partículas hidrófilas, composto principalmente de silicato tricálcico, silicato dicálcico, alumínio tricálcico, ferroalumínio tetracálcio, óxido tricálcico, sulfato de cálcio di-hidratado e, ainda, óxido de bismuto, para atribuir ao agregado maior radiopacidade. Foi lançado, nos Estados Unidos com o nome de ProRoot MTA (Dentsply/Tulsa Dental, Oklahoma, EUA) e no Brasil com a denominação MTA-Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brasil) . A principal diferença entre estes dois materiais é que o MTA-Angelus® não tem sulfato de cálcio (CAMILLERI et al., 2005).

Atualmente, o MTA é o material mais estudado e utilizado em obturações retrógradas (VIVAN, 2009). Este material parece produzir resultados favoráveis quando é utilizado como material retrobturador em termos de ausência de inflamação, presença de cimento e formação de tecido duro (PARIROKH; TORABINEJAD 2010b). O comportamento biológico e a bioatividade dos cimentos à base de MTA têm sido amplamente documentados (GANDOLFI et al., 2010; GANDOLFI et al., 2011).

O mecanismo de ação do MTA é semelhante ao do hidróxido de cálcio. O óxido de cálcio presente no MTA, misturado com a água, forma hidróxido de cálcio, o qual em contato com fluidos teciduais se dissocia em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio, quando em contato com o tecido conjuntivo, determinam uma área de necrose, formando o dióxido de carbono. Este, mais o hidróxido de cálcio, formam cristais de calcita (carbonato de cálcio), que servem de núcleos de calcificação. A alcalinidade do meio estimula o tecido conjuntivo a secretar a glicoproteína, chamada fibronectina, que, juntamente com os cristais de calcita, estimulam a

formação de colágeno tipo I, o qual, com o cálcio, induz a mineralização (HOLLAND, 2002; YALTIRIK et al. 2004).

Diversas pesquisas têm sugerido que o mecanismo de estimulação do reparo pela deposição de tecido mineralizado depende do pH e da capacidade de liberação de íons cálcio (HOLLAND et al, 2001; DUARTE et al, 2003; GANDOLFI et al., 2011). O MTA tem um pH inicial de 10,2 que aumenta para 12,5 três horas após a mistura (TORABINEJAD; PARIROKH, 2010). Em razão desse elevado pH, próximo ao do hidróxido de cálcio, estimula a mineralização, quando utilizado como material reparador. Em muitas situações clínicas reais, o MTA é aplicado em um ambiente inflamado onde existe um baixo pH (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010). As propriedades físicas e químicas do MTA podem ser influenciadas em um ambiente de baixo pH (TORABINEJAD et al., 1995a).

Apesar de diversas vantagens, o MTA apresenta limitações (PARIROKH ; TORABINEJAD, 2010b). Entre elas incluem: prolongado tempo de presa (150 minutos) (TORABINEJAD et al., 1995), difícil manipulação e inserção do material (SANTOS et al., 2005; BOZEMAN et al., 2006) e custo relativamente alto (DUARTE et al., 2005). O longo tempo de presa do MTA (BOGEN ; KUTTLER, 2009; GOMES-FILHO et al., 2009; PORTER et al., 2010) leva ao risco da dissolução rápida e remoção do cimento (PORTER et al., 2010) da cavidade retrógrada, pois ele é colocado na região apical do canal radicular em que há sangue e contaminação de fluidos.

Por isso, várias pesquisas estão sendo realizadas para superar estas limitações. No entanto, a adição ou remoção de elementos pode afetar características deste material. Assim, investigações abrangentes são necessárias para que se possa introduzir novas composições de MTA. Nesse sentido, novas formulações têm que ser testadas *in vitro* como também condições *in vivo* antes de suas aplicações em humanos (PARIROKH ; TORABINEJAD, 2010b).

O fabricante do MTA-Angelus informa que desde 2002 alterou o tempo de presa do MTA, que era de 150 minutos, reduzindo-o para 15 minutos (SANTOS et al., 2008). Essa redução do tempo de presa é exclusiva do MTA-Angelus. Foi realizada a diminuição da concentração do Sulfato de Cálcio, que deixa a presa do produto muito longa (Site Angelus®). No entanto, este material ainda apresenta limitações como difícil manipulação e inserção do material e custo relativamente alto.

Em virtude das características indesejáveis do MTA, as pesquisas estão procurando melhorar as propriedades deste material através da formulação de um MTA fotopolimerizável. Diferenças na composição, como adição de diferentes monômeros resinosos, estão sendo realizadas (GOMES FILHO et al., 2008, GOMES FILHO et al., 2011; GANDOLFI et al., 2011; PINTADO, 2011).

Gandolfi et al., (2011) estudaram um cimento fotopolimerizável de silicato de cálcio modificado por resina denominado cimento Ic-MTA contendo resina HEMA-TEGMA para ser utilizado em contato com o osso e a dentina nas cirurgias parodontodônticas. Os pesquisadores concluíram que é possível desenvolver um cimento fotopolimerizável de MTA capaz de tomar presa em 2 minutos através da combinação de base hidrófila de resina HEMA/TEGDMA e o pó de silicato de cálcio.

Com o intuito de melhorar as propriedades clínicas de trabalho, manipulação e tempo de presa, um cimento resinoso experimental à base de MTA com polimerização dual (MTA-E) foi desenvolvido no CDC-Bio (Centro de Desenvolvimento e Controle Biomateriais), da Faculdade de Odontologia (FO) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Neste material experimental os monômeros resinosos utilizados são diferentes dos utilizados em pesquisas prévias (GOMES FILHO et al., 2008, GOMES FILHO et al., 2011; GANDOLFI et al., 2011).

O MTA-E (CDC-Bio) é composto por duas pastas: uma pasta base e uma ativadora. Cada uma destas pastas apresenta em sua composição 40% de Bis-EMA, sendo 20% de Bis-EMA 10 e 20% de Bis-EMA 30. O monômero Bis-EMA é um análogo dimetacrilato do Bis-GMA. O Bis-EMA apresenta menor viscosidade que o Bis-GMA, uma característica favorável para o desempenho dos materiais odontológicos (OGLIARI et al., 2008).

Estudos relatam que a adição de gluconato de clorexidina 0,12% aumenta a atividade antimicrobiana do ProRoot® MTA (STOWE et al., 2004). A clorexidina é um agente antimicrobiano catiônico. Tem sido amplamente utilizada como anti-séptico e é ativa contra bactérias gram positivas e gram negativas, anaeróbios facultativos e aeróbios, leveduras e vírus (HAUMAN; LOVE, 2003).

Tem sido sugerido que o mecanismo de estimulação do reparo pela deposição de tecido mineralizado depende do pH e da capacidade de liberação de íons cálcio (STANLEY et al., 1989; HOLLAND et al., 2001; DUARTE et al., 2003;

OKABE et al., 2006). A adição de monômeros resinosos ao MTA para torná-lo fotopolimerizável pode prejudicar a liberação de íons cálcio. Assim, a avaliação desta propriedade após as modificações do material é fundamental para atestar a sua efetividade.

Além da capacidade de liberação de cálcio, dentre outras propriedades, o material retrobturador deve apresentar atividade antimicrobiana (TORABINEJAD et al., 1995b). O teste do contato direto tem sido utilizado para verificar a atividade antimicrobiana do MTA (ELDENIZ et al., 2006; MORGENTAL et al., 2011). Assim, é importante avaliar se as modificações propostas ao material alteram a sua atividade antimicrobiana.

Diante do exposto, este trabalho objetiva avaliar se a adição de monômeros resinosos e adição de clorexina altera as propriedades de liberação de íons cálcio, pH e a atividade antimicrobiana do MTA.

1.2 Justificativa

A presente pesquisa justifica-se por ser um trabalho com cimentos experimentais que poderão ser lançados posteriormente no mercado odontológico. Serão utilizados cimentos à base de MTA com polimerização dual de mais fácil manipulação e menor tempo de presa. Além disso, a adição de clorexidina poderá aumentar o seu efeito antimicrobiano.

Outro aspecto importante é que existe a possibilidade de se introduzir um material com custo mais baixo.

Os testes *in vitro* são ensaios preliminares indispensáveis para o desenvolvimento de novos materiais odontológicos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar algumas propriedades físico-químicas de cimentos experimentais à base de Bis-EMA/MTA com polimerização dual indicados para a obturação retrógrada, como: pH e capacidade de liberação de íons cálcio. Além disso, analisar a atividade antibacteriana desses cimentos.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o pH de cimentos experimentais à base de Bis-EMA/MTA com polimerização dual após 3, 24 horas e 3, 7, 14 e 28 dias e comparar MTA branco Angelus®.
- b) Avaliar a liberação de íons cálcio após 3, 24 horas e 3, 7, 14 e 28 dias de cimentos experimentais à base de Bis-EMA/MTA com polimerização dual e comparar com MTA branco Angelus®.
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana de cimentos experimentais à base de Bis-EMA/MTA com polimerização dual, através do TCD com *E. faecalis* e comparar com MTA branco Angelus®.
- d) Avaliar a influência da adição de solução de clorexidina 0,12% ao material na sua capacidade de liberação de cálcio e na sua atividade antimicrobiana.

Hipóteses

O estudo avaliará as hipóteses nulas de que:

- a) Não existem diferenças entre o pH, a liberação de íons cálcio e a atividade antibacteriana do MTA branco Angelus® e de cimentos experimentais à base de Bis-EMA/MTA de polimerização dual;
- b) A adição de clorexidina 0.12% não influencia na liberação de íons cálcio, no pH e na atividade antibacteriana do material.

1.4. Materiais e métodos

1.4.1. Materiais testados

Os materiais utilizados neste estudo serão: MTA branco Angelus®, MTA Experimental (MTA-E), MTA Experimental com clorexidina (MTA-E+CHX). (Tabela1).

Tabela1 – Materiais testados, sua composição e proporção.

Material/ Fabricante	Composição	Proporção
MTA branco Angelus®	Pó: Cimento Portland, Silicato tricálcico, Silicato dicálcico, Aluminato tricálcico, Ferroaluminato tetracálcico, Óxido de bismuto Líquido: Água destilada Pasta A: 60% MTA ¹ , 20% Bis-EMA 10, 20% Bis-EMA 30 Iniciadores: 1% DHEPT, 0,8%EDAB, 0,4%CQ	Pó/Líquido- 3:1
MTA Experimental (MTA-E)(CDC-Bio)	Pasta B: 60% Fluoreto Yérbio, 20%Bis-EMA 10, 20%Bis-EMA 30 ² Iniciadores: 1,5% Peróxido de benzoíla Pasta A: 60% MTA, 20% Bisema 10, 20% Bisema 30 Iniciadores: 1% DHEPT ³ , 0,8%EDAB ⁴ , 0,4%CQ ⁵	Pasta A/Pasta B- 1:1
MTA Experimental com clorexidina (MTA-E+CHX) (CDC-Bio)	Pasta B: 60% Fluoreto Ytérbio, 15%Bis-EMA 10, 15%Bis-EMA 30, 10% solução de clorexidina 0,12% Iniciadores: 1,5% Peróxido de benzoíla	Pasta A/Pasta B- 1:1

¹ MTA, agregado trióxido mineral;

² Bis-EMA, Bisfenol A polietileno glicol dimetacrilato;

³ DHEPT, Dihidroxi-etil-p-toluidino;

⁴ EDAB, Etil 4-dimetilamino benzoato;

⁵ CQ, Canforoquinôna

Os materiais retro-obtutores testados, para as três metodologias, serão divididos de acordo com os grupos:

Grupo 1 : MTA branco Angelus®

Grupo2:MTA branco Angelus® + Solução de Clorexidina 0,12% (MTA+CHX)

Grupo 3 :Cimento experimental de MTA (MTA-E)

Grupo4: Cimento experimental de MTA (MTA-E) com solução de Clorexidina 0,12% (MTA- E+ CHX)

O MTA branco Angelus® será manipulado de acordo com as recomendações do fabricante. Os materiais experimentais (MTA-E e MTA-E+CHX) serão manipulados por 30 segundos. Após a manipulação serão inseridos no local desejado e, então fotopolimerizados, utilizando um aparelho fotopolimerizador (Ultralux-DabiAtlante, Ribeirão Preto, Brasil) por 40 segundos em incrementos de 1 mm.

1.4.2 Determinação do pH e liberação de íons cálcio

Para aferição do pH e para a determinação da capacidade de liberação de íons cálcio serão utilizados tubos de polietileno com diâmetro interno de 1,0mm e 10mm de comprimento com apenas uma de suas extremidades aberta. Uma das extremidades do tubo será fechada pela compressão de suas bordas com um instrumento aquecido. Depois, os cimentos serão inseridos no interior dos tubos com o auxílio de calcadores do tipo Paiva até o completo preenchimento destes. Os tubos serão pesados para verificar a padronização da quantidade de cimento em cada tubo ($\pm 0.002g$). Serão preparados 5 espécimes de cada cimento que serão utilizados para os 2 testes. Depois do preenchimento dos cinco tubos correspondentes a cada cimento, os espécimes serão imediatamente imersos em tubos de polipropileno (Tubos Falcon) contendo 10 mL de água deionizada obtida a partir de um sistema de purificação Direct-Q 3 da Millipore (BedFord, MA, Estados Unidos), com resistividade de 18,3 M Ω cm, que serão, então, fechados e levados à estufa a 37°C (NT 705 Estufa Incubadora, Nova Técnica, São Paulo, Brasil), onde permaneceram por todo o período experimental. Previamente a imersão dos espécimes, o pH e a concentração de íon cálcio da água deionizada será verificada, atestando pH 6.8 e total ausência de íons cálcio. Para evitar qualquer tipo de

interferência nos resultados, todos os vidros e equipamentos do laboratório serão previamente tratados com ácido nítrico 10% (Synth, Brasil). As avaliações serão realizadas nos períodos de 3, 24 horas e 3, 7, 14 e 28 dias, e, a cada período, os espécimes serão cuidadosamente retirados do tubo Falcon e imersos em um novo tubo Falcon com o mesmo volume de água deionizada.

1.4.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH será realizada por meio de um pHmetro (Q 400A, Quimis ® Aparelho científicos LTAD, Diadema, São Paulo, Brasil) previamente calibrado com soluções de pH conhecido (4, 7 e 14). Após a remoção do espécime, o tubo Falcon será levado a um agitador vortex (QL-901, Marca Biomixer) por 5 segundos. Após a agitação, o líquido será vertido em um Becker, e então colocado em contato com o eletrodo do pHmetro.

1.4.2.2 Determinação da liberação de íons cálcio

Após a determinação do pH, a solução contida no Becker será novamente agitada e armazenada em tubos Falcon. Estes tubos serão armazenados sob refrigeração até que todos os períodos experimentais sejam realizados, ou seja, após 28 dias, quando então serão iniciados os procedimentos para a leitura dos valores referentes a liberação de íons cálcio, através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com chama. Dessa forma, todos os espécimes de todos os grupos e de todos os períodos serão analisados no mesmo dia para a determinação de cálcio. Para a monitoração do Ca^{++} será empregado o espectrofotômetro de absorção atômica (Modelo AA-6300, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão). As condições para sua utilização serão determinadas seguindo as recomendações do fabricante, utilizando um comprimento de onda de 422,70 nm, uma fenda espectral de 0,5 nm, uma corrente de 10 mA na lâmpada, e uma estequiometria da chama levemente redutora, mantida por fluxo de acetileno a 2 litros por minuto, suportada por ar. Para prevenir possíveis interferências de fosfato e metais alcalinos nas análises, as amostras e padrões serão diluídos em meio de solução de cloreto de lantânio 0,1 % (m/v) e a vidraria empregada será previamente lavada com ácido nítrico (Synth, Brasil). Uma solução padrão estoque de cálcio, de concentração de 10 mg/L será diluída em água deionizada para atingir as seguintes concentrações: 0,5

mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L e 2,0 mg/L de cálcio. As amostras serão diluídas conforme o necessário. Para levar o aparelho a zero de absorvância, será empregado como branco o cloreto de lantânio. Os resultados serão calculados por meio da equação da reta da curva padrão, estabelecida com base em soluções com concentrações de cálcio pré-definidas e testes de adição e recuperação para validação da metodologia. A leitura da liberação de íons Ca^{++} será efetuada nos mesmos períodos utilizados na do pH.

1.4.3. Atividade antimicrobiana

1.4.3.1 Cultivo da cepa padrão e preparo do inóculo

A atividade antimicrobiana dos cimentos será avaliada contra o microrganismo *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A cepa será cultivada aerobicamente em Brain Heart Infusion Agar (BHI-Difco Laboratories, Detroit, MI) a 37°C por 24 horas. Em todos os casos, 18-20 unidades formadoras de colônia (UFC) serão utilizadas. As células serão colhidas da placa de Agar e ressuspensas em um tubo de ensaio contendo 5mL de caldo BHI fresco (BHI-Difco Laboratories, Detroit, MI). O inóculo bacteriano será padronizado por espectrometria até atingir uma turbidez, cujo valor de absorvância será equivalente à concentração bacteriana de 10^8 UFC.

1.4.3.2 Preparo do aparato e inserção dos materiais

Um aparato será montado para que os corpos de prova possam ser removidos da cubeta durante a agitação no vórtex como segue: um calcador de Paiva aquecido será utilizado para se realizar um furo na tampa (Figura 1) de cada cubeta (Modelo SP-22). Será fixado em um tubo de polietileno com diâmetro interno de 1 mm e 10 mm de comprimento neste furo com o auxílio de cianocrilato (Figura 2). Os cimentos serão inseridos na extremidade aberta do tubo de polietileno com o auxílio de um calcador de Paiva (Figura 3) até o completo preenchimento deste. O MTA angelus® será deixado por 15 minutos em contato com umidade e o MTA-E será fotopolimerizado. Após a presa e polimerização dos cimentos, este aparato será esterilizado com radiação gama (Eldorado 78 Theratron).



Figura 1 - Tampa Cubeta.



Figura 2 - Aparato: tampa+tubo polietileno.

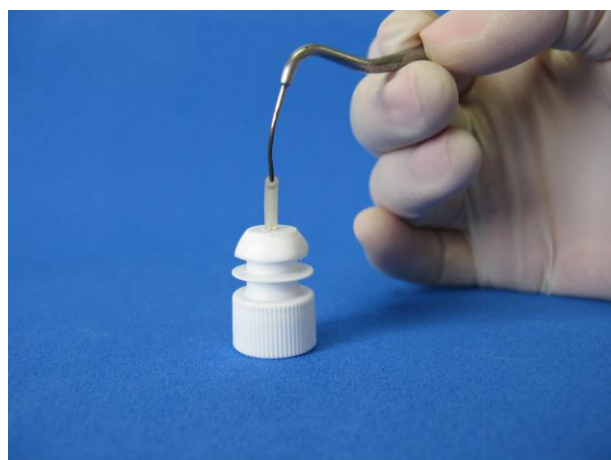


Figura 3 - Inserção do cimento no tubo de polietileno com auxílio do calcador de Paiva.

1.4.3.3 TCD

O Teste do Contato Direto (TCD) foi descrito detalhadamente por Weiss, Shalhav e Fuss (1996) para avaliar as propriedades antimicrobianas de cimentos endodônticos. Posteriormente, alguns pesquisadores realizaram modificações em tal metodologia para avaliação de materiais retrobturadores (ELDENIZ et al., 2006). Nesse sentido, o crescimento microbiano será observado em meio líquido pela determinação da absorvância. Então, uma suspensão bacteriana de 5µl (cerca de 10^8 bactérias) será colocada sobre a extremidade aberta do tubo de polietieno contendo o material (Figura 4). Depois da incubação por 1 hora em um ambiente úmido a 37°C, a suspensão do líquido terá evaporado, garantindo o contato direto entre todas as bactérias e as superfícies dos materiais testados. O Caldo BHI (3mL) estéril será então adicionado a cada uma das cubetas e o aparato será inserido de forma a tampar a cubeta (Figura 5). A cubeta será então armazenada em estufa de O₂ a 37°C por 1h. Para a realização da primeira leitura o aparato será cuidadosa e assepticamente removido e a cubeta será agitada em vórtex por 2 minutos para então ser feita a leitura da absorvância. A cinética de crescimento bacteriano em cada cubeta será avaliada pelo uso do Espectrofotômetro Digital (Saída RS 232C - Modelo SP-22). As leituras da absorbância serão realizadas de hora em hora durante 24 horas. A cada hora será realizada a semeadura de alíquotas de 10µl em meio agar (BHI-Difco Laboratories, Detroit, MI) para crescimento e contagem de *E. faecalis*. O teste será realizado em para garantir a reprodutibilidade. Em duas cubetas será inserido o inóculo *E. faecalis* + BHI, sem o material retrobturador (controle positivo). Outras duas cubetas terão BHI+cimento sem o inóculo (controle negativo). Todos os dados serão tabulados e submetidos à análise estatística.



Figura 4 - Suspensão bacteriana colocada sobre a extremidade aberta do tubo de polietileno que contém o material.



Figura 5 - Caldo BHI na cubeta e o aparato inserido de forma a tampar a cubeta.

1.4.4 Tratamento estatístico

Os dados serão tabulados e será empregado o pacote Sigma Stat (Versão 3.01, Systat Software Inc). De posse dos resultados experimentais deste projeto, o método estatístico será escolhido com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Se essas pressuposições forem atendidas, os dados obtidos serão analisados com ANOVA (análise de variância) de uma via. O teste Tukey será utilizado para determinar as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Para todos os testes será considerado um nível de significância de 5%

1.5. Orçamento financeiro da pesquisa

Materiais	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Touca c/ 100 (Anadona)	10	0,15	1,50
Máscara c/ 50 (Preven)	10	0,22	2,20
Luvras de procedimento c/100(supermax)	1	15,00	15,00
Ponteira neutra 0,5-10 µL c/ 1000 Axygen (5µL)	1	32,30	32,30
Ponteira neutra 1000 – 10.000µL c/ 200 Axygen	1	82,80	82,80
Cubetas descartáveis com 100 unidades(SP-22)	1	32,00	32,00
Clorexidina 0,12% (Uso indicado- Farmácia de Manipulação- Pelotas-RS)	1	15,00	15,00
Brain Heart Infusion Àgar (BHI)	1	208,70	208,70
Fio ortodôntico	1	8,00	8,00
Canforoquinona	10g	410,00	410,00
EDAB	10g	300,00	300,00
MTA branco Angelus	6	104,00	624,00
TOTAL			1731,50

1.6 Cronograma do projeto de pesquisa

ANO	2011					2012									
MÊS	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cadastro no COCEPE	X	X													
Qualificação Projeto			X												
Piloto			X												
Experimento				X	X	X	X	X	X						
Digitação dos dados										X					
Análise dos dados										X	X				
Redação da dissertação												X	X		
Redação do artigo														X	
Defesa															X

1.7 Local da pesquisa

A manipulação dos materiais e a avaliação do pH será realizada no Laboratório CDC-Bio; a avaliação da atividade antibacteriana no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFPel; a determinação da liberação de íons cálcio no laboratório da Química Analítica do Instituto de Química e Geociências (IQG) da UFPel e a esterilização do aparato no Centro Regional de Oncologia Radioterapia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas.

1.8. Propriedade das informações

Após a realização da pesquisa, seus resultados serão tornados públicos através de divulgação em periódicos científicos de circulação internacional. Os resultados da pesquisa serão tornados públicos sejam eles favoráveis ou não.

1.9 Recursos financeiros disponíveis

1.9.1 Origem dos recursos

Os recursos serão provenientes PROAP/CAPES (R\$ 8.000,00/ano destinados ao Laboratório de Microbiologia); PRODOC/CAPES (R\$ 12.000,00/ano) e recursos dos pesquisadores.

REFERÊNCIAS

BOGEN, G.; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 6, p. 777-790, 2009.

BOZEMAN, T.B.; LEMON, R.R.; ELEAZER, P.D. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 5, p. 425-8, 2006.

CAMILERRI J.; MONTESI F.E.; DISILVIO L.; PITT FORD T.R. The chemical constitution and biocompatibility of accelerat (accelerate?) Portland cement for the use. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 11, p. 834-842, 2005.

DUARTE, M.A.; DEMARCHI, A.C.; YAMASHITA, J.C.; KUGA, M.C.; FRAGA SDE, C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 95, n. 3, p. 345-47, 2003.

ELDENIZ, A. U.; HADIMLI, H. H.; ATAOGU, H.; ØRSTAVIK, D. Antibacterial Effect of Selected Root-End Filling Materials. **Journal of Endodontics**. v. 32, n. 4, p. 345-49, 2006.

GANDOLFI, M.G.; TADDEI, P.; TINTI, A.; PRATI, C. Apatite-forming ability of ProRoot MTA. **International Endodontic Journal**. v. 43, n. 10, p. 917–29, 2010a.

GANDOLFI, M.G.; CIAPETTI, G.; TADDEI, P.; PERUT, F.; TINTI, A.; CARDOSO, M. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. **Dental Materials**. v. 26, n. 10, p. 974–92, 2010b.

GANDOLFI, M.G.; TADDEI, P.; SIBONI, F.; MODENA, E.; CIAPETTI, G.; PRATI, C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. **Dental Materials**, v. 27, n. 7, p. 134-57, 2011.

GOMES-FILHO, J.E.; FARIA, M.D.; BERNABÉ, P.F.; NERY, M.J.; OTOBONI-FILHO, J.A.; DEZAN-JUNIOR, E.; MORAES COSTA, M.M.; CANNON, M. Mineral trioxide

aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. **International Endodontic Journal**. v. 34, n. 1, p. 62-55, 2008.

GOMES-FILHO, J.E.; RODRIGUEZ, G.; WATANABE, S.; ESTRADA BERNABE, P.F.; LODI, C.S.; GOMES, A.C. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. **Journal of Endodontics**. v. 35, n. 10, p. 1377–80, 2009.

GOMES-FILHO, J.E.; DE MORAES COSTA, M.M.; CINTRA L.T.; DUARTE, P.C.; TAKAMIYA, A.S.; LODI, C.S.; BERNABÉ, P. F. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 2, p. 250-54, 2011.

HAUMAN, C.H.; LOVE, R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 2, p.75–85, 2003.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; OTOBONI FILHO, J.A.; BERNABÉ P.F.; DEZAN JÚNIOR, E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. **Brazilian Dental Journal**, v.12, n. 1, p. 3-8, 2001.

HOLLAND, R. Agregado trióxido mineral(MTA): Composição, mecanismo de ação, comportamento biológico e emprego clínico. **Ciência Odontologia**, n. 5, p 7-21, 2002.

YALTIRIK, M.; OZBAS H.; BILGIC B.; ISSEVER H. Reaction of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **Journal of Endodontics**, v. 30, p.95-99, 2004.

KAKEHASHI, S.; STANLEY H.R.; FITZGERALD R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 20, p. 340-9, 1965.

LEONARDO, M. R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos**. 1ª ed. São Paulo, Artes Médicas, p.1241-1244, 2008.

MORGENTAL, R.D.;VIER-PELISSER, F.V.; OLIVEIRA, S.D.; ANTUNES, F.C.; COGO, D.M. & KOPPER, P.M. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 12, p. 1128-33, 2011.

OGLIARI, F.A.; ELY, C.; ZANCHI, C.H.; FORTES, C.B.; SAMUEL, S.M.; DEMARCO, F.F.; PETZOLD, C.L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, v. 24, n. 2, p. 165-71, 2008.

OKABE, T., SAKAMOTO, M.; TAKEUCHI, H.; MATSUSHIMA, K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**. v. 32, n. 3, p. 198-201, 2006.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a Comprehensive Literature Review part I: Chemical, Physical and Antibacterial properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 16-27, 2010a.

PARIROKH M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part III: Clinical applications,drawbacks, and mechanism of action. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 400-13, 2010b.

PINTADO, Laura Siqueira. **Citotoxicidade, genotoxicidade e propriedades físico-mecânicas de um cimento experimental à base de MTA**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração Dentística). - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PORTER, M.L.; BERTO, A.; PRIMUS C.M.; WATANABE, I. physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 524–8, 2010.

RIBEIRO, D.A. Do endodontic compounds induce genetic damage? a comprehensive review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 105, n. 2, p. 251–6, 2008.

SÁNCHEZ, A.; F.Y.; ÁNEZ, BERROCAL, M.I.L.; GONZALEZ, J.M.M. Metaanalysis of filler materials in periapical surgery. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal** v. 3, n.13, p. 180-85, 2008.

SANTOS, A.D.; MORAES, J.C.; ARAUJO, E.B.; YUKIMITU, K.; VALERIO FILHO W.V. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 7, p.443-7, 2005.

Site: Angelus®. Disponível em:

<http://www.angelus.ind.br/pt/cimentos_endodonticos/mta/DuvidasFrequentes.asp

>Acesso em: :07 jun. 2010, 17:40:20

STANLEY, H.R. Pulp capping: conserving the dental pulp—can it be done? Is it worth it? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 68, n. 5, p. 628-39, 1989.

STOWE T.J.; SEDGLEY, C.M.; STOWE, B.; FENNO, J.C. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 6, p. 429-431, 2004.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; MCDONALD, F.; PITT FORD, T.R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 7, p. 349-53, 1995a.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; PITT FORD, T.R.; KETTERING, J.D. Antibacterial effects of some root end filling materials. **Journal of Endodontics**. v. 21, n. 8, p. 403–6, 1995b.

TORABINEJAD, M.; PITT FORD, T.R. Root end filling materials: a review. **Endodontics Dental Traumatology**, v. 12, n. 4, p. 161–78, 1996.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part II: leakage and biocompatibility investigations. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 190-202, 2010.

VIVAN, Rodrigo Ricci. **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas de alguns materiais retrobturadores**. 2009, 166f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em endodontia), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIVAN R.R.; ZAPATA, R.O.; ZEFERINO, M.A.; BRAMANTE, C.M.; BERNARDINELI, N.; GARCIA, R.B.; DUARTE, M.A.H.; FILHO, M.T.; MORAES, I.G. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. v. 110, n. 2, p. 250-6, 2010.

WEISS, E.I.; SHALHAV, M.; FUSS, Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. **Endodontic Dental Traumatology**. v.12, n, 4, p.179-184, 1996.

2 Relatório do trabalho de campo

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as mudanças realizadas na pesquisa, sugeridas pela banca examinadora do projeto de qualificação, realizada em outubro de 2011. Além de modificações necessárias durante a execução do trabalho.

1.1 TÍTULO

Foi sugerido a mudança do título para: “Propriedades químicas e atividade antibacteriana de cimentos experimentais à base de MTA para obturação retrógrada”. No entanto, após a conclusão do trabalho optamos pelo título que segue: “Avaliação do pH, liberação de íons cálcio e atividade antibacteriana de um material retrobturador de polimerização dual a base de Bis-EMA/MTA”.

1.2 OBJETIVO

Algumas alterações foram feitas no objetivo geral devido às limitações durante a execução da metodologia. Inicialmente, avaliariamos a influência da adição de Clorexidina ao cimento resinoso, o que não foi possível. Desta forma, foi avaliada a influência do Cloreto de Cálcio adicionado ao cimento resinoso.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do Teste do Contato Direto (TCD) foi substituída pelo método publicado por Lovato et.al, 2011. Também foi incluído o teste para avaliar a ação residual do material.

1.5 PESQUISA ADICIONAL

Foi sugerido incluir outras metodologias (Sorção e Solubilidade; Genotoxicidade; Tempo de presa; Profundidade de polimerização e Dureza dos materiais) para o artigo uma vez que outras metodologias podem ajudar a explicar alguns fenômenos observados durante a realização das propriedades já avaliadas. Algumas destas metodologias estão em andamento, mas ainda não foram concluídas.

3 Artigo científico

Evaluation of pH, calcium release, and antibacterial activity of a dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material.

Giane da Silva Linhares*

César Blaas Knabach*

Maximiliano Sérgio Cenci**

Camila Mizette Oliz***

Mariana Antunes Vieira****

Anderson Schwingel Ribeiro****

César Henrique Zanchi**

Rogério de Castilho Jacinto*****

* DDS, Postgraduate student, Dental School, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

** DDS, MSc, PhD, Adjunct Professor, Department of Restorative Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

*** CS, Postgraduate student, Chemical School, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

**** CS, MSc, PhD, Adjunct Professor, Institute of Chemical, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

***** DDS, MSc, PhD, Adjunct Professor – Endodontic Division – Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; Research Professor, Department of Restorative Dentistry, Endodontic Division – Piracicaba Dental School – State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

Corresponding author:

Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto BDS, MSc, PhD.

Endodontia, Faculdade de Odontologia de Pelotas, FOP-UFPEL, Rua
Gonçalves Chaves 457, Pelotas, RS, Brazil - CEP: 96015-560. Tel/Fax:
+55-53-3222-6690. e-mail: rogeriocastilho@hotmail.com –

§Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Endodontics

Evaluation of pH, calcium release, and antibacterial activity of a dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material.

ABSTRACT

Introduction - The incorporation of light-curable resins has been proposed for Mineral Trioxide Aggregate (MTA) to improve its properties and reduce its setting time. The aim of the present study was to assess the pH, calcium-ion release and antibacterial activity of an experimental dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material (E-MTA) in comparison with white-MTA (W-MTA); and to evaluate the influence of the addition of CaCl_2 on these properties.

Methods - Polyethylene tubes filled with the materials were immersed in deionized water for the measurement of pH (digital pH meter) and calcium release (atomic absorption spectrophotometry). The evaluations were performed at 3 and 24 hours and 7, 15 and 30 days. The direct contact test was used for evaluation of antibacterial activity of the materials against *E. faecalis* 30 min and 24 h after manipulation.

Results - All materials presented a variation from an alkaline to nearly neutral pH, and released calcium ions along 30 days of the study. E-MTA showed a significant lower calcium ion release capacity when compared to W-MTA ($P < 0.05$). The calcium release of E-MTA + 5% CaCl_2 was similar to W-MTA ($P > 0.05$). All materials were 100% effective against *E. faecalis* at 30 min after manipulation. Reduction in the antibacterial activity was observed for E-MTA with or without the addition of CaCl_2 after 24h. Residual effect was not observed for any of the materials.

Conclusion - The monomer Bis-EMA added to MTA formed a material with lower capacity of calcium release and lower antibacterial activity than W-MTA, in spite of maintaining a similar pH. However, the addition of CaCl_2 improved the calcium release of this material.

Key words: MTA; Antibacterial activity; Calcium release; Root-end surgery; Bis-EMA.

INTRODUCTION

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) has been one of the most studied root-end filling materials due to its tissue biocompatibility, good marginal sealing, low cytotoxicity and ability to induce deposition of mineralized tissues (1-3). Studies have also shown that MTA presents good antimicrobial activity (1, 4, 5).

MTA is a material of difficult manipulation and insertion and presents a long setting time (6). Consequently, there is a risk of fast dissolution and removal of the yet unset cement at the apical region during root-end surgery (6), and the moist environment might change MTA physical characteristics (7). Thus, the incorporation of light-curable resinous monomers to MTA has been proposed to improve its properties and reduce its setting time (8).

The further replacement of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) for Bis-EMA 30 (bisphenol A ethoxylated dimethacrylate) has reduced the toxicity of dental materials (9). Resinous monomers such as HEMA and TEGDMA (triethyleneglycol dimethacrylate) have been used in the composition of experimental MTA-based materials. However, the addition of monomers and the curing reaction in experimental MTA-based cements might inhibit its calcium ions release and reduce its pH, therefore, distressing the mechanism through which MTA stimulates tissue repair (10, 11).

Several *in vitro* and a few *in vivo* investigations have indicated that the addition of calcium chloride (CaCl_2) to MTA improves its manipulation characteristics and calcium ion release, without affecting its biocompatibility (12-19). CaCl_2 has also been demonstrated to be able to increase the bioactivity of HEMA-based hybrid materials (20). However, it is not known if the addition of Bis-EMA monomers and CaCl_2 to MTA would affect its chemical properties and antibacterial activity.

Therefore, the aim of the present study was to assess the pH, calcium-ion release and antibacterial activity of an experimental dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material (E-MTA) in comparison with white-MTA (W-MTA); and to evaluate the influence of the addition of CaCl_2 on these properties.

MATERIAL AND METHODS

The composition of experimental dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material (E-MTA); E-MTA+5% CaCl_2 ; E-MTA+10% CaCl_2 ; E-MTA+15% CaCl_2 employed in this study as well the White-MTA (W-MTA) is shown in **Table 1**.

W-MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil) was prepared following the manufacturers' instructions. E-MTA was prepared using equal parts of paste 1 and paste 2.

Calcium ion release and pH evaluation

The cements were prepared and insert in polyethylene tubes measuring 1.0 mm of internal diameter and 10.0 mm of length, with only one open end, with aid of a lentulo spiral. E-MTA and E-MTA with CaCl_2 was light-cured for 40 seconds using a light-cure unit (Ultralux-Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brazil). After filled, the tubes were weighed to check the standardization of the amount of cement in each tube (± 0.007 g). Five specimens of each material were prepared. Each specimen was immediately immersed in test tubes containing 10 mL of deionized water (Permution, Curitiba, PR, Brazil), which were then sealed with Parafilm and incubated at 37°C (Farmen, São Paulo, SP, Brazil) throughout the study.

Previous to the immersion of specimens the pH and calcium ion concentration of the deionized water were verified (attesting pH 7.0 and total absence of calcium ions). All laboratory equipments were previously treated with nitric acid to avoid interference in the results. Evaluations were performed at periods of 3, 24 hours, 7, 15 and 30 days. After each measurement, the specimens were carefully moved to new tubes with fresh deionized water. The measurement of pH was performed with a pHmeter (Quimis Q400A, Diadema, São Paulo, Brazil). The release of calcium ions was measured using an atomic absorption spectrophotometer (AA6300, Shimadzu, Tokyo, Japan). The conditions for use of the appliance were determined following the manufacturer's instructions, using a wavelength of 422.70 nm, gap of 0.5 nm, current of 10 mA in the lamp, and slightly reducing stoichiometry, kept by an acetylene flow of 2.0 L per minute, air supported. A lanthanum chloride solution at 1g/L was used to eliminate the interference of phosphates and sulfates and the possibility of formation of refractory oxides. A standard stock solution of 100 mg/L was diluted in water to achieve the following concentrations: 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, and 2.0 mg/L. The results were calculated according to a standard curve, established on the basis of solutions with predefined calcium concentrations.

Antibacterial activity

Microorganism

Antibacterial activity of the root-end filling materials was evaluated against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), in air grown overnight for 24 hours at 37°C on Tryptic Soy Agar (TSB; Becton, Spark, MD) plates. After checking for purity, *E. faecalis* was suspended in sterile water and spectrophotometrically adjusted to a density of 3×10^8 colony-forming units (CFU)/mL (spectrophotometer SP-22).

Preparation of Materials for Antibacterial Assays

For antibacterial activity measurements, standard disks (h=1mm; Ø=3mm) were prepared for each material (W-MTA; E-MTA; E-MTA + 5%CaCl₂; E-MTA + 10% CaCl₂). After preparation, the disks were placed inside 96-well microtiter plates (Sarstedt Inc, Newton, NC). Then, all materials were preincubated for 30 minutes and 24 hours aerobically at 37°C in >95% humidity before exposure to bacteria.

Direct Contact Test

The direct contact test (DTC) used to assess the antibacterial effect of the materials was previously described (21). A 10- μ L bacterial suspension was placed onto the surface of each material. Strain suspensions (10- μ L) placed in uncoated wells served as positive controls. Materials incubated without bacteria served as negative controls. All samples were incubated aerobically for 1 hour at 37°C in >95% humidity; then 150 μ L of BHI broth (BHI-Difco Laboratories, Detroit, MI) was added to each well and gently mixed with a pipette for 1 minute. Serial dilutions were prepared in BHI broth and plated onto BHI agar. After aerobic incubation for 24–48 hours at 37°C, CFUs were counted, and CFU/mL was calculated. Experiments were performed in triplicate.

Evaluation of Residual Effect

To investigate the residual effect of the materials, procedures were performed according to Zhang et al (22). The materials (W- MTA; E-MTA; E- MTA+ 5% CaCl_2 ; and E-MTA+ 10% CaCl_2) were preincubated for 30 minutes and 24 hours as described above. Fresh distilled water (10 μ L) was placed in direct contact with the materials. After incubation for 1 hour at 37°C, 150 μ L of BHI broth was added to the wells. After mixing, 10 μ L of broth was transferred to 970 μ L of BHI broth to which a 20 μ L suspension of bacteria was added. As controls, the same amount of distilled water was placed on empty wells. Serial dilutions of test and control suspensions were processed for determination of CFU/mL. The tests were performed in triplicate. Viable counts of bacteria in controls were compared with those exposed to the material for each preincubation period; no difference in viable counts indicated the absence of residual effect.

Statistical analysis

The assumptions of equality variances and normal distribution of errors were checked for all the response variables tested, and those that did not suit were transformed. pH and calcium data were rank transformed and analysed using two-way repeated measures of variance (ANOVA) followed by Holm-Sidak method; CFU

data were $\log_{10}$ transformed and analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Holm-Sidak method. Statistical analysis was carried out using the SigmaStat® software package (Version 3.5 for Windows®, Systat Software Corporation, San Jose - CA, EUA). Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The analysis of pH and calcium ions release within time (from 3 hours to 30 days) showed that the cements used in this study presented a variation from alkaline to nearly neutral pH (**Table 2**) and were capable of releasing calcium ions along the 30 days of the study (**Table 3**). The addition of different concentrations of CaCl_2 did not considerably alter the pH when compared to the values found for W-MTA and E-MTA in all periods.

E-MTA showed a significant lower calcium ion release capacity when compared to W-MTA ($P < 0.05$). However, the addition of 5% CaCl_2 improved the capacity of calcium release of E-MTA, being these values similar to the results found for W-MTA ($P > 0.05$).

The results for the antibacterial activity of the different cements tested in this study against *E. faecalis* are shown on Table 4. At 30 min after manipulation all materials were 100% effective against *E. faecalis*. After 24h, W-MTA maintained the antibacterial activity, while a $\log_{10}$ reduction in the antibacterial activity was observed for E-MTA, with or without the addition of CaCl_2 . Residual effect was not observed for any of the materials.

DISCUSSION

The present study added the monomer Bis-EMA to MTA and investigated its influence on the pH, calcium ion release and antibacterial activity. Resinous MTA-based root-end materials have been developed in order to obtain a material that is easier to manipulate and insert in root-end cavities and also presents a shorter setting time. Studies have added monomers (TEDMA, HEMA, Bis-GMA) to calcium silicate retrograde filling cements (8) to improve their properties. The monomer Bis-EMA, which was used in the present study, is structurally analogous to Bis-GMA, but presents lower bulk viscosity, and therefore, minimize or eliminate the use of diluents.

Resinous experimental MTA-based materials have been compared to MTA with respect to the release of calcium and hydroxyl ions (23). In this study, although E-MTA showed lower pH than W-MTA in all periods, both materials presented a reduction from an initially alkaline to a nearly neutral pH along a 30 days period. Santos et al (24) found that MTA presented high pH within the first 24 hours, which decreased thereafter. On the other hand, Vivan et al (25) showed that both W-MTA and light-cured MTA maintained the alkaline pH stable through a 7 days period.

The pH values observed in this study were smaller than those obtained by Torabinejad et al (26). This is probably because the use of tubes in this experiment limited the contact surface to the surrounding water. Another factor to be considered is that the material was changed to a new flask with fresh deionized water at every evaluation period. However, the pH values obtained in the present study are in accordance with those of Tanomaru-Filho et al (23) and Massi et al (27), who used a similar methodology.

The E-MTA showed lower calcium release than W-MTA. The two materials displayed a higher ability of calcium ion release in the first 24h of the experiment, which may be attributed to the solubility of the material. Calcium reduction was observed in all groups from 7 to 30 days, probably due to the reduction of calcium concentration in the materials.

The small calcium ion release of the E-MTA might be a result of the cement being already set since the first immersion in water, therefore showing low solubility. Vivan et al (25) also showed that light-cured MTA has lower calcium ion release capacity than W-MTA. The low calcium release could reduce the ability of the

material to stimulate the mineralization, which is in accordance with Gomes-Filho et al (28), who found that light-cured MTA did not stimulate mineralization when implanted in subcutaneous tissue of rats.

The present study evaluated the influence of the addition of different concentrations of CaCl_2 on an experimental dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end filling material. The use of CaCl_2 in MTA based materials may favor calcium release, as shown by Tanomaru-Filho et al (23) and Bortoluzzi et al (12). The addition of 5% CaCl_2 increased the calcium release at a level similar to the results for W-MTA in all periods evaluated. The addition of higher concentrations of CaCl_2 dramatically increased the calcium release, surpassing the conventional MTA, especially after 7 days. However, further studies are necessary to investigate if higher concentrations of CaCl_2 would influence the solubility of the material.

CaCl_2 has a low pH (4.4), and has shown poor results when used alone for induction of calcified apical barriers in immature monkey teeth (29). However, when added to MTA and Portland cements, it was shown to stimulate tissue repair (30). Despite its low pH, the addition of different concentrations of CaCl_2 did not change significantly the pH of the E-MTA.

Antibacterial activity is an important property of root-end filling materials (31). Several studies evaluated the effect of MTA on microorganisms (32, 33), but these studies have conflicting results. In the present study, W-MTA and E-MTA, with or without CaCl_2 , were 100% effective against *E. faecalis* when tested 30 min after manipulation; W-MTA maintained this antibacterial effect after 24h; E-MTA showed a lower antibacterial activity after 24h, which was not influenced by the addition of CaCl_2 . Torabinejad et al (31) and Estrela et al (34) found that MTA was effective against some facultative microorganisms but not against *E. faecalis*. In other studies, it has been shown that MTA either delayed or inhibited the growth of *E. faecalis* (32, 33). Ribeiro et al (35) suggested that these variations might be due to the methodology used, such as aerobic and anaerobic incubations. It has been shown that MTA in an aerobic atmosphere, which was the case of the present study, could generate reactive oxygen species (ROS), which has antimicrobial activity.

In conclusion, the monomer Bis-EMA added to MTA in the present study formed a material with lower capacity of calcium release and lower antibacterial

activity than W-MTA, in spite of maintaining a similar pH. However, the addition of CaCl_2 improved the calcium release of this material. Therefore, despite the limitations of the study, it is possible to suggest that the addition of 5% CaCl_2 to a dual-cure Bis-EMA/MTA-based root-end material could be an alternative to approximate the characteristics of this material to W-MTA. Further studies are necessary to verify the biocompatibility, solubility, bioactivity, and setting time of these experimental materials.

References

1. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *Journal of endodontics* 2010;36(1):16-27.
2. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of endodontics* 2010;36(3):400-413.
3. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *Journal of endodontics* 2010;36(2):190-202.
4. Al-Hezaimi K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Comparison of antifungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. *Journal of endodontics* 2006;32(4):365-367.
5. Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of endosequence root repair material and proroot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2011;37(11):1542-1546.
6. Porter ML, Berto A, Primus CM, Watanabe I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. *Journal of endodontics* 2010;36(3):524-528.
7. Budig CG, Eleazer PD. In vitro comparison of the setting of dry ProRoot MTA by moisture absorbed through the root. *Journal of endodontics* 2008;34(6):712-714.
8. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ciapetti G, Prati C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2011;27(7):e134-157.
9. Zanchi CH, Munchow EA, Ogliari FA, Chersoni S, Prati C, Demarco FF, et al. Development of experimental HEMA-free three-step adhesive system. *Journal of dentistry* 2010;38(6):503-508.
10. Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2003;95(3):345-347.
11. Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *Journal of endodontics* 2006;32(3):198-201.
12. Antunes Bortoluzzi E, Juarez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi AC, Monteiro Bramante C. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *Journal of endodontics* 2006;32(12):1194-1197.
13. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *Journal of endodontics* 2009;35(4):550-554.
14. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *Journal of endodontics* 2006;32(9):897-900.
15. Hong ST, Bae KS, Baek SH, Kum KY, Lee W. Microleakage of accelerated mineral trioxide aggregate and Portland cement in an in vitro apexification model. *Journal of endodontics* 2008;34(1):56-58.
16. Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009;107(5):739-744.
17. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *Journal of endodontics* 2006;32(6):569-572.
18. McNamara RP, Henry MA, Schindler WG, Hargreaves KM. Biocompatibility of accelerated mineral trioxide aggregate in a rat model. *Journal of endodontics* 2010;36(11):1851-1855.
19. Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Journal of endodontics* 2007;33(10):1235-1238.
20. Miyazaki T, Imamura M, Ishida E, Ashizuka M, Ohtsuki C. Apatite formation abilities and mechanical properties of hydroxyethylmethacrylate-based organic-inorganic hybrids incorporated with sulfonic groups and calcium ions. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2009;20(1):157-161.
21. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics & dental traumatology* 1996;12(4):179-184.

22. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2009;35(7):1051-1055.
23. Tanomaru-Filho M, Chaves Faleiros FB, Sacaki JN, Hungaro Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics* 2009;35(10):1418-1421.
24. Santos AD, Moraes JC, Araujo EB, Yukimitu K, Valerio Filho WV. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. *International endodontic journal* 2005;38(7):443-447.
25. 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 surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2010;110(2):250-256.
26. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics* 1995;21(7):349-353.
27. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA, et al. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *Journal of endodontics* 2011;37(6):844-846.
28. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabe PF, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Junior E, et al. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *Journal of endodontics* 2008;34(1):62-65.
29. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *Journal of endodontics* 2005;31(8):605-607.
30. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2003;95(4):483-489.
31. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *Journal of endodontics* 1995;21(8):403-406.
32. Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Antibacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. *Journal of endodontics* 2006;32(11):1053-1056.
33. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics* 2004;30(6):429-431.
34. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Brazilian dental journal* 2000;11(1):3-9.
35. Ribeiro CS, Scelza MF, Hirata Junior R, Buarque de Oliveira LM. The antimicrobial activity of gray-colored mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2010;109(6):e109-112.

Table 1. Composition of materials used in the study.

Materials	Composition	Type of cure	Proportion
E-MTA	Paste 1: MTA, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, camphorquinone, DHEPT, EDAB; Paste 2: Ytterbium Fluoride, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, benzoyl peroxide	Dual-cure	1:1
E-MTA + CaCl ₂	Paste 1: MTA, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, camphorquinone, DHEPT, EDAB; calcium chloride Paste 2: Ytterbium Fluoride, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, benzoyl peroxide	Dual-cure	1:1
W-MTA	Powder: Bl ₂ O ₃ , CaO, MgO, K ₂ O, Na ₂ O, Fe ₂ O ₃ , SO ₃ , SiO ₂ , Al ₂ O ₃ ; Liquid: distilled water	Chemical	3:1

MTA, mineral trioxide aggregate; DHEPT-N, N-dihydroxyetil-p-toluidine; EDAB ethyl-4-dimethylamino benzoate, Bis-EMA, ethoxylated bisphenol A glycol dimethacrylate; SiO₂, silicon oxide; Al₂O₃, aluminum oxid; CaCl₂, calcium chloride Bl₂O₃ dioxide-bismuth; CaO, calcium oxide;

Table 2. Values of pH (mean±standard deviation, n = 5 for each material) of soaking water after immersion of the cements for different times.

Materials	W-MTA	E-MTA	E-MTA+5%CaCl ₂	E-MTA+10%CaCl ₂	E-MTA+15%CaCl ₂
3h	9.92(±0.26)aA	9.32(±0.27)abA	8.31(±0.52)bA	8.78(±0.57)abA	8.34(±0.70)bA
24h	10.06(±0.55)aA	7.86(±0.78)bB	6.48(±0.07)dC	6.75(±0.22)cdBC	7.01(±0.08)cC
7d	7.02(±0.14)bC	6.25(±0.20)cE	6.22(±0.18)cC	6.94(±.25)bB	7.48(±0.41)aB
15d	8.05(±0.67)aB	6.63(±0.13)cD	6.94(±0.10)bB	6.29(±0.25)cD	6.48(±0.21)cD
30d	7.78(±0.13)aB	7.04(±0.20)bC	6.30(±0.23)cC	6.58(±0.16)cCD	6.62(±0.21)cD

Different lowercase letters indicate significant differences between groups. Different uppercase letters indicate significant differences between times (P≤ .05)

Table 3. Calcium released (mean±standard deviation, expressed as ppm, n = 5 for each material) in soaking water after immersion of the samples for different times.

Materials	W-MTA	E-MTA	E-MTA+5%CaCl ₂	E-MTA+10%CaCl ₂	E-MTA+15%CaCl ₂
3h	9.97(±3.08) acAC	6.67(±1.99)bcA	9.43(±0.51)acA	22.16(±4.49)aA	24.95(±5.29)aA
24h	12.25(±2.03) acA	5.87(±1.45)bA	8.89(±4.99)bcAB	17.06(±7.41)acAB	26.37(±7.76)aA
7d	5.43(±1.20) bB	1.67(±0.47) cC	7.92(±6.24)bBC	35.62(±15.71)aA	69.27(±13.85)aA
15d	5.81(±0.80)bB	3.18(±0.76)cB	6.61(±2.76)bBC	9.29(±1.13)aAB	10.04(±9.48)abB
30d	6.54(±1.66)abBC	2.79(±0.82)cB	5.17(±0.74)bC	8.91(±3.54)aB	11.08(±10.40)abB

Different lowercase letters indicate significant differences between groups. Different uppercase letters indicate significant differences between times (P≤ .05)

Table 4. Mean (±standard deviation) Log₁₀ Reduction in Viable Counts of *E. faecalis* Strains after Exposure to W-MTA, E-MTA, E-MTA + 5%CaCl₂ and E-MTA +10%CaCl₂

	30min	24hr
W-MTA	0(±0)aA	0(±0)aA
E-MTA	0(±0)aA	2.96 (±0.24)bB
E-MTA +5%CaCl ₂	0(±0)aA	0.66(±1.15)bA
E-MTA+10%CaCl ₂	0(±0)aA	3.46(±0.28)bB

Lowercase compare differences between columns and capital letters between lines (P≤ .05)

4 Conclusões

O monômero Bis-EMA adicionado a MTA neste estudo formou um material com baixa capacidade de liberação de cálcio e menor atividade antibacteriana do que o MTA-B, apesar de manter um pH semelhante. No entanto, a adição de cloreto de cálcio melhorou a liberação de cálcio do presente material. Portanto, apesar das limitações do estudo, é possível sugerir que a adição de 5% de cloreto de cálcio a um material retrobturador de polimerização dual à base de Bis-EMA/MTA pode ser uma alternativa para aproximar as características deste material as do MTA-B. Mais estudos são necessários para verificar a biocompatibilidade, a solubilidade, a bioatividade e o tempo de presa desses materiais experimentais.

Referências

BOGEN, G.; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 6, p. 777-790, 2009.

BOZEMAN, T.B.; LEMON, R.R.; ELEAZER, P.D. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 5, p. 425-8, 2006.

CAMILERRI J.; MONTESI F.E.; DISILVIO L.; PITT FORD T.R. The chemical constitution and biocompatibility of accelerat (accelerate?) Portland cement for the use. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 11, p. 834-842, 2005.

DUARTE, M.A.; DEMARCHI, A.C.; YAMASHITA, J.C.; KUGA, M.C.; FRAGA SDE, C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 95, n. 3, p. 345-47, 2003.

ELDENIZ, A. U.; HADIMLI, H. H.; ATAOGU, H.; ØRSTAVIK, D. Antibacterial Effect of Selected Root-End Filling Materials. **Journal of Endodontics**. v. 32, n. 4, p. 345-49, 2006.

GANDOLFI, M.G.; TADDEI, P.; TINTI, A.; PRATI, C. Apatite-forming ability of ProRoot MTA. **International Endodontic Journal**. v. 43, n. 10, p. 917–29, 2010a.

GANDOLFI, M.G.; CIAPETTI, G.; TADDEI, P.; PERUT, F.; TINTI, A.; CARDOSO, M. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. **Dental Materials**. v. 26, n. 10, p. 974–92, 2010b.

GANDOLFI, M.G.; TADDEI, P.; SIBONI, F.; MODENA, E.; CIAPETTI, G.; PRATI, C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. **Dental Materials**, v. 27, n. 7, p. 134-57, 2011.

GOMES-FILHO, J.E.; FARIA, M.D.; BERNABÉ, P.F.; NERY, M.J.; OTOBONI-FILHO, J.A.; DEZAN-JUNIOR, E.; MORAES COSTA, M.M.; CANNON, M. Mineral trioxide

aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. **International Endodontic Journal**. v. 34, n. 1, p. 62-55, 2008.

GOMES-FILHO, J.E.; RODRIGUEZ, G.; WATANABE, S.; ESTRADA BERNABE, P.F.; LODI, C.S.; GOMES, A.C. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. **Journal of Endodontics**. v. 35, n. 10, p. 1377-80, 2009.

GOMES-FILHO, J.E.; DE MORAES COSTA, M.M.; CINTRA L.T.; DUARTE, P.C.; TAKAMIYA, A.S.; LODI, C.S.; BERNABÉ, P. F. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 2, p. 250-54, 2011.

HAUMAN, C.H.; LOVE, R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 2, p.75-85, 2003.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; OTOBONI FILHO, J.A.; BERNABÉ P.F.; DEZAN JÚNIOR, E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. **Brazilian Dental Journal**, v.12, n. 1, p. 3-8, 2001.

HOLLAND, R. Agregado trióxido mineral(MTA): Composição, mecanismo de ação, comportamento biológico e emprego clínico. **Ciência Odontologia**, n. 5, p 7-21, 2002.

YALTIRIK, M.; OZBAS H.; BILGIC B.; ISSEVER H. Reaction of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **Journal of Endodontics**, v. 30, p.95-99, 2004.

KAKEHASHI, S.; STANLEY H.R.; FITZGERALD R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 20, p. 340-9, 1965.

LEONARDO, M. R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos**. 1ª ed. São Paulo, Artes Médicas, p.1241-1244, 2008.

MORGENTAL, R.D.;VIER-PELISSER, F.V.; OLIVEIRA, S.D.; ANTUNES, F.C.; COGO, D.M. & KOPPER, P.M. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 12, p. 1128-33, 2011.

OGLIARI, F.A.; ELY, C.; ZANCHI, C.H.; FORTES, C.B.; SAMUEL, S.M.; DEMARCO, F.F.; PETZOLD, C.L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, v. 24, n. 2, p. 165-71, 2008.

OKABE, T., SAKAMOTO, M.; TAKEUCHI, H.; MATSUSHIMA, K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**. v. 32, n. 3, p. 198-201, 2006.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a Comprehensive Literature Review part I: Chemical, Physical and Antibacterial properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 16-27, 2010a.

PARIROKH M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part III: Clinical applications,drawbacks, and mechanism of action. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 400-13, 2010b.

PINTADO, Laura Siqueira. **Citotoxicidade, genotoxicidade e propriedades físico-mecânicas de um cimento experimental à base de MTA**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração Dentística). - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PORTER, M.L.; BERTO, A.; PRIMUS C.M.; WATANABE, I. physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 524–8, 2010.

RIBEIRO, D.A. Do endodontic compounds induce genetic damage? a comprehensive review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 105, n. 2, p. 251–6, 2008.

SÁNCHEZ, A.; F.Y.; ÁNEZ, BERROCAL, M.I.L.; GONZALEZ, J.M.M. Metaanalysis of filler materials in periapical surgery. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal** v. 3, n.13, p. 180-85, 2008.

SANTOS, A.D.; MORAES, J.C.; ARAUJO, E.B.; YUKIMITU, K.; VALERIO FILHO W.V. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 7, p.443-7, 2005.

Site: Angelus®. Disponível em:

<http://www.angelus.ind.br/pt/cimentos_endodonticos/mta/DuvidasFrequentes.asp

≥Acesso em: :07 jun. 2010, 17:40:20

STANLEY, H.R. Pulp capping: conserving the dental pulp—can it be done? Is it worth it? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 68, n. 5, p. 628-39, 1989.

STOWE T.J.; SEDGLEY, C.M.; STOWE, B.; FENNO, J.C. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 6, p. 429-431, 2004.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; MCDONALD, F.; PITT FORD, T.R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 7, p. 349-53, 1995a.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; PITT FORD, T.R.; KETTERING, J.D. Antibacterial effects of some root end filling materials. **Journal of Endodontics**. v. 21, n. 8, p. 403–6, 1995b.

TORABINEJAD, M.; PITT FORD, T.R. Root end filling materials: a review. **Endodontics Dental Traumatology**, v. 12, n. 4, p. 161–78, 1996.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part II: leakage and biocompatibility investigations. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 190-202, 2010.

VIVAN, Rodrigo Ricci. **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas de alguns materiais retrobturadores**. 2009, 166f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em endodontia), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIVAN R.R.; ZAPATA, R.O.; ZEFERINO, M.A.; BRAMANTE, C.M.; BERNARDINELI, N.; GARCIA, R.B.; DUARTE, M.A.H.; FILHO, M.T.; MORAES, I.G. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. v. 110, n. 2, p. 250-6, 2010.

WEISS, E.I.; SHALHAV, M.; FUSS, Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. **Endodontic Dental Traumatology**. v.12, n, 4, p.179-184, 1996.