## **CECI NUNES CARVALHO**

Efeito da adição de partículas de vidro niobofosfato bioativo à guta-percha: Desenvolvimento, caracterização, resistência de união à dentina e influência na formação de biofilmes microbianos

> São Paulo 2014

## **CECI NUNES CARVALHO**

# Efeito da adição de partículas de vidro niobofosfato bioativo à guta-percha: Desenvolvimento, caracterização, resistência de união à dentina e influência na formação de biofilmes microbianos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

São Paulo 2014 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Carvalho, Ceci Nunes.

Efeito da adição de partículas de vidro niobofosfato bioativo à guta-percha: desenvolvimento, caracterização, resistência de união à dentina e influência na formação de biofilmes microbianos / Ceci Nunes Carvalho; orientador Giulio Gavini. -- São Paulo, 2014.

77 p. : il. : tab., fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Materiais obturadores do canal radicular. 2. Guta-percha. 3. Nióbio - Odontologia. 4. Resistência de União - Odontologia. 5. Endodontia. I. Gavini, Giulio. II. Título.

Carvalho CN. Efeito da adição de partículas de vidro niobofosfato bioativo à gutapercha: Desenvolvimento, caracterização, resistência de união à dentina e influência na formação de biofilmes microbianos. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

| São Paulo,//2014 | L.                |  |
|------------------|-------------------|--|
|                  | Banca Examinadora |  |
| Prof(a). Dr(a)   |                   |  |
| Instituição:     | Julgamento:       |  |
| Prof(a) Dr(a)    |                   |  |
| Instituição:     | Julgamento:       |  |
|                  |                   |  |
| Prof(a). Dr(a)   |                   |  |
| Instituição:     | Julgamento:       |  |
|                  |                   |  |
| Prof(a). Dr(a)   |                   |  |
| Instituição:     | Julgamento:       |  |
| Prof(a). Dr(a).  |                   |  |
| Instituicão:     | Julgamento:       |  |

"Sua visão se tornará clara somente quando você puder olhar para o seu próprio coração. Quem olha pra fora, sonha. Quem olha pra dentro, desperta."

Carl Gustav Jung

### Aos meus pais, Sonia e Carlos

Meus exemplos de vida, de amor, de coragem, de simplicidade, de honestidade, de trabalho, de família! Hoje colho bons frutos por causa de vocês! Vocês são meu orgulho, inspiração e a maior riqueza da vida!

> Eu apenas queria que você soubesse Que aquela alegria ainda está comigo E que a minha ternura não ficou na estrada Não ficou no tempo presa na poeira

Eu apenas queria que você soubesse Que esta menina hoje é uma mulher E que esta mulher é uma menina Que colheu seu fruto flor do seu carinho

Eu apenas queria que você soubesse Que essa criança brinca nesta roda E não teme o corte das novas feridas Pois tem a saúde que aprendeu com a vida...

Gonzaguinha

Ao Zero, pelo amor, incentivo e cumplicidade!

Agora é só eu e você, juntos na mesma estrada Atravessando a madrugada pra ver o sol nascer E em nossa aurora perceber, a delícia de viver Tudo que a gente sempre quis, olhar nos olhos de alguém E conseguir dizer, Estou feliz! Paulinho Moska

Aos meus irmãos Alexandre, Tatiana e André por sempre torcerem por mim. Sei que posso contar com vocês.

Aos meus sobrinhos Lucca, Matheus e Thiago, por adicionar tanta alegria e amor em nossas vidas.

Agradeço à Deus pelo presente de tê-los todos os dias sempre ao meu lado!

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

## Aos meus orientadores, Giulio Gavini e José Roberto Martinelli,

Não posso descrever a minha gratidão por tudo que fizeram por mim. Cada um com um jeito diferente de ensinar e orientar, mas ambos igualmente gentis, pacientes, dedicados, incentivadores, demonstrando sempre competência e amor pelo que fazem, sem nunca perderem a simplicidade e humildade. Minha admiração e respeito por vocês serão eternos. Muito obrigada!

Ao meu querido e saudoso orientador Antonio Carlos Bombana, levarei seu exemplo comigo por toda a minha vida.

"Existem várias maneiras de aprender as coisas. A mais convencional delas é a do discurso pedagógico, da fala organizada que pretende nos ensinar o que precisamos saber. Mas aquela que nos marca de modo mais profundo e duradouro é sempre a da observação do gesto do outro, o exemplo do qual somos testemunhas e cujo significado reconhecemos visceralmente".

(Carlos Diegues)

## AGRADECIMENTOS

Aos professores da University of British Columbia (UBC), Prof. Markus Haapasalo e Ya Shen, pela atenção, gentileza e por todos ensinamentos. Muito obrigada! Foi uma experiência única poder trabalhar com pessoas tão competentes.

Aos professores da UBC, Ricardo Marins de Carvalho e Adriana Manso. Toda essa experiência de poder fazer o doutorado sanduiche na UBC teve início e aconteceu com tanta facilidade por causa de vocês. Me apaixonei desde o primeiro momento por esse lugar principalmente por que vocês nos acolhereram e receberam com tanto carinho desde o primeiro dia. Espero um dia poder retribuir tudo isso. Muito obrigada!

À minha querida amiga e exemplo Vivian Bradaschia-Correa e professor Victor Arana Chavez. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho. Desde o primeiro momento, se mostraram tão interessados e prestativos, mesmo sendo tão ocupados. Espero que possamos colher bons frutos em breve!

Aos colegas Zhe Jun Wang e Tianfeng Du. Obrigada por me ensinarem tantas coisas, muito além das pesquisas. Aprendi a respeitar mais as diferenças e encontrar doçura e amizade onde jamais achei que pudesse encontrar. Vocês são especiais!

À querida Fernanda Pappen, apesar do pouco tempo que trabalhamos juntas na UBC, ouvir seus conselhos e aprender com você foi muito bom! Muito obrigada!

Aos pós-graduandos do Ipen, Heveline, José Mário, especialmente Eraldo e Juliana por toda a ajuda e paciência com a fabricação e análise do vidro. Vocês foram fundamentais nessa pesquisa, e sou muito grata por tudo!

Ao Marcelo Carbonari, que me ajudou a iniciar esse trabalho junto com o professor Martinelli, dando idéias e contribuindo imensamente pra que o projeto saísse do papel. Muito obrigada! Aos professores do Ipen, Luis Gallego, Nelson, Rene e Cebolinha, por toda a ajuda e paciência nas análises do vidro e do compósito.

Ao querido amigo Diego Ardenghi. Muito obrigada pela sua amizade. Foi muito bom conviver esse ano com você, sabendo que tínhamos sempre um ombro amigo pra contar. Sentirei saudades! Você estará sempre em nossos corações, e nossa casa será sempre sua também em qualquer lugar do mundo.

Ao Hugo Vidotti, muito obrigada por sempre me ajudar em tudo que precisei, sempre com tanta boa vontade e desprendimento! Obrigada mesmo!

Ao Marcos Daniel Lanza por toda a ajuda no lab e FTIR.

Ao amigo Alexandre Pinheiro Lima de Carvalho, sempre tão prestativo. Você me ajudou muito nesse trabalho, sempre serei grata por tudo!

Às meninas lindas da LBO. Sempre prestativas e divertidas.

Ao amigo André de Vito, pela ajuda na parte experimental do trabalho e pela amizade.

Ao técnico do departamento de Materiais Dentários Antonio Lascala, sempre me ajudando quando preciso, desde os tempos da iniciação científica! Muito obrigada por tudo!

À professora Ericka Pinheiro, pela ajuda no projeto inicial que foi enviado a FAPESP para o doutorado sanduíche. Muito obrigada pela ajuda!

Ao professor do Departamento de Materiais Dentários, Roberto Braga, pela atenção e auxílio no uso da Lupa Estereoscópica.

À minha querida amiga e dupla dinâmica Laila! Obrigada por sempre poder contar com você.

À todos meus colegas de pós-graduação, em especial Laila, Alê, George, Simony, Elaine e Vitor pelo convívio e amizade.

À Soninha e Selma, sempre prontas para ajudar com tanta boa vontade e doçura. Obrigada queridas!

Aos técnicos da oficina da Física, Alex e Marcos. Muito obrigada pela gentileza e pela rapidez na confecção dos dispositivos que solicitei.

À Odous de Deus, pela doação da guta-percha e auxílio na produção do compósito usado nesse estudo, especialmente o Sr. Cláudio Luiz Gonzaga, pela presteza e gentileza.

À Companhia Brasileira de Mineração e Metalurgia, pela doação do óxido de nióbio usado nesse estudo.

Às queridas amigas da biblioteca Rita Diná e Solange Franco. Jamais esquecerei de vocês.

À todos os meus amigos da Turma 94 da FOUSP!

À Rosinha do departamento de Materiais Dentários que sempre me recebeu tão bem. Obrigada pela sua amizade!

À Glauci pela paciência, eficiência e simpatia na ajuda com a formatação deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por 13 anos maravilhosos.

À FAPESP processos 2011/51608-0 e 2012/18220-4 pelo Auxílio Financeiro

#### RESUMO

Carvalho CN. Efeito da adição de partículas de vidro niobofosfato bioativo à gutapercha: Desenvolvimento, caracterização, resistência de união à dentina e influência na formação de biofilmes microbianos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Os objetivos deste estudo foram desenvolver e caracterizar um compósito para obturação endodôntica à base de guta-percha e vidro niobofosfato. Foi avaliado a resistência de união à dentina radicular do compósito experimental, da guta EndoSequence BC, ambos sem o uso de cimento além do cimento AH Plus associado a guta-percha através do ensaio de µpush-out. A análise dos padrões de fratura foi realizada com auxílio de MEV. Análises usando EDX and MEV-EDS foram realizadas para verificar a composição e distribuição das partículas de vidro na superfície e no interior da matriz de guta-percha dos materiais testados. Os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e Tukey, sendo considerado significante quando p < 0,05. Foi avaliado também a influência do compósito experimental, do vidro niobofosfatos bioativo, diferentes tipos de gutapercha e hidroxiapatita na adesão e formação de biofilme por bactérias orais com coloração Live/dead usando um microscópio confocal à laser. O biofilme multiespécies foi formado na superfície de discos de hidroxiapatita - HA, vidro niobofosfato - VNB, guta-percha Obtura - OBT, guta-percha Protaper - PTP, EndoSequence BC guta-percha - GBC e o compósito experimental guta-percha associado com o vidro niobofosfato - GNB. O biovolume total (mm<sup>3</sup>), biovolume de bacterias viáveis (mm<sup>3</sup>), e porcentagem de bactérias viáveis (%) foram quantificados. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando ANOVA de dois fatores e teste de Tukey para contraste de médias ( $\alpha$ =0,05). Os materiais testados foram imersos em PBS e o pH das soluções foi avaliado. Os materiais foram imersos em água deionizada e as soluções foram analisadas em ICP-OES (Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente) para determinar a liberação de diferentes elementos químicos. AH Plus e o material experimental não mostraram diferença estatística significante na resistência de união à dentina (2,83 MPa e 2,68 MPa respectivamente). Já o material Guta EndoSequence BC apresentou o menor valor de resistência de união (1,34 MPa) com diferença estatística significante em comparação aos demais grupos (p < 0,05). Os grupos GNB, GBC e VNB apresentaram os menores valores de biovolume total em 30 dias. Os maiores valores de biovolume viável em 30 dias de incubação em ordem decrescente foram: HA; PTP e OBT; GBC e VNB e finalmente GNB. Com relação a porcentagem de biovolume viável o material experimental GNB apresentou os menores valores para 3 e 30 dias enquanto o VNB apresentou o menor valor para 14 dias com diferença estatisticamente significante em relação aos demais grupos (p < 0,05). O material experimental GNB apresentou o maior valor de pH após 30 dias de imersão em PBS e maior liberação de Zn em todos os períodos analisados quando comparado aos demais grupos e maior liberação de Ca aos 14 e 30 dias semelhante ao grupo GBC, o qual liberou mais Si comparado aos demais grupos nos períodos de 14 e 30 dias. O material obturador experimental mostrou habilidade em aderir à dentina radicular de maneira similar à obturação convencional com guta-percha e cimento (Ah Plus) e foi capaz de inibir a formação de biofilme microbianos quando comparado a HA e guta-percha convencionais.

Palavras-chave: Guta-percha; Nióbio; Vidro Fosfato; Obturação; Push-out; Resistência de união.

## ABSTRACT

Carvalho CN. Effect of the addition of the niobophosphate bioactive glass in the gutta-percha: Development, characterization, bond strength to dentin and influence on biofilm formation [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

The objectives of this study were to develop and characterize a composite for endodontic obturation based gutta-percha and niobium phosphate glass. The study evaluated the composite's micropush-out bond strength to root dentine of the experimental gutta-percha and niobium phosphate glass composite applied with thermoplastic technique to the root canals without sealer in a moist environment and compare to the conventional root canal obturation Ah Plus and gutta-percha, and a commercial bioceramic gutta without sealer. Additionally, the cores materials were characterized using Scanning Electron Microscopic/Energy-dispersive X-ray (SEM/EDS) and Energy Dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDX) analysis. The failure mode was analyzed with SEM. Analysis using EDX and SEM-EDS was carried out to verify the composition and distribution of the particles of the tested materials. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test (p < 0.05). Also was analysed the influence of different types of gutta-percha and bioactive niobium phosphate glass on the adherence and biofilm formation by oral bacteria from human dental plaque with Live/dead staining assay using confocal laser scanning microscopy (CLSM). The multispecies biofilm was grown from plaque bacteria on discs of hydroxyapatite - HA, niobium phosphate bioactive glass- VNB, Obtura pellets - OBT, Protaper gutta-percha - PTP, EndoSequence BC gutta-percha - GBC and gutta-percha associated with niobium phosphate glass - GNB in brain-heart infusion broth for 3,14 and 30 days. After the growth induction periods, specimens were stained by using Live/Dead, and the images were analyzed under a CLSM. The total biovolume (mm<sup>3</sup>), viable biovolume (mm<sup>3</sup>), and Live percentage (%) were quantified. Biofilm structure was visualized by scanning electron microscopy (SEM). The materials were immersed in phosphate-buffered saline (PBS) and the pH in the solutions was monitored. The materials were also

immersed in deionized water and the solutions were analyzed with ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - optical emission spectrometry) to determine elemental release. AH Plus and GNB groups showed bond strengths of 2,83 MPa and 2,68 MPa respectively, with no statistically significant difference between them (p > 0.05). GBC group had the lowest bond strength average (1.34 MPa), which was a statistically significant difference compared to the other groups (p < 0.05). Groups GBC, GNB and VNB presented the lowest total biovolume values in 30 days. The highest viable biovolume values in 30 days of incubation, in decreasing order, were as follows: HA; PTP and OBT; GBC and VNB and finally GNB. As regards live percentage, the experimental material GNB presented the lowest values at 3 and 30 days, while VNB presented the lowest value at 14 days, with statistically significant difference in comparison with the other groups (P < 0.05). The experimental material GNB presented the highest pH value after 30 days of immersion in PBS, and greatest Zn release in all the time intervals analyzed when compared with the other groups; and the greatest Ca release at 14 and 30 days, similar to Group GBC, which released a larger quantity of Si when compared with the other groups in the time intervals of 14 and 30 days. The experimental root filling composite (GNB) showed an ability to adhere to root dentine equal to the current gold standard root filling with gutta-percha and sealer (Ah Plus) and was able to inhibit the formation of microbial biofilm when compared to HA and conventional gutta-percha.

Keywords: Gutta-percha; Niobium; Phosphate glass; Obturation; Push-out bond strength.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Distribuição granulométrica do pó de vidro niobofosfato......45

- Figura 5.2 Micrografia da superfície dentinária após o teste micropush-out: Barra = 10μ A: Ah Plus cobrindo parcialmente os túbulos dentinários; B: GBC cobrindo parcialmente a dentina e entrando em alguns túbulos dentinários; C: dentina completamente coberto com GNB e presença de um precipitado. D-F Micrografia das superfícies de guta-percha D: Protaper mostrou uma superfície sem partículas. E: Em GBC nota-se a presença de partículas de vários tamanhos e formato irregulares. F: GNB. revelou a presença de partículas menores quando comparadas a GBC. G-H Micrografias de GBC (L) e GNB (H) e os espectros de EDS correspondente na superfície (S) e no interior (B) dos materiais. GB-GS: Ca foi detectado apenas na superfície (GS), indicando que havia apenas uma camada de partículas de biocerâmica no GBC. HB-SH: foram detectadas partículas de vidro tanto na superfície quanto no interior da GNB.

# LISTA DE TABELAS

| Tabela 4.1 - | Matéria-prima dos componentes químicos usados para a fabricação do vidro niobofosfato                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabela 4.2 - | Composição nominal do vidro32                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Tabela 5.1 - | Análise EDX dos diferentes tipos de guta-percha usados neste<br>estudo e do vidro isoladamente em porcentagem em peso dos<br>elementos constitutivos. Médias e desvio padrão dos valores de<br>resistência de união (MPa) dos grupos experimentais testados e<br>classificação do modo de fratura (%) |
| Tabela 5.2 - | Maior, menor e média dos valores de biovolume total (µm3) em 3, 14<br>e 30 dias51                                                                                                                                                                                                                     |
| Tabela 5.3 - | Menor, maior e média dos valores de biovolume viável (µm3) em 3,<br>14 e 30 dias                                                                                                                                                                                                                      |
| Tabela 5.4 - | Menor, maior e média dos valores de porcentagem (%) de biofilme viável em 3, 14 e 30 dias53                                                                                                                                                                                                           |
| Tabela 5.5 - | Valores de pHs encontrados nos diferentes tempos experimentais55                                                                                                                                                                                                                                      |
| Tabela 5.6 - | Análise EDX dos diferentes tipos de guta-percha usados neste<br>estudo e do vidro isoladamente em porcentagem em peso dos<br>elementos constitutivos                                                                                                                                                  |
| Tabela 5.7 - | Liberação de cálcio (mg/L) observada em diferentes períodos58                                                                                                                                                                                                                                         |
| Tabela 5.8 - | Liberação de sódio (mg/L) observada em diferentes períodos59                                                                                                                                                                                                                                          |
| Tabela 5.9 - | Liberação de fósforo (mg/L) observada em diferentes períodos59                                                                                                                                                                                                                                        |

Tabela 5.10 - Liberação de zinco (mg/L) observada em diferentes períodos......60

Tabela 5.11 - Liberação de sílica (mg/L) observada em diferentes períodos ......60

# SUMÁRIO

| 1 INTRODUÇÃO                                                              | 20 |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2 REVISÃO DA LITERATURA                                                   | 22 |
| 3 PROPOSIÇÃO                                                              | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS                                                      | 31 |
| 4.1 Preparação e caracterização do compósito experimental                 | 31 |
| 4.1.2 Preparo do biovidro niobofosfato                                    | 31 |
| 4.1.3 Preparo do compósito guta-percha associado ao vidroniobofosfato     | 33 |
| 4.2 Experimento 1                                                         | 33 |
| 4.2.1 Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva   |    |
| (EDX)                                                                     | 33 |
| 4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura/ Espectroscopia de energia      |    |
| dispersiva (MEV/EDS)                                                      | 34 |
| 4.2.3 Preparação do fluido corporal simulado (SBF)                        | 34 |
| 4.2.4 Seleção dos espécimes para os ensaios in vitro.                     | 35 |
| 4.2.5 Preparo dos dentes                                                  | 36 |
| 4.2.6 Delineamento experimental.                                          | 37 |
| 4.2.7 Resistência de união à dentina (RU).                                | 38 |
| 4.2.8 Análise do tipo de fratura.                                         | 39 |
| 4.2.9 Forma de análise dos resultados.                                    | 40 |
| 4.3 Experimento 2                                                         | 40 |
| 4.3.1 Efeito do compósito e do vidro niobofosfato bioativo na formação de |    |
| biofilmes microbianos.                                                    | 40 |
| 4.3.2 Preparo dos discos.                                                 | 40 |
| 4.3.3 Formação do biofilme                                                | 41 |
| 4.3.4 Forma de análise dos resultados.                                    | 42 |
| 4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)                           | 43 |
| 4.3.6 Liberação de íons                                                   | 43 |
| 4.3.7 Indução de pH                                                       | 44 |
| 4.3.8 Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva   |    |
| (EDX)                                                                     | 44 |

| 5 RESULTADOS                                                         | 45         |
|----------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1 Caracterização do vidro niobofosfato                             | 45         |
| 5.1.2 Caracterização do vidro niobofosfato associado a guta-percha   | 46         |
| 5.2 Resistência de união à dentina                                   | 46         |
| 5.3 Efeito do compósito e do vidro niobofosfato bioativo na formaçã  | o de       |
| biofilmes microbianos                                                | 49         |
| 5.4 Indução de pH                                                    | 55         |
| 5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)                        | 55         |
| 5.6 Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiv | <i>i</i> a |
| (EDX)                                                                | 56         |
| 5.7 Análise da Liberação de íons                                     | 57         |
| 6 DISCUSSÃO                                                          | 61         |
| 6.1 Experimento 1                                                    | 61         |
| 6.2 Experimento 2                                                    | 64         |
| 7 CONCLUSÕES                                                         | 68         |
| REFERÊNCIAS                                                          | 69         |
| ANEXO                                                                | 77         |

## 1 INTRODUÇÃO

A fase de obturação do canal radicular é de extrema importância para o sucesso da terapia endodôntica. Por esse motivo, inúmeros estudos no sentido de aperfeiçoar a técnica, avaliar procedimentos e materiais têm tido oportunidade objetivando propiciar a máxima impermeabilização possível ao sistema de canais radiculares. A obturação endodôntica, além de selar o sistema de forma extremamente eficiente não deve interferir e, de preferência estimular o reparo apical e periapical subsequente ao tratamento.

Os materiais obturadores devem possuir uma série de características físicas e químicas, tais como: ser radiopaco; possuir capacidade em adaptar-se às paredes do canal; ser insolúvel nos fluidos teciduais; não manchar as estruturas dentárias; não contrair; ser solúvel em solventes comuns em Endodontia, portanto, removível; e, não favorecer o crescimento bacteriano.

O mercado odontológico atual disponibiliza grande quantidade de cimentos para utilização em obturações endodônticas associado à guta-percha, no entanto, esses cimentos ainda não preenchem todos os requisitos para um selamento realmente eficiente, prevenindo tanto a infiltração apical quanto coronária. Alguns pesquisadores tem buscado nos biomateriais algo que possa desempenhar um papel eficaz, inibindo ou eliminando bactérias residuais, prevenindo a re-contaminação com um selamento adequado e facilitando a reparação periapical.

A obturação endodôntica tradicional com guta-percha e cimento pode ser considerada como um sistema de monobloco secundário, entretanto, um cimento obturador convencional não adere idealmente à dentina e a guta-percha e esse sistema não se comporta mecanicamente como uma unidade homogênea em relação à dentina radicular. Dessa forma, a busca por um verdadeiro monobloco que reforça o canal radicular pode se visto como um ideal a ser alcançado.

Recentemente, tem-se aumentado o interesse em novos materiais restauradores bioativos com capacidade de induzir a remineralização dentinária através da liberação de diferentes íons. Vidros bioativos associados com poliisopreno, policaprolactano ou guta-percha foram apresentados como uma

alternativa ao preencher o canal radicular de forma efetiva, mesmo em ambiente de umidade, sem o uso de qualquer cimento. Esses novos compósitos geralmente contém vidros bioativos 45S5 capazes de liberar espécies iônicas e formar um precipitado, a hidroxiapatita, prometendo uma melhora no selamento.

Os vidros bioativos 45S5 vêm encontrando grande espaço em aplicações como biomateriais pois sua estrutura é mais próxima da parte mineral dos tecidos ósseos e dentina. Uma das desvantagens desses vidros é a baixa durabilidade química, entretanto, essa durabilidade pode ser melhorada com a adição do óxido de nióbio, que, além de ser biocompatível, pode aumentar a radiopacidade e microdureza quando esses vidros são incorporados a cimentos endodônticos ou adesivos dentinários.

Atualmente, não há um material de uso único para obturação endodôntica que seja auto-adesivo, bioativo, antimicrobiano e que tenha em sua composição um vidro niobofosfato.

A associação do vidro niobofosfato bioativo com guta-percha pode fornecer um selamento imediato e ser posteriormente reforçado pela formação de hidroxiapatita na interface dentina/obturação, e com a liberação de íons fosfato e cálcio livres também podem potencialmente auxiliar a regeneração óssea durante a cicatrização periapical e apresentar uma certa capacidade antibacteriana.

O objetivo do presente estudo é desenvolver, caracterizar e estudar a liberação de íons, pH, resistência de união à dentina e atividade antibacteriana sobre biofilme de um compósito à base de vidro niobofosfato bioativo e gutapercha para obturação endodôntica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento e o uso de Biomateriais para reparação e regeneração de partes do corpo tem crescido de maneira considerável no campo da Medicina moderna. Diante da importância desse tema, materiais à base de vidros e cerâmicas bioativas tem guiado os avanços tecnológicos para a substituição de ossos ou coberturas de materiais usado em implantes ortopédicos (Hench, 2006; Cormack; Tilocca, 2012).

Assim como a Medicina, a Odontologia tem buscado novas tecnologias que possam ser usadas para estimular a formação ou neoformação de tecidos mineralizados ao redor de implantes, onde necessita a recomposição da estrutura óssea, e na própria estrutura dental onde houve perda devido ao processo carioso. Os vidros bioativos tem chamado a atenção da comunidade científica devido a sua capacidade de liberar uma série de íons (P, Ca, Si and Na) que podem estimular a formação de um tecido mineralizado em contato com o fluido humano (Sepulveda et al., 2001).

A perda da porção inorgânica da estrutura dental em razão de fatores relacionados, tem levado inúmeros pesquisadores a procura de materiais que apresentam a habilidade de induzir a formação de hidrohapatita {HA –  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ }, para reposição da porção mineral (Vollenweider et al., 2007; Wang et al., 2011).

Dentre os vidros mais utilizados se encontra o Bioglass 45S5, que é um vidro bioativo composto de cálcio/sódio fosfato e sílicatos e apresenta bioatividade *in vitro* em solução de fluido corporal simulado (Kokubo et al., 1990; Kokubo; Takadama, 2006) e *in vivo,* sugere-se que ocorra a formação de uma camada externa rica em cálcio e fosfato que adere quimicamente a esses tecidos duros (Hench; Wilson, 1984; Filgueiras et al., 1993), enquanto internamente há perda de sílica para o meio (Sepulveda et al., 2001). O nome 45S5 refere-se a proporção de 45% em massa de SiO<sub>2</sub> e a relação de Ca/P= 5 (Cao; Liu, 2013).

O mecanismo proposto por Hench para esses biovidros pode ser descrito em três eventos: lixiviação, dissolução e precipitação. Primeiramente os biovidros

perdem íons sódio e cálcio por troca com íons  $H_3O^+$  da solução. Essa lixiviação promove um aumento local do pH, ocasionando a quebra dos grupos Si-O-Si da superfície e liberando sílica solúvel para a solução. A dissolução culmina na formação de uma camada rica de sílica hidratada pela condensação dos grupos silanóis. A seguir, ocorre a incorporação de  $PO_4^{3-}$  e Ca<sup>2+</sup> provenientes da migração desses grupos para a superfície do vidro bioativo e da solução para a formação da camada de fosfato de cálcio. Esta camada, inicialmente não cristalina, evolui gradualmente para uma camada policristalina pela incorporação adicional de ânions carbonato da solução e cristaliza-se em hidroxiapatita carbonatada (HCA) como fase principal (Hench; Larry, 1991; Hench; Wilson, 1999).

Uma das desvantagens dos vidros fosfatos é a sua pobre durabilidade química em ambientes aquosos, no entanto, essa durabilidade pode ser aumentada com a adição de óxido de nióbio a esses vidros além de influenciar nas propriedades bioativas dos mesmos (Carbonari, 2003; Sene et al., 2004; Denry et al., 2005; Bertolini et al., 2008) podendo também melhorar a biocompatibilidade (Denry et al., 2005).

Nos vidros niobofosfato, o nióbio (Nb), assume um papel importante na bioatividade. Em SBF (Simulated Body Fluid – Fluido Corpóreo Simulado), os grupos funcionais Nb-OH adquirirem uma carga negativa, e induzem a formação de apatita com a deposição de um composto de cálcio amorfo. Posteriormente, uma forma amorfa de fosfato de cálcio se transforma em hidroxiapatita (Kokubo et al., 2003). O vidro niobofosfato apresenta bioatividade e biocompatibilidade in vivo (Carbonari 2003), além disso, o pentóxido de nióbio sozinho é capaz de promover uma cristalização e mineralização dos tecidos circundantes (Karlinsey et al., 2006). Ao contrário da sílica, o Nb participa ativamente na reação de osseointegração devido à sua elevada biocompatibilidade (Velten et al., 2004). Esse tipo de vidro pode aumentar significativamente a atividade de fosfatase alcalina, que é diretamente proporcional à concentração de íons Nb dissolvidos (Tamai et al., 2007). A incorporação de pentóxido de Nb (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) pode também aumentar a radiopacidade e dureza de materiais adesivos experimentais (Leitune et al., 2013a,b). Além disso, os outros constituintes do vidro, tais como CaO- $P_2O_5$ e Na, também contribuem para a deposição de hidroxiapatita (Oh et al., 2005;

Kokubo et al., 2003) e, consequentemente a bioatividade do vidro (Lin et al., 2005).

Apesar dos biovidros 45S5 apresentarem elevada bioatividade, sua utilização é restrita para aplicações que não requerem materiais com elevada resistência mecânica. O aumento dessa resistência no entanto, ainda é um desafio (Doremus, 1994; Shackelford; Doremus, 2008).

Relatos sobre a influência do óxido de nióbio em vidros bioativos são escassos. Poucos estudos, no entanto, mostram que a adição desse óxido ocasiona uma melhora na resistência mecânica e bioatividade do biovidro (Golubkov et al., 2001; Denry et al., 2005; Ghussn et al., 2006), bem como, no estímulo de formação de tecido ósseo (Denry et al., 2005).

Atualmente, os materiais bioativos vem sendo introduzidos aos poucos em diversos campos da Odontologia, para tratamento de hipersensibilidade através da remineralização (Engqvist et al., 2004; Vollenweider et al., 2007; Marending et al., 2009; Peters et al., 2010; Wang et al., 2011; Sauro et al., 2012), recobrimento de implantes dentários (Altomare et al., 2011; Cao; Liu, 2013), participando da composição de materiais restauradores estéticos e sistemas adesivos (Hashimoto et al., 2010; Sauro et al., 2012; Leitune et al., 2013a), cimentos endodônticos (Zhang et al., 2009ab; Damas et al., 2011; Hansen et al., 2011; Loushine et al., 2011; Shokouhinejad et al., 2013; Nagas et al., 2012; Özcan et al., 2012; Leitune et al., 2013b) guta-perchas (Alani et al., 2009; Mohn et al., 2010a,b; Marending et al., 2013) e também como medicação intracanal (Zehnder et al., 2004; Krithikadatta et al., 2007; Vollenweider et al., 2007; Gubler et al., 2008).

#### **Biovidros na Endodontia**

Os primeiros relatos do uso de vidros bioativos na Endodontia o mostram como uma alternativa ao uso como medicação intracanal. Estudos *in vitro* indicam que vidros bioativos podem ser usados como medicação intracanal pois seu espectro de ação e eficácia antimicrobiana são semelhantes ao hidróxido de cálcio utilizado entre sessões (Gubler et al., 2008). O vidro bioativo é um material que se

torna ativado quando em contato com o fluido dentinário, liberam íons, promovendo um pH alcalino no ambiente (Krithikadatta et al., 2007). Esses biomateriais, por serem bioativos, podem induzir a remineralização dentinária (Vollenweider et al., 2007).

Embora o efeito antimicrobiano dos vidros bioativos não seja totalmente compreendido, ele pode estar relacionado à elevação do pH em suspensões aquosas (Stoor et al., 1998). Sabe-se que a estrutura dentinária exerce um efeito tampão sobre grandes variações de pH, e pode ser responsável por diminuir a atividade antimicrobiana de medicamentos dentro do canal radicular (Haapasalo et al., 2000). Entretanto, foi relatado que o vidro bioativo tem sua eficácia antibacteriana aumentada quando misturado à dentina (Zehnder et al., 2004).

Zehnder et al. (2004) relatam que o pó do vidro bioativo S53P4 possui efeito anti-séptico maior do que o observado pelo hidróxido de cálcio, e que aparentemente, este efeito não estaria relacionado apenas ao pH. O aumento do pH da solução aquosa de vidro bioativo pode ser provocado pela deterioração da superfície do vidro, liberando óxidos de sódio. Eles hipotetizaram ainda que a dentina pode servir como uma fonte de íons cálcio e fósforo, o que permite o vidro bioativo mineralizar a parede celular bacteriana, destruindo assim a sua integridade celular. Neste mesmo estudo, a presença de pó de dentina em suspensão aumentou significantemente a eficácia do vidro bioativo S53P4 contra uma multiplicidade de microorganismos orais.

Em outro estudo, Zehnder et al. (2006) afirmam que o pó de dentina age como um receptor para os íons em solução e, portanto, atua como catalisador para a dissolução do vidro em suspensão aquosa, interferindo na viabilidade bacteriana.

A atividade antimicrobiana de vidro bioativo contra *E. faecalis* foi considerada moderada quando comparada à clorexidina gel 2%, ao metronidazol gel 2% e ao hidróxido de cálcio (Krithikadatta et al., 2007), enquanto que Atila-Pektas et al. (2013), não encontraram aumento no efeito antimicrobiano do vidro bioativo utilizando o modelo de dentina infectada contra *E. faecalis*, em comparação com o hidróxido de cálcio, gel de clorexidina e Activ Point (guta-percha com diacetado de clorexidina).

Foram introduzidos no mercado, os cimentos biocerâmicos para obturação endodôntica (iRoot SP Root Canal Sealer - Innovative BioCreamix Inc., Vancouver, Canadá e o EndoSequence BC sealer – Brasseler USA, Savannah, Georgia) com o propósito de uma aplicação biológica, resultado da combinação entre o silicato de cálcio e o fosfato de cálcio (Candeiro et al., 2012).

EndoSequence BC sealer apresentou propriedades favoráveis, incluindo boa capacidade seladora (Zhang et al., 2009a), biocompatibilidade (Zhang; Li, 2010), citotoxicidade (Zoufan et al., 2011), atividade antimicrobiana (Zhang et al., 2009b) e adesão à dentina (Sagsen et al., 2011). Segundo Ulusoy et al. (2011), o cimento iRootSP pode reforçar raízes simuladas de dentes imaturos contra fratura quando usado com guta-percha ou Resilon.

Outra vantagem destes materiais é a bioatividade, ou seja, capacidade de induzir a formação de hidroxiapatita quando em contato com fluidos fisiológicos contendo fosfato (Gandolfi et al., 2010).

Em relação à adesão, Shokouhinejad et al. (2013) compararam a resistência de união do cimento EndoSequence BC Sealer a do AH Plus na presença ou não de *smear layer*. O modo de fratura mais frequente foi principalmente coesiva para todos os grupos. Em conclusão, a resistência de união entre o cimento biocerâmico foi igual ao do AH Plus com ou sem a camada de *smear layer*.

Um aspecto importante em relação à uma adequada adesão dos cimentos biocerâmicos, é a condição de umidade da dentina. Nagas et al. (2012) avaliando os efeitos das condições de umidade intra-radicular na resistência de união pushout de diferentes cimentos endodônticos observou que, independentemente das condições de umidade, o cimento iRoot SP exibiu a maior resistência de união a dentina radicular. A ordem decrescente dos valores de resistência de união foi a seguinte: iRoot SP > AH Plus > Epiphany ≥ MTA Fillapex. Foi observado ainda que os cimentos exibiram resistência de união à dentina maiores e menores sob as condição úmida e molhada, respectivamente. Concluíram que o grau de umidade residual afetou significativamente a adesão de cimentos endodônticos à dentina radicular. Sugeriram ainda que para os cimentos testados, pode ser vantajoso deixar os canais ligeiramente úmidos antes da obturação. Diferentes cimentos a base de silicato de cálcio podem apresentar variados níveis de bioatividade, pois sua composição influencia a capacidade de liberação de íons (Han; Okiji, 2013). O cimento BC sealer parece liberar grande quantidade de ions cálcio (Borges et al., 2012).

Borges et al. (2012) no entanto, relatou uma desvantagem dos cimentos biocerâmicos, pois observou que os cimento iRoot SP não atendeu as exigências da Especificação nº 57 da ANSI/ADA em relação à solubilidade.

Além dos cimentos biocerâmicos para obturação, existem os cimentos biocerâmicos reparadores. Em relação à citotoxicidade, o cimento biocerâmico EndoSequence Root Repair material (Brasseler EUA, Savannah, GA, EUA) demostrou níveis similares de citotoxicidade em relação a diferentes cimentos de MTA testados (Damas et al., 2011). Mukhtar-Fayyad (2011) concluiu que ambos os materiais BioAggregate e iRoot SP, mostraram biocompatibilidade aceitável.

Leal et al. (2011) compararam a capacidade dos materiais Ceramicrete, BioAggregate e do MTA branco (ProRoot, Dentsply Maillefer, Baillaigues, Suíça) em prevenir a infiltração de glicose através de obturações retrógradas. Os autores concluíram que ambos os cimentos reparadores biocerâmicos exibiram selamentos similares ao MTA branco quando usados como materiais retroobturadores.

Vidros fosfato bioativos também foram usados na tentativa de desenvolver um material capaz de preencher o sistema de canais radiculares sem o uso de qualquer cimento obturador em um ambiente úmido (Alani et al., 2009). Novos compósitos (poliisopreno ou policaprolactona) contendo vidros fosfatos capazes de liberar espéces iônicas para formar um precipitado e promover um selamento foram avaliados (Alani et al., 2009; Mohn et al., 2010a,b; Marending et al., 2013). Esses materiais experimentais mostraram muitas propriedades desejavéis para um material obturador endodôntico, tais como: Capacidade alcalina, autoadesividade à dentina radicular (Alani et al., 2009; Marending et al., 2013), radiopacidade e bioatividade (Mohn et al., 2010a,b). Baseado nesses resultados (Mohn et al., 2010a), um produto comercial foi desenvolvido com a adição do vidro 45S5 ao poliisopreno, a matriz polimérica da guta-percha (Bio-Gutta; smartodont Ilc, Zurich, Switzerland). Considerando a importância do assunto e o grande número de variáveis que o envolve, é recomendável que estudos sejam realizados a fim de avaliar se a utilização de vidros niobofosfato bioativos combinados com guta-percha na obturação endodôntica podem proporcionar um selamento eficiente e vir a substituir os cimentos de uso comum na Endodontia.

## **3 PROPOSIÇÃO**

#### **Objetivo Geral**

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar um compósito à base de vidro niobofosfato bioativo e guta-percha para obturação endodôntica.

## **Objetivos Específicos**

## Experimento 1:

Avaliar *in vitro* através do ensaio de *micropush-out* a resistência de união à dentina do material experimental, de uma guta-percha biocerâmica comercial ambos sem o uso de cimento e comparar com uma obturação convencional com Ah Plus e guta-percha.

Analisar o padrão de fratura da interface com auxílio de MEV.

Analisar usando EDX and MEV-EDS a composição e distribuição das partículas de vidros na superfície e no interior da matriz das diferentes guta-percha usadas neste estudo.

#### **Experimento 2:**

Avaliar a influência do compósito experimental, do vidro niobofosfato bioativo, de diferentes tipos de guta-percha e hidroxiapatita na adesão e formação de biofilme por bactérias orais com coloração Live/dead usando um microscópio confocal à laser nos tempos experimentais de 3, 14 e 30 dias.

Avaliar as propriedades químicas do compósito, a partir dos seguintes testes:

1. Análise do pH dos materiais usados neste estudo nos tempos experimentais de 1, 3, 7, 14, 21 e 30 dias.

2. Liberação dos elementos Ca, P, Zn, Na, Si e Nb dos materiais usados neste estudo através da Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente nos tempos experimentais de 3, 14 e 30 dias.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

A pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios dos Departamentos de Biomateriais e Biologia Oral e de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP, no CCTM do IPEN (Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Laboratório de Vidros e Compósitos Cerâmicos) e na UBC em Vancouver, Canadá (Department of Oral Biological and Medical Sciences, Faculty of Dentistry, University of British Columbia).

#### 4.1 Preparação e caracterização do compósito experimental

### 4.1.2 Preparo do biovidro niobofosfato

Vidros fosfatos foram obtidos a partir da fusão de misturas de hidróxido de amônia di-básico (PA-Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil), óxido de nióbio (PA - Companhia Brasileira de Mineração e Metalurgia, Araxá, MG, Brasil), óxido de cálcio (PA – Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil) e carbonato de sódio (PA - Casa Americana, São Paulo, SP, Brasil) em fornos elétricos.

O processo de obtenção dos vidros teve início com a pesagem das seguintes matérias-primas presentes na tabela 4.1.

| Matéria-prima              | Fórmula<br>Química                              |
|----------------------------|-------------------------------------------------|
| Fosfato de amônio dibásico | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HP <sub>4</sub> |
| Óxido de Cálcio            | CaO                                             |
| Carbonato de sódio         | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                 |
| Óxido de nióbio            | NbO <sub>5</sub>                                |

Tabela 4.1 - Matéria-prima dos componentes químicos usados para a fabricação do vidro niobofosfato

| Composto Químico               | % mol |
|--------------------------------|-------|
| $P_2O_5$                       | 33,10 |
| Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 13,00 |
| Na <sub>2</sub> O              | 6,62  |
| CaO                            | 47,28 |

Tabela 4.2 - Composição nominal do vidro

Essa composição nominal (tabela 4.2) foi escolhida, pois em estudo realizado no IPEN, dentre 7 diferentes composições, esta foi a que apresentou maior bioatividade *in vivo* (Carbonari, 2003).

Após a pesagem os compostos químicos foram misturados à seco em um misturador tipo túrbula por 1h. A mistura foi colocada em um cadinho de alumina e aquecido em forno elétrico (Lindberg, Blue M, IL, EUA) com taxa de aquecimento de 10°C/min até a temperatura de 500°C por 30min em ar para eliminação de produtos voláteis. O material foi então aquecido a 1400°C para a completa fusão dos precursores, permanecendo nesta temperatura por 20min para homogeneização e afinagem (procedimento realizado para eliminar as bolhas provenientes da decomposição dos materiais precursores). O líquido foi vertido em molde de aço inoxidável e resfriado a temperatura ambiente.

Após o resfriamento completo o vidro foi moído em sistema de moagem com bola de aço (Pulverisette, Fristsch, Idar-Oberstein, RP, Alemanha), durante 30 minutos.

Para a obtenção de partículas de carga menores que 86µm foi utilizada uma peneira de tela metálica (Hogentogler & Co., Inc., Columbia, MD, EUA) com auxilio de um agitador (Bertel, São Paulo, Brasil). Após isso foi realizado ensaio granulométrico via laser (CILAS Model 1064, Compagnie Industrielle des Lasers, Orléans, França) que permite determinar a distribuição granulométrica do material analisado.

4.1.3 Preparo do compósito guta-percha associado ao vidro niobofosfato

A guta-percha em pó (Odous de Deus, MG, Brasil) foi colocada em câmara de mistura para compósito com o vidro niobofosfato em concentrações crescentes até o limite de 30% em massa do vidro ao polímero e o material resultante foi inserido em uma extrusora, sendo a mistura final rolada á mão para dar o formato conveniente ao uso em obturação endodôntica (Cones 0.4, 0.6 acessórios e bastão).

### 4.2 Experimento 1

Nesse experimento foram utilizados os seguintes materiais:

1. AH Plus (Maillefer, Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil) e guta-percha (Protaper Universal Gutta-Percha Points, Maillefer, Dentsply).

2. EndoSequence BC guta-percha (EndoSequence BC gutta-percha points, Brasseler EUA, Savannah, GA, EUA) (GBC).

3. Guta-percha associada ao vidro niobofosfato (GNB).

4.2.1 Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX)

Análise de EDX (EDX - 720, Shimadzu, Tóquio, Japão) foi realizado para verificar a composição final e a presença de possíveis contaminantes na superfície dos materiais usados neste experimento e do biovidro separadamente. Primeiramente, uma câmara CCD foi utilizado para selecionar uma área de 10 mm de diâmetro de cada material.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura/ Espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)

MEV/EDS (SEM/EDS, XL30 Philips) foi realizada para observar a distribuição das partículas sobre a superfície e na massa da guta-percha. Nove diferentes áreas foram selecionados a partir de três espécimes de cada grupo. O resultado final apresentado foi uma média dos dados quantitativos de cada área. A superfície de uma amostra representativa de cada um dos materiais foi observada utilizando MEV (LEO 440 Electron Microscopy Ltda., Cambridge, Reino Unido).

4.2.3 Preparação do fluido corporal simulado (SBF)

O fluido corporal simulado é uma solução inorgânica de composição similar ao plasma humano sem os componentes orgânicos (Kokubo et al., 1990), e foi preparado de acordo com as normas preconizadas pela ISO/FDIS 23317:2007.

Durante todo o processo de preparação do SBF, a solução permaneceu incolor, transparente e sem qualquer depósito na superfície do recipiente.

Para preparar um litro de SBF, foram colocados no interior de um becker plástico, 700 ml de água destilada e deionizada que foi aquecida e agitada magneticamente a  $36,5 \degree C \pm 1,5 \degree C$ .

Os reagentes foram adicionados e dissolvidos um a um na solução de maneira que cada reagente fosse adicionado à solução após a completa dissolução do reagente anterior respeitando a seguinte ordem e quantidades:

- 1 NaCl (8,035 g)
- 2 NaHCO3 (0,355 g)
- 3 KCI (0,225 g)
- 4 K2HPO4.3H2O (0,231 g)
- 5 MgCl2.6H2O (0,311 g)
- 6 c(HCI) = 1 mol/l (39 g)

- 7 CaCl2 (0,292 g)
- 8 Na2SO4 (0,072 g)
- 9 TRIS tris hidroximetilaminometano (118 g)
- 10 c(HCI) = 1 mol/l (0 a 5 g)

Com a temperatura da solução constante, o TRIS foi adicionado pouco a pouco até que o pH atingisse 7,3 e a temperatura se estabilizesse entre 36 °C e 37 °C. A partir daí, foi adicionado mais TRIS até que o pH atingisse 7,45. Após atingir estes valores, foi colocado no interior do recipiente uma solução de ácido hidroclorídrico para baixar o pH para 7,42 e assim alternadamente até que toda a quantidade de TRIS fosse dissolvida, sempre respeitando os limites de 7,42 e 7,45 para os valores de pH da solução. Após a dissolução total do TRIS, a temperatura foi ajustada para 36,5 °C  $\pm$  0,2 °C e adicionadas pequenas quantidades de ácido hidroclorídrico até que o pH atingisse 7,42 $\pm$  0,01, e finalmente ajustado a 36,5 °C  $\pm$  0,40.

O SBF foi armazenado em recipiente plástico com tampa hermética e mantido em refrigerador a temperatura de 5°C.

#### 4.2.4 Seleção dos espécimes para os ensaios in vitro

Após aprovação do protocolo de pesquisa, sob o n° 109/11, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (ANEXO A) foram selecionados 60 dentes prémolares inferiores do Banco de Dentes Humanos da FOUSP, extraídos por razões diversas, portadores de canal único e ápices completamente formados. Os espécimes foram submetidos ao exame radiográfico pela técnica periapical para constatar a presença de um único canal radicular, ausência de qualquer sinal de calcificação difusa ou localizada, reabsorção interna ou tratamento endodôntico prévio. Após remoção de material orgânico da superfície radicular foram acondicionados e submetidos a 18,5 KGy de radiação gamacell (Centro Tecnológico de Radiação - Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear - IPEN, SP,
Brasil) para o controle microbiológico.

Uma vez esterilizados, os dentes foram reidratados e mantidos em solução fisiológica estéril (Cloreto de sódio 0,9%, Aster Produtos Médicos Ltda., Sorocaba, SP, Brasil) por 48 horas em estufa a 37°C. Para estabelecer o padrão de equilíbrio de hidratação foram mantidos em geladeira a 4°C, com troca diária da solução até o momento de uso.

4.2.5 Preparo dos dentes

As raízes foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo do dente, imediatamente abaixo da junção esmalte-cemento com máquina de corte (Isomet 100 Precision Saw Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA). O comprimento real de trabalho (CRT) para cada dente foi determinado por meio da introdução de um instrumento endodôntico tipo K de n° 10 (Maillefer, Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) dentro do canal radicular até que a ponta da lima fosse visualizada no forame apical, com o auxílio de uma lupa estereoscópica de 25x de aumento (Baush, Lomb, Rochester, USA), subtraindo-se 1 mm da medida obtida. O esvaziamento dos canais foi realizado com limas tipo K (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiça), n° 15, na presença de solução de hipoclorito de sódio a 1,0% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil).

Foi feito o preparo químico-cirúrgico com instrumentação rotatória – sistema Protaper e o motor rotatório Endo Plus (VK Driller, São Paulo) sendo o último instrumento utilizado o F5 (#50/05 taper). Os canais foram irrigados com 2mL de hipoclorito de sódio a 1% e pH 11 por 1 min entre cada instrumento. A *smear layer* foi removida com 5mL de EDTA a 17% por 1 minuto (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil). Após isso os canais foram secados por aspiração com cânulas de diâmetros decrescentes complementando-se a secagem com cones de papel absorvente (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Concluído o preparo químico-cirúrgico as raízes foram divididas aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=20) de acordo com os materiais usados na etapa de obturação:

4. AH Plus (Maillefer Dentsply) e guta-percha (Protaper Universal Gutta-Percha Points, Maillefer, Dentsply). O cimento AH Plus foi manipulado de acordo com as recomendações do fabricante.

5. EndoSequence BC guta-percha (Brasseler) (GBC).

6. Guta-percha associada ao vidro niobofosfato (GNB).

Os espécimes nos grupos 2 e 3 foram preenchidos com os materiais correspondentes sem uso de cimento. Apenas para estes dois grupos o canal radicular foi irrigado com 1 ml de SBF e permaneceu úmido para obturação sem cimento.

Em todos os três grupos as raízes foram obturados pela técnica termoplástica de ondas contínuas de condensação usando System B (SybronEndo, Orange, CA) e técnica de Schilder. Todos os espécimes foram restaurados com resina composta após a obturação e armazenados por 30 dias em tubos de Eppendorf individuais, contendo 2 mL de SBF em estufa a 37°C.

4.2.7 Resistência de união à dentina (RU)

A resistência de união à dentina da obturação foi testada empregando-se o ensaio de *micropush-out*.

Os 2 mm apicais e cervicais do canal radicular de cada raiz obturada foram

seccionados transversalmente em uma máquina de corte (Isomet 1000 *Precision Saw Buehler*) com disco diamantado de 0,4 mm de espessura, sob constante refrigeração, e essas fatias descartadas. Após isso, foram obtidas 4 fatias de 1,5 mm de cada raiz. Aquelas que não apresentaram o canal uniformemente circular foram descartadas a fim de se tentar padronizar a distribuição de tensões entre os corpos-de-prova.

As espessuras das fatias foram medidas com um paquímetro digital com resolução de 0,01 mm (Mitutoyo MTI Corporation, Tokio, Japão).

Foram capturadas imagens digitais de ambos os lados das fatias em câmera digital (*Q-Color 5, Olympus*) acoplada à lupa estereomicroscópica (*SZ61, Olympus America Inc., PA, EUA*), sob aumento de 40 vezes. Para a mensuração dos diâmetros apical e cervical utilizamos o *software* Image J (*National Institute of Health, Maryland, EUA http:/rsb.info.nih.gov/ij/*). Essas medidas são importantes, pois com valor da carga em Kgf registrado após os ensaios, foi feito o cálculo da resistência de união de acordo com a seguinte fórmula: RU=F/A, pela qual a resistência de união foi calculada transformando-se a carga no momento da extrusão (N), e dividindo-a pela área adesiva (mm<sup>2</sup>). A área adesiva foi encontrada pela fórmula da área do tronco de cone, conforme segue:

$$A = \pi (R + r) \sqrt{h^2 + (R - r)^2}$$

Onde:

A corresponde à área de superfície do espécime;

 $\pi$  é a constante 3,1416;

R é o raio maior do cone;

r é o raio menor do cone;

h é a espessura da fatia.

A superfície cervical de cada corpo-de-prova foi posicionada no suporte acoplado à base da máquina de ensaio universal (Kratos Dinamômetros, Embu, SP, Brasil). Dessa forma, o lado apical ficou voltado para um pino cilíndrico de aço inoxidável fixado à célula de carga. O diâmetro do pino foi selecionado de modo a

ser 0,2 mm menor do que o diâmetro apical da fatia, a fim de se evitar que o mesmo tocasse nas paredes dentinárias durante o ensaio. O teste foi realizado a uma velocidade de 0,5 mm/minuto até a completa extrusão da obturação, registrada pela queda abrupta no valor da carga aplicada.

#### 4.2.8 Análise do tipo de fratura

Após o ensaio, as fatias foram clivadas longitudinalmente, no sentido vestíbulo-lingual e os segmentos radiculares examinados em MEV (Tabletop Microscope TM3030, Hitachi, Tokyo, Japan) sem recobrimento, sob aumento de 80 vezes. Para estimar o percentual de substrato livre a área de interface foi dividida em oito segmentos. Esse tipo de classificação, sugerida por Fowler et al. (1999) determina como adesiva quando há mais de 75% de substrato livre, coesiva quando há menos de 25% e mista quando há entre 25% a 75% de substrato livre. A interface de espécimes representativos de cada grupo foram observadas usando um SEM (LEO 440 Electron Microscopy Ltd, Cambridge, UK). 4.2.9 Forma de análise dos resultados

Os dados foram submetidos à análise de variância de dois fatores e teste de Tukey para contraste de médias ( $\alpha$ =0,05) com auxílio do software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA).

Neste ensaio, a unidade amostral foi definida como sendo cada uma das raízes utilizadas. Portanto, foi calculada a média aritmética dos valores de resistência dos corpos-de-prova provenientes de um mesmo dente.

### 4.3 Experimento 2:

4.3.1 Efeito do compósito e do vidro niobofosfato bioativo na formação de biofilmes microbianos

4.3.2 Preparo dos discos

Discos de guta-percha impregnados com vidro niobofosfato (GNB), discos de guta-percha impregnadas com biocerâmica (GBC) (EndoSequence BC guttapercha Brasseler EUA, Savannah, GA, EUA), vidro niobofosfato puro (VNB), discos de guta-percha Obtura (OBT) (Obtura pellets, Shoreline, CT, USA) e discos de guta-percha Protaper (PTP) (Protaper Universal Gutta-Percha Points, Maillefer, Dentsply) foram obtidos nas dimensões 9,7 mm de diâmetro por 1,5 mm espessura. Discos de hidroxiapatita (HA) nas mesmas dimensões (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA) representaram o grupo controle positivo pois propicia o crescimento do biofilme (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013).

Discos de vidro niobofosfato (VNb) foram criados usando um molde cilíndrico de aço inoxidável bipartido com 9,7 mm de diâmetro. Nesse processo o liquido foi vertido no molde pré-aquecido a 440°C e este conjunto foi colocado em forno elétrico na mesma temperatura, permanecendo por 10min. Após este período, o vidro foi sacado do molde e aquecido a 620°C, por 4h. O vidro foi então resfriado à temperatura ambiente seguindo a própria inércia do forno, concluindo a etapa de recozimento necessária para eliminação das tensões termomecânicas causadas pelo processo de fabricação.

O cilindro de vidro então foi cortado com 1,5 mm espessura, em máquina de corte Isomet e polidos em Politriz com lixas 400 e 120.

Guta-percha (GBC, GNB, OBT e PTP) foram termoplastificadas com Obtura II Max System (Model 823-700; Obtura Spartan, Fenton, MO) e o material aquecido foi colocado numa matriz plástica medindo 9,7mm/1.5 mm sendo realizada compressão com 2 placas de vidro sobre pressão constante e controlada de 0.5 N por 1 minuto. Os discos foram mantidos em temperatura ambiente (25°C) for 24 horas (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013). Todos os discos foram descontaminados por luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 30 minutos cada lado.

## 4.3.3 Formação do biofilme

Placa subgengival foi coletada de um adulto voluntário saudável com dentição natural, sem cáries ativas ou periopatologias e sem ter feito uso de antibióticos nos últimos 3 meses. O doador não escovou os dentes por 24 horas e não fez ingestão de comida/bebida durante 2 h antes da doação de placa.

A placa foi suspensa em BHI (brain-heart infusion broth; Becton Dickinson, Sparks, MD). Os discos (5 discos de cada grupo para cada tempo experimental) foram incubados em placas com 24 poços sob condições de anaerobiose (AnaeroGen, OXOID, Hampshire, UK) a 37°C. Cada poço continha 1.8 mL de meio BHI estéril e 0.2 mL do inóculo onde os discos foram imersos. A densidade celular foi de 7.5x 10<sup>7</sup> CFU/mL. As placas de cultura foram mantidas em estufa a 37°C pelos perídos de 3, 14 e 30 dias. Foi realizada troca de meio BHI uma vez por semana sem adição de qualquer microorganismo. De acordo com cada tempo experimental, o biofime formado sobre os discos foram observados em microscopia confocal à laser.

Para isso, a placa de biofilme nos discos foi suavemente lavada três vezes com solução salina de tampão fosfato (PBS), e em seguida corada utilizando o kit de viabilidade bacteriana BacLight LIVE/DEAD KIT L7012 para análise quantitativa e microscópica (Molecular Probes, Eugene, OR). Bactérias vivas foram coradas com SYTO 9 para produzir uma fluorescência verde, e bactérias com membranas comprometidas coradas com iodeto de propídio para produzir uma fluorescência vermelha. Os discos foram examinados usando microscópio confocal (Nikon Eclipse C1; Nikon Canada, Mississauga, Ontário, Canadá) com uma lente de 10

aumentos. As imagens de 512X 512 pixels foram capturados usando a versão FluoView 4.3 software (Olympus, Melville, NY).

Quatro áreas aleatórias (0,3mm×0,3mm) de cada espécime foram observadas (n=5), totalizando 20 avaliações por grupo. A profundidade do scaneamento para todas as amostras foi de 20 µm (0.5µm step size, 40 slices/scan) para padronizar a área e volume do biofilme scaneado. As imagens foram analisadas e reconstruídas em 3D utilizando o software Imaris 7.2 (Bitplane Inc, St Paul, MN). Foram analisados o biovolume total (volume de fluorescência vermelha somado ao volume de fluorescência verde em mm<sup>3</sup>), o biovolume de bacterias viáveis (volume de fluorescência verde em mm<sup>3</sup>), e a porcentagem de bactérias viáveis (%) utilizando o software Imaris 7.2 (Du et al., 2013).

4.3.4 Forma de análise dos resultados

As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando ANOVA de dois fatores e teste de Tukey para contraste de médias ( $\alpha$ =0,05) usando o software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA).

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura do biofilme após 30 dias no grupo controle (HA) foi visualizada em MEV para fins ilustrativos.

As amostras foram lavadas em solução salina e fixadas à temperatura ambiente em glutaraldeido a 2%, pós-fixados em ósmio, desidratadas em série ascentente de etanol e secados usando o método do ponto crítico em um dispositivo de 030 CPD (BALTEC, Balzers, Liechtenstein). Os espécimes foram alocados em stubs e recobertos com Irídio para observação em MEV (Hitachi S4700). 4.3.6 Liberação de íons

Discos de 500 mg de cada dos materiais já descritos anteriormente foram incubados a 37°C em frascos individuais contendo 5 ml de água deionizada (pH 6,9).

A liberação dos elementos Ca, P, Zn, Na, Si e Nb dos materiais usados neste estudo foi realizada através da Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES PerkinElmer Optima 7300 DV) nos tempos experimentais de 3, 14 e 30 dias.

As condições de uso foram determinadas segundo as instruções do fabricante para cada íon.

O experimento descrito foi realizado em triplicatas. As diferenças entre os grupos para cada íon foi avaliada usando ANOVA de dois fatores e teste de Tukey para contraste de médias ( $\alpha$ =0,05) usando o software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA).

4.3.7 Indução de pH

Discos de 500 mg de cada dos materiais descritos anteriormente foram incubados a 37°C em frascos individuais contendo 5 ml de PBS, pH 7,4 (Gibco, Invitrogen, Billings, MT, EUA).

Para as medições de pH, um eletrodo de pH calibrado (Seven Easy; Mettler Toledo, Greifensee, Suíça) foi usado em PBS após os tempos experimentais de 1, 3, 7, 14, 21 e 30 dias. O experimento descrito foi realizado em triplicatas. As diferenças entre os grupos para cada tempo experimental foi avaliada usando ANOVA de um fator ( $\alpha$ =0,05) usando o software SigmaPlot 12.5 (Systat Software

Inc, San Jose, CA).

4.3.8 Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX)

Análise de EDX (EDX -720, Shimadzu, Tóquio, Japão) foi realizado para verificar a composição da superfície dos materiais usados neste experimento. Primeiramente, uma câmera CCD foi utilizado para selecionar uma área de 10 mm de diâmetro de cada material.

### **5 RESULTADOS**

# 5.1 Caracterização do vidro niobofosfato

As análises de EDX mostraram um resultado quantitativo da composição do vidro (Tabela 5.1) e detectada a presença de Nb, P, Ca e Na. Também foram detectadas pequenas quantidades de  $Al_2O_3$  e vestígios de SrO. A distribuição do tamanho das partículas mostrou grande número de partículas com um tamanho menor do que 10 µm (Figura 5.1).



Figura 5.1 - Distribuição granulométrica do pó de vidro niobofosfato

5.1.2 Caracterização do vidro niobofosfato associado a guta-percha

As análises de EDX revelaram a composição dos cones de guta-percha utilizados neste estudo (Tabela 5.1). A análise MEV/EDS na superfície e no interior da guta-percha Protaper mostrou uma composição homogênea em toda as amostras (Figura 5.2D). Para Endosequence BC guta-percha, Ca foi detectado apenas na superfície, indicando apenas um revestimento de partículas de biocerâmica. (Figura 5.2 E, GS, GB). Partículas de vidro foram detectados (com base na detecção de nióbio) tanto na superfície e no interior da GNB (Figura 5.2 F, SH, HB).

# 5.2 Resistência de união à dentina

Grupos AH Plus e GNB mostraram resistência de união de 2,83  $\pm$  0,64 MPa e 2,68  $\pm$  0,84 MPa, respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles (p > 0,05). Grupo GBC teve a menor média de resistência de união (1,34  $\pm$  0,42 MPa), com diferença estatistica significante comparada aos demais grupos (p < 0,05). Falhas coesivas prevaleceram no grupo AH Plus, enquanto que falhas mistas e adesivas prevaleceram nos grupos GBC e GNB (Tabela 5.1). Um espécime do grupo GBC foi perdido durante os procedimentos de corte da raiz. Os valores de resistência de união obtidos no experimento 1 estão expressos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Análise EDX dos diferentes tipos de guta-percha usados neste estudo e do vidro isoladamente em porcentagem em peso dos elementos constitutivos. Médias e desvio padrão dos valores de resistência de união (MPa) dos grupos experimentais testados e classificação do modo de fratura (%)

|                          |                                                                                                                                                                    |                          | Modo de F | ratura (%) |       |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|------------|-------|
| Grupos                   | EDX                                                                                                                                                                | μ-pushout<br>(MPa)       | Adesiva   | Coesiva    | Mista |
| Ah Plus +<br>guta-percha | ZnO 90,6%, BaO 6,0%,<br>SO <sub>3</sub> 3,1%, SrO 0,08%, NiO<br>0,06%                                                                                              | 2,83 (0,64) <sup>A</sup> | 3,13      | 78,12      | 18,75 |
| GBC                      | $\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$                                                                                                               | 1,32 (0,42) <sup>B</sup> | 30,4      | 19,9       | 49,7  |
| GNB                      | $\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$                                                                                                               | 2,68 (0,84) <sup>A</sup> | 41,73     | 5,52       | 52,75 |
| Vidro NB                 | Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 41,8%, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 32,5%,<br>CaO 18,8%, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 2,7%,<br>Na <sub>2</sub> O 1,2%, SrO 0,04% | -                        | -         | -          | -     |

Letras diferentes indicam a presença de diferença estatisticamente significante (p <0,05).



Figura 5.2 - A-C Micrografia da superfície dentinária após o teste micropush-out: Barra = 10μ - A: Ah Plus cobrindo parcialmente os túbulos dentinários; B: GBC cobrindo parcialmente a dentina e entrando em alguns túbulos dentinários; C: dentina completamente coberto com GNB e presença de um precipitado. D-F - Micrografia das superfícies de guta-percha D: Protaper mostrou uma superfície sem partículas. E: Em GBC nota-se a presença de partículas de vários tamanhos e formato irregulares. F: GNB. revelou a presença de partículas menores quando comparadas a GBC. G-H Micrografias de GBC (L) e GNB (H) e os espectros de EDS correspondente na superfície (S) e no interior (B) dos materiais. GB-GS: Ca foi detectado apenas na superfície (GS), indicando que havia apenas uma camada de partículas de biocerâmica no GBC. HB-SH: foram detectadas partículas de vidro tanto na superfície quanto no interior da GNB

# 5.3 Efeito do compósito e do vidro niobofosfato bioativo na formação de biofilmes microbianos

Análise dos substratos revelaram que a adesão bacteriana com formação de biofilme ocorreu em todos os grupos e em todos os períodos analisados. A figura 5.3 representa as imagens obtidas a partir dos biofilmes sobre diferentes substratos durante os períodos de indução após análises e reconstrução em 3D utilizando o software Imaris 7.2 (Bitplane Inc, St Paul, MN).

As médias do biovolume total (mm<sup>3</sup>), biovolume viável (mm<sup>3</sup>), e porcentagem de biofilme viável (%) para cada grupo nos 3 diferentes períodos foram apresentados nas tabelas 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente.

Após 3 dias de incubação, o maior biovolume total para o período de 3 dias foi observado no grupo HA, com diferença significante em comparação aos demais substratos (P < 0,05). Todos os demais grupos não apresentaram diferença entre si nesse período.

Aos 14 dias de incubação, o grupo OBT obteve o menor biovolume total, no entanto, não mostrou diferença significante em comparação aos grupos GNB e GBC (P > 0,05). Todos os grupos, com exceção do OBT, não mostraram diferença em relação à HA.

Após 30 dias de incubação a hidroxiapatita (HA) apresentou o maior biovolume total com diferença significante (P < 0,05) em relação aos demais grupos. Os grupos GBC e GNB e VNB apresentaram os menores valores de biovolume total em 30 dias. Todos os substratos mostraram diferença estatística entre os períodos de incubação (P < 0,05).

Quando apenas as células viáveis (biovolume viável) foram consideradas, a amostras de hidroxiapatita mostraram os maiores valores em todos os períodos testados (P < 0,05). Os demais grupos não apresentaram diferenças no período de 3 dias, no entanto, aos 14 dias o grupo PTP apresentou biovolume viável intermediário, com diferença significante em relação aos demais grupos, seguido pelos menores valores de biovolume viável para os demais grupos. Aos 30 dias,

os maiores valores de biovolume viável em ordem decrescente foram: HA; PTP e OBT; GBC e VNB e finalmente GNB.

Com relação ao percentual de biofilme viável o material experimental GNB apresentou os menores valores para 3 e 30 dias enquanto o VNB apresentou o menor valor para 14 dias com diferença estatisticamente significante em relação aos demais grupos (P < 0,05). A HA apresentou os maiores percentuais de biofilme viável para todos os tempos experimentais avaliados (P < 0,05).

|         | HA                       | PTP                             | OBT                      | GBC                       | GNB                             | VNB                       |
|---------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 3 dias  |                          |                                 |                          |                           |                                 |                           |
| Menor   | 6.6 × 10 <sup>6</sup>    | 4.6 × 10 <sup>6</sup>           | 6.2 × 10 <sup>6</sup>    | 4.5 × 10 <sup>6</sup>     | 2.4 × 10 <sup>6</sup>           | 3.4 × 10 <sup>6</sup>     |
| Maior   | 1.3 × 10 <sup>7</sup>    | 1.0 × 10 <sup>7</sup>           | 1.3 × 10 <sup>7</sup>    | 1.1 × 10 <sup>7</sup>     | 9.4 × 10 <sup>6</sup>           | 1.1 × 10 <sup>7</sup>     |
| Média   | 9.8 × 10 <sup>6</sup> Ac | 7.5 × 10 <sup>6</sup> <b>Bb</b> | 7.4 × 10 <sup>6</sup> Bb | 7.8 × 10 <sup>6</sup> Bb  | 6.7 × 10 <sup>6</sup> <b>Bb</b> | 6.9 × 10 <sup>6</sup> Bc  |
| 14 dias |                          |                                 |                          |                           |                                 |                           |
| Menor   | 6.6 × 10 <sup>6</sup>    | 7.1 × 10 <sup>6</sup>           | 7.2 × 10 <sup>6</sup>    | 3.7 × 10 <sup>6</sup>     | 6.5 × 10 <sup>6</sup>           | 5.8 × 10 <sup>6</sup>     |
| Maior   | 2.2 × 10 <sup>7</sup>    | 1.6 × 10 <sup>7</sup>           | 1.1 × 10 <sup>7</sup>    | 1.9 × 10 <sup>7</sup>     | 1.8 × 10 <sup>7</sup>           | 1.9 × 10 <sup>7</sup>     |
| Média   | 1.2 × 10 <sup>7</sup> Ab | 1.0 × 10 <sup>7</sup> Aa        | 8.8 × 10 <sup>6</sup> Bb | 1.0 × 10 <sup>7</sup> ABa | 1.0 × 10 <sup>7</sup> ABa       | 1.1 × 10 <sup>7</sup> Aa  |
| 30 dias |                          |                                 |                          |                           |                                 |                           |
| Menor   | 9.1 × 10 <sup>6</sup>    | 6.3 × 10 <sup>6</sup>           | 6.3 × 10 <sup>6</sup>    | 3.8 × 10 <sup>6</sup>     | 4.3 × 10 <sup>6</sup>           | 6.8 × 10 <sup>6</sup>     |
| Maior   | 1.8 × 10 <sup>7</sup>    | 1.6 × 10 <sup>7</sup>           | 1.6 × 10 <sup>7</sup>    | 1.2 × 10 <sup>7</sup>     | 9.4 × 10 <sup>6</sup>           | 1.1 × 10 <sup>7</sup>     |
| Média   | 1.5 × 10 <sup>7</sup> Aa | 1.1 × 10 <sup>7</sup> Ba        | 1.0 × 10 <sup>7</sup> Ba | 8.4 × 10 <sup>6</sup> Cb  | 7.2 × 10 <sup>6</sup> Cb        | 9.0 × 10 <sup>6</sup> BCb |

Tabela 5.2 - Maior, menor e média dos valores de biovolume total (µm3) em 3, 14 e 30 dias

Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significante (P <0,05) na mesma linha. Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significante (P <0,05) na mesma coluna.

|         | HA                       | PTP                             | OBT                      | GBC                            | GNB                      | VNB                             |
|---------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 3 dias  |                          |                                 |                          |                                |                          |                                 |
| Menor   | 6.4 × 10 <sup>6</sup>    | 4.1 × 10 <sup>6</sup>           | 6.0 × 10 <sup>6</sup>    | 4.0 × 10 <sup>6</sup>          | 1.3 × 10 <sup>6</sup>    | 2.8 × 10 <sup>6</sup>           |
| Maior   | 1.3 × 10 <sup>7</sup>    | 8.9 × 10 <sup>6</sup>           | 9.6 × 10 <sup>6</sup>    | 9.0 × 10 <sup>6</sup>          | 7.0 × 10 <sup>6</sup>    | 7.7 × 10 <sup>6</sup>           |
| Média   | 9.6 × 10 <sup>6</sup> Ac | 6.5 × 10 <sup>6</sup> <b>Bb</b> | 6.6 × 10 <sup>6</sup> Bb | 5.9 × 10 <sup>6</sup> <b>B</b> | 4.8 × 10 <sup>6</sup> Ba | 5.2 × 10 <sup>6</sup> <b>Bb</b> |
| 14 dias |                          |                                 |                          |                                |                          |                                 |
| Menor   | 6.3 × 10 <sup>6</sup>    | 6.3 × 10 <sup>6</sup>           | 5.7 × 10 <sup>6</sup>    | 2.7 × 10 <sup>6</sup>          | 4.1 × 10 <sup>6</sup>    | 3.2 × 10 <sup>6</sup>           |
| Maior   | 2.2 × 10 <sup>7</sup>    | 1.4 × 10 <sup>7</sup>           | 9.5 × 10 <sup>6</sup>    | 1.2 × 10 <sup>7</sup>          | 9.7 × 10 <sup>6</sup>    | 1.1 × 10 <sup>7</sup>           |
| Média   | 1.2 × 10 <sup>7</sup> Ab | 9.2 × 10 <sup>6</sup> Ba        | 7.5 × 10 <sup>6</sup> Cb | 6.6 × 10 <sup>6</sup> C        | 6.1 × 10 <sup>6</sup> Ca | 6.4 × 10 <sup>6</sup> Cb        |
| 30 dias |                          |                                 |                          |                                |                          |                                 |
| Menor   | 8.9 × 10 <sup>6</sup>    | 5.7 × 10 <sup>6</sup>           | 5.5 × 10 <sup>6</sup>    | 3.2 × 10 <sup>6</sup>          | 3.2 × 10 <sup>6</sup>    | 4.4 × 10 <sup>6</sup>           |
| Maior   | 1.8 × 10 <sup>7</sup>    | 1.3 × 10 <sup>7</sup>           | 1.4 × 10 <sup>7</sup>    | 1.0 × 10 <sup>7</sup>          | 7.1 × 10 <sup>6</sup>    | 9.0 × 10 <sup>6</sup>           |
| Média   | 1.4 × 10 <sup>7</sup> Aa | 9.5 × 10 <sup>6</sup> Ba        | 9.2 × 10 <sup>7</sup> Ba | 7.0 × 10 <sup>6</sup> C        | 5.0 × 10 <sup>6</sup> Da | 7.0 × 10 <sup>6</sup> Ca        |

Tabela 5.3 - Menor, maior e média dos valores de biovolume viável (µm3) em 3, 14 e 30 dias

Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significante (P <0,05) na mesma linha. Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significante (P <0,05) na mesma coluna.

|         | HA          | РТР          | OBT         | GBC          | GNB          | VNB          |
|---------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 3 dias  |             |              |             |              |              |              |
| Menor   | 97          | 83           | 82          | 64           | 42           | 64           |
| Maior   | 99          | 94           | 97          | 90           | 92           | 89           |
| Média   | 98 <b>A</b> | 88 <b>Ba</b> | 89 <b>B</b> | 76 <b>Cb</b> | 72 <b>Da</b> | 76 <b>Ca</b> |
| 14 dias |             |              |             |              |              |              |
| Menor   | 95          | 84           | 75          | 48           | 50           | 46           |
| Maior   | 100         | 97           | 95          | 79           | 81           | 66           |
| Média   | 97 <b>A</b> | 90 <b>Ba</b> | 85 <b>C</b> | 65 <b>Dc</b> | 60 <b>Eb</b> | 56 <b>Fb</b> |
| 30 dias |             |              |             |              |              |              |
| Menor   | 96          | 73           | 79          | 71           | 60           | 65           |
| Maior   | 100         | 85           | 92          | 91           | 86           | 87           |
| Média   | 98 <b>A</b> | 81 <b>Cb</b> | 88 <b>B</b> | 81 <b>Ca</b> | 70 <b>Da</b> | 77 <b>Ca</b> |

Tabela 5.4 - Menor, maior e média dos valores de porcentagem (%) de biofilme viável em 3, 14 e 30 dias

Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significante (P <0,05) na mesma linha. Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significante (P <0,05) na mesma coluna.



Figura 5.3 - Biofilme formado nos diferentes substratos de guta-percha, hidroxiapatita, e vidro niobofosfato em 3, 14 e 30 dias.

O material experimental GNB apresentou o maior valor de pH após 30 dias de imersão em PBS, seguido pelo HA e GBC. O vidro niobofosfato não apresentou mudança significativa no pH da solução de PBS para nenhum dos tempos experimentais testados (Tabela 5.5).

| Grupos | 1dia              | 3dias              | 7dias             | 14dias            | 21dias            | 30dias            |
|--------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| PBS    | 7.40 <sup>b</sup> | 7.41 <sup>cd</sup> | 7.41 <sup>e</sup> | 7.42 <sup>e</sup> | 7.42 <sup>d</sup> | 7.42 <sup>f</sup> |
| HA     | 8.00 <sup>a</sup> | 8.56 <sup>a</sup>  | 8.70 <sup>a</sup> | 8.45 <sup>a</sup> | 8.40 <sup>a</sup> | 8.38 <sup>b</sup> |
| PTP    | 7.36 <sup>b</sup> | 7.29 <sup>e</sup>  | 7.35 <sup>e</sup> | 7.47 <sup>e</sup> | 7.45 <sup>d</sup> | 7.60 <sup>e</sup> |
| OBT    | 7.40 <sup>b</sup> | 7.47 <sup>c</sup>  | 7.61 <sup>d</sup> | 7.74 <sup>d</sup> | 7.82 <sup>c</sup> | 7.93 <sup>d</sup> |
| GBC    | 7.45 <sup>b</sup> | 7.62 <sup>b</sup>  | 7.71 <sup>c</sup> | 7.87 <sup>c</sup> | 7.95 <sup>b</sup> | 8.06 <sup>c</sup> |
| GNB    | 7.40 <sup>b</sup> | 7.61 <sup>b</sup>  | 7.98 <sup>b</sup> | 8.26 <sup>b</sup> | 8.35 <sup>a</sup> | 8.45 <sup>a</sup> |
| VNB    | 7.41 <sup>b</sup> | 7.36 <sup>d</sup>  | 7.37 <sup>e</sup> | 7.36 <sup>f</sup> | 7.31 <sup>e</sup> | 7.41 <sup>f</sup> |

Tabela 5.5 - Valores de pHs encontrados nos diferentes tempos experimentais

Valores numéricos seguidos por letras diferentes indicam presença de diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA (p<0,05) na comparação entre os materiais no mesmo tempo experimental.

### 5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para visualizar a morfologia geral e estrutural do biofilme formado sobre os discos. Imagens representativas do desenvolvimento do biofilme, durante o período de 30 dias em disco HA está ilustrado na figura 5.4.



Figura 5.4 - As imagens demonstraram depósitos globulares e amorfos formadas na superfície dos discos de HA após 30 dias de incubação. O biofilme é composto predominantemente de espécies cocos agrupados em cadeia disperso na matriz extracelular. As imagens também mostraram espécies filamentosas e bastonete

# 5.6 Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX)

As análises de EDX mostraram um resultado quantitativo da composição dos materiais usados nesse experimento (Tabela 5.6). Os materiais PTP e OBT apresentaram maiores quantidade de ZnO, com mais de 70% desse óxido em sua composição. Os materiais GBC e GNB apresentaram em torno de 30% de ZnO, mas diferem bastante em relação aos demais constituintes. GNB apresenta 2% de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> enguanto o GBC apresentou 2,1% de SiO<sub>2</sub>.

| -   | EDX                                                                                                                                                                            |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| РТР | ZnO 90,6; BaO 6,0; SO <sub>3</sub> 3,4                                                                                                                                         |
| ОВТ | ZnO 73,82; BaO 20,68; SO <sub>3</sub> 2,24; SiO <sub>2</sub> 2,1; P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 0,85; Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,14; SrO 0,1; NiO 0,05                   |
| GBC | ZnO 30,4; ZrO <sub>2</sub> 34,4; BaO 17,8; SO <sub>3</sub> 6,5; TiO <sub>2</sub> 4,7; MgO 3,0; SiO <sub>2</sub> 2,1; HfO <sub>2</sub> 0,6; CaO 0,5                             |
| GNB | ZnO 36; BaO 33; SO <sub>3</sub> 15,2; Na <sub>2</sub> O 11,3; Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 2; P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 1,5; CaO 0,7; Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,3 |
| VNB | Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 41,8; P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 32,5; CaO 18,8; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 2,7; Na <sub>2</sub> O 1,2; SrO 0,04                         |
| НА  | CaO 55,4; P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 44,6                                                                                                                                   |

Tabela 5.6 - Análise EDX dos diferentes tipos de guta-percha usados neste estudo e do vidro isoladamente em porcentagem em peso dos elementos constitutivos

## 5.7 Análise da Liberação de íons

O material GBC apresentou significativamente a maior liberação de cálcio em relação aos demais grupos no período de 3 dias (p<0,05), no entanto, para os períodos de 14 e 30 dias, não mostrou diferenças significantes em relação ao grupo GNB. A tabela 5.7 descreve a quantidade de Ca liberado em diferentes tempos experimentais para todos os grupos analisados nesse estudo.

Com relação ao elemento sódio, a HA apresentou significativamente a maior liberação comparada aos demais grupos em todos os períodos avaliados (p<0,05), com exceção apenas ao grupo GNB, que apresentou liberação semelhante a HA apenas no período de 14 dias. O material experimental apresentou o segundo maior valor de liberação de sódio no período de 30 dias. A Tabela 5.8 descreve a quantidade de Na liberado em diferentes tempos experimentais para todos os grupos analisados.

Com relação ao elemento fósforo, a HA apresentou significativamente a maior liberação comparada aos demais grupos em todos os períodos avaliados (p<0,05), seguido pelo grupo VNB que apresentou o segundo maior valor de liberação de fósforo no período de 30 dias. A tabela 5.9 descreve a quantidade de P liberado em diferentes tempos experimentais para todos os grupos analisados nesse estudo.

O material GNB apresentou significativamente a maior liberação de zinco em relação aos demais grupos em todos os períodos testados (p<0,05), como pode ser observado na tabela 5.10.

O material GBC apresentou significativamente a maior liberação de Si em relação aos demais grupos nos tempos experimentais de 14 e 30 dias (p<0,05), como pode ser observado na tabela 5.11.

A liberação de Nb só foi observado no grupo VNB no período de 14 e 30 dias, mas não pode ser quantificada devido à limitações do equipamento.

|     | 3 dias             | 14 dias           | 30 dias           |  |
|-----|--------------------|-------------------|-------------------|--|
| РТР | 0.13 <sup>B</sup>  | 0.07 <sup>B</sup> | 0.29 <sup>B</sup> |  |
| OBT | 0.27 <sup>B</sup>  | 0.18 <sup>B</sup> | 0.18 <sup>в</sup> |  |
| GBC | 12.32 <sup>A</sup> | 9.46 <sup>A</sup> | 9.17 <sup>A</sup> |  |
| GNB | 1.29 <sup>в</sup>  | 4.7 <sup>AB</sup> | 4.6 <sup>AB</sup> |  |
| VNB | 0.55 <sup>в</sup>  | 1.37 <sup>в</sup> | 3.12 <sup>B</sup> |  |
| НА  | 0.98 <sup>B</sup>  | 0.7 <sup>B</sup>  | 0.72 <sup>B</sup> |  |
|     |                    |                   |                   |  |

Tabela 5.7 – Liberação de cálcio (mg/L) observada em diferentes períodos

Valores numéricos seguidos por letras diferentes indicam presença de diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA (p<0,05) na comparação entre os materiais no mesmo tempo experimental.

|     | 3 dias             | 14 dias            | 30 dias            |
|-----|--------------------|--------------------|--------------------|
| РТР | 1.89 <sup>в</sup>  | 0.8 <sup>B</sup>   | 1.21 <sup>c</sup>  |
| OBT | 0.06 <sup>B</sup>  | 0.65 <sup>B</sup>  | 0.66 <sup>c</sup>  |
| GBC | 0.97 <sup>B</sup>  | 4.85 <sup>AB</sup> | 5.47 <sup>c</sup>  |
| GNB | 3.32 <sup>B</sup>  | 9.29 <sup>A</sup>  | 14.57 <sup>B</sup> |
| VNB | 0.16 <sup>B</sup>  | 1.45 <sup>B</sup>  | 1.44 <sup>c</sup>  |
| НА  | 48.13 <sup>A</sup> | 8.59 <sup>A</sup>  | 90.66 <sup>A</sup> |

Tabela 5.8 - Liberação de sódio (mg/L) observada em diferentes períodos

Valores numéricos seguidos por letras diferentes indicam presença de diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA (p<0,05) na comparação entre os materiais no mesmo tempo experimental.

|     | 3 dias            | 14 dias           | 30 dias            |
|-----|-------------------|-------------------|--------------------|
| PTP | 0.13 <sup>B</sup> | 0.08 <sup>B</sup> | 0.49 <sup>c</sup>  |
| OBT | 0.04 <sup>B</sup> | 0.03 <sup>B</sup> | 0.05 <sup>c</sup>  |
| GBC | 0.01 <sup>B</sup> | 0.26 <sup>B</sup> | 0.28 <sup>c</sup>  |
| GNB | 0.07 <sup>B</sup> | 0.2 <sup>B</sup>  | 0.16 <sup>c</sup>  |
| VNB | 0.58 <sup>B</sup> | 1.75 <sup>B</sup> | 5.18 <sup>B</sup>  |
| НА  | 8.52 <sup>A</sup> | 7.59 <sup>A</sup> | 38.94 <sup>A</sup> |

Tabela 5.9 – Liberação de fósforo (mg/L) observada em diferentes períodos

Valores numéricos seguidos por letras diferentes indicam presença de diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA (p<0,05) na comparação entre os materiais no mesmo tempo experimental.

|     | 3 dias             | 14 dias            | 30 dias            |
|-----|--------------------|--------------------|--------------------|
| РТР | 2.73 <sup>B</sup>  | 3.20 <sup>B</sup>  | 4.10 <sup>B</sup>  |
| OBT | 4.01 <sup>B</sup>  | 6.45 <sup>B</sup>  | 4.29 <sup>B</sup>  |
| GBC | 0.39 <sup>B</sup>  | 0.14 <sup>B</sup>  | 0.22 <sup>B</sup>  |
| GNB | 51.29 <sup>A</sup> | 152.5 <sup>A</sup> | 212.1 <sup>A</sup> |
| VNB | 0.79 <sup>B</sup>  | 0.75 <sup>B</sup>  | 0.0 <sup>B</sup>   |
| НА  | 0.01 <sup>B</sup>  | 0.02 <sup>B</sup>  | 0.0 <sup>B</sup>   |

Tabela 5.10 – Liberação de zinco (mg/L) observada em diferentes períodos

Valores numéricos seguidos por letras diferentes indicam presença de diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA (p<0,05) na comparação entre os materiais no mesmo tempo experimental.

|     | 3 dias            | 14 dias           | 30 dias           |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|
| РТР | 0.1 <sup>A</sup>  | 0.09 <sup>B</sup> | 0.03 <sup>B</sup> |
| OBT | 0 <b>^</b>        | 0 <sup>в</sup>    | 0 <sup>в</sup>    |
| GBC | 0.42 <sup>A</sup> | 3.33 <sup>A</sup> | 4.22 <sup>A</sup> |
| GNB | 0 <b>^</b>        | 0.13 <sup>B</sup> | 0.04 <sup>B</sup> |
| VNB | 0 <b>^</b>        | 0 <sup>в</sup>    | 0 <sup>B</sup>    |
| НА  | 0.6 <sup>A</sup>  | 1.2 <sup>AB</sup> | 0.58 <sup>B</sup> |

Valores numéricos seguidos por letras diferentes indicam presença de diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA (p<0,05) na comparação entre os materiais no mesmo tempo experimental.

### 6 DISCUSSÃO

#### 6.1 Experimento 1

O presente estudo mostrou que o compósito experimental GNB desenvolvido é auto-adesivo à superfície dentinária quando utilizado em condições úmidas. Com base nos dados atuais, a guta-percha experimental utilizada sem cimento apresentou um desempenho semelhante ao grupo que combinou cimento e gutapercha convencional. Considerando que o grupo Ah Plus apresentou resistência de união de 2,83 Mpa e o grupo GNB 2,68 MPa e não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois (p > 0,05), podemos hipotetizar que o material experimental apresenta uma capacidade auto-adesiva originada a partir do potencial de bioatividade do vidro niobofosfato adicionado à guta-precha.

Dados reportados anteriormente relacionados a outro material experimental (Bio-Gutta), onde foi adicionado biovidro 45S5 à guta-percha, apresentaram resultados semelhantes de resistência de união (2,3 MPa) avaliados também por µpush-out após 30 dias de armazenamento em tampão de fosfato (Marending et al., 2013). O mecanismo de ação que possibilita a aderência à dentina do material Bio-Gutta e do GNB, no entanto, ainda é questionável e necessita de mais estudos.

Diferentemente desses materiais com partículas bioativas adicionadas, a guta-percha GBC não demonstrou a mesma capacidade de auto-adesão apesar de também possuir em sua composição partículas de biocerâmica. O grupo GBC teve a menor média de resistência de união (1,34 MPa) apresentando diferença estatisticamente significativa entre os outros grupos. A análise SEM-EDS da Endosequence BC guta-percha mostrou composições diferentes no interior e na superfície, indicando que houve apenas um revestimento ou um jateamento de partículas de biocerâmica sobre a superfície do material em questão. Para a guta-percha GNB foi encontrado partículas de vidro tanto no interior quanto na superfície. Neste caso, o pó de vidro foi misturado ao pó de guta-percha. Estas diferenças na composição e caracterização do material podem explicar a resistência de união superior obtida com a guta-percha experimental GNB quando comparada com a

guta-percha GBC. Durante a obturação termoplástica, talvez as partículas de vidro do material experimental foram mais uniformemente distribuídas ao longo da dentina pois as partículas de vidro bioativos estão incorporados em todo material. No entanto, é improvável que isso aconteça no grupo GBC depois da termoplastificação pois a proporção de partículas disponíveis somente na superfície do material pode ter sido insuficiente para promover a bioatividade na interface dentina/ obturação.

A bioatividade ocorre quando vidros bioativos interagem com osso ou dentina, formando uma camada rica em fosfato de cálcio que promove uma união quimica à esses tecidos duros (Hench; Wilson, 1984; Filgueiras et al., 1993). Inicialmente, a superfície do vidro reage com SBF e forma uma camada de hidroxiapatita responsável pelas interações dentro dos tecidos duros e moles (Kokubo et al., 1990, Kokubo; Takadama, 2006). A sílica (Si) tem um papel importante, onde primeiramente os biovidros perdem íons sódio e cálcio por troca com íons H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> da solução. Essa lixiviação promove um aumento local do pH, ocasionando a quebra dos grupos Si-O-Si da superfície e liberando sílica solúvel para a solução. A dissolução culmina na formação de uma camada rica de sílica hidratada pela condensação dos grupos silanóis. A seguir, ocorre a incorporação de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e Ca<sup>2+</sup> provenientes da migração desses grupos para a superfície do vidro bioativo e da solução para a formação da camada de fosfato de cálcio. Esta camada, inicialmente não cristalina, evolui gradualmente para uma camada policristalina pela incorporação adicional de ânions carbonato da solução e cristaliza-se em hidroxiapatita carbonatada (HCA) como fase principal (Hench, 1991; Hench; Wilson, 1999).

A guta-percha experimental apresentada nesse estudo não contêm Si na sua composição, como pode ser observado na análise EDX (Tabela 5.1). Portanto, o nióbio (Nb), assume um papel decisivo na bioatividade. Em SBF, os grupos funcionais de Nb-OH adquirirem uma carga negativa, e induzem a formação de apatita com a deposição de um composto de cálcio amorfo (Kokubo et al., 2003).

O vidro niobofosfato apresenta bioatividade e biocompatibilidade *in vivo* (Carbonari, 2003; Zerlim, 2008), além disso, o pentóxido de nióbio, que está presente neste tipo de vidro é capaz de promover um crescimento cristalino e a mineralização dos tecidos circundantes (Karlinsey et al., 2006). Ao contrário da Si, o

Nb participa ativamente na reação osseointegração devido à sua elevada biocompatibilidade (Velten et al., 2004). Vidros niobofosfato aumentam significativamente a atividade de fosfatase alcalina, que é diretamente proporcional à concentração de íons Nb dissolvidos (Tamai et al., 2007). A incorporação de pentóxido de Nb (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) pode também aumentar a radiopacidade e dureza de materiais adesivos experimentais (Leitune et al., 2013ab). Além disso, os outros constituintes do vidro, tais como CaO,  $P_2O_5$  e Na também contribuem para a deposição de hidroxiapatita (Kokubo et al., 2003, Oh et al., 2005) e, consequentemente na bioatividade do vidro (Lin et al., 2005).

É possível que a maior durabilidade química do vidro niobofosfato (Carbonari, 2003) possa estar relacionada com uma menor incidência de falhas coesivas no grupo GNB (5,52 %) uma vez que uma menor solubilidade e liberação de partículas de vidro mais lenta pode garantir uma maior resistência intrínseca ao material, atuando inclusive como um agente de preenchimento, semelhante ao que ocorre nas resinas compostas.

A bioatividade é geralmente testada utilizando uma solução de SBF (Kokubo et al., 1990). No presente estudo, o uso da SBF simulou as condições de umidade de dentina. Enquanto para alguns cimentos convencionais um ambiente com excesso de umidade parece ser um problema (Roggendorf et al., 2007; Zmener et al., 2008; Nagas et al., 2012), deixar o canal radicular úmido antes de obturá-lo com materiais bioativos é essencial (Nagas et al., 2012).

No presente estudo, apenas o grupo onde se obturou com Ah Plus e gutapercha não recebeu uma irrigação final com SBF antes dos procedimentos de obturação. Neste caso, foram seguidas todas as recomendações do fabricante sugeridos para esse cimento e utilizado pontas de papel absorvente (mantendo o canal radicular com uma umidade considerada normal). Nagas et al. (2012), sugere que pode ser vantajoso deixar os canais ligeiramentes úmidos antes do procedimento de obturação, no entanto, o grupo AH Plus mostrou resistência de união semelhante quando o canal radicular foi obturado em condições de umidade normal e condição úmida.

Alani et al. (2009) inovou e propôs um material para obturação à base de policaprolactona e vidro fosfato utilizado em um ambiente úmido, sem qualquer uso

de cimento. Alguns estudos posteriores têm mostrado bons resultados com a adição de diferentes tipos de vidros bioativos em uma matriz de poliisopreno (Mohn et al., 2010ab; Marending et al., 2013) no entanto, nenhum usou um vidro niobofosfato bioativo, que parece ser uma promissora opção de biomaterial para adicionar em materiais endodônticos na busca de um verdadeiro monobloco.

## 6.2 Experimento 2

O objetivo deste experimento foi analisar a influência de diferentes tipos de guta-percha e vidro niobofosfato bioativo na formação de biofilmes microbianos de placa dentária humana e investigar seus possíveis efeitos antimicrobianos através da análise de liberação de íons e pH.

O insucesso no tratamento endodôntico pode ser causada por inúmeros fatores, entre eles estão as infecções secundárias, que ocorrem após a penetração de bactérias orais para o sistema de canais radiculares, durante o tratamento, entre sessões, ou após a conclusão do tratamento endodôntico (Siqueira, 2003).

A infiltração de bactérias orais podem ocorrer após uma quebra da cadeia asséptica durante o tratamento, após selamento de restaurações temporárias ou entre sessões, ou depois da restauração definitiva, por fratura ou uma inadequada adesão (Siqueira et al., 2000).

Os microorganismos invasores podem, nesses casos, encontrar uma variedade de condições, que podem favorecer seu estabelecimento como biofilme ou constituir um biofilme já existente (Chavez de Paz, 2007). A formação de biofilme é iniciada por deposição das bactérias sobre uma superfície. Durante a fase inicial de formação do biofilme, as propriedades de aderência das células bacterianas irão desempenhar um papel essencial para uma ligação irreversível à superfície dentinária (Lau et al., 2009).

A adesão inicial é influenciada por diversos fatores, e uma mudança na superfície dentinária promovido pelas constantes liberações iônicas (sódio, cálcio e

fosfato) do biovidro e também sua conhecida deposição de hidroxiapatita sobre a superfície dentinária, podem apresentar um efeito antimicrobiano (Gubler et al., 2008) ou comprometer a adesão inicial dos microorganismos para formar o biofilme. Portanto, uma abordagem lógica, para impedir ou reduzir a formação de biofilme secundário em canais radiculares é tentar impedir essa adesão inicial com substâncias (Jaramillo et al., 2008) ou compósitos repelentes que podem alterar a composição química dos substratos.

De acordo com os resultados desse estudo, com relação a variável porcentagem de biofilme viável, o material experimental GNB apresentou os menores valores para 3 e 30 dias de incubação enquanto o VNB apresentou o menor valor para 14 dias de incubação com diferença estatística significante em relação aos demais grupos (P < 0,05). Além disso, os grupos GBC, GNB e VNB apresentaram os menores valores de biovolume total em 30 dias. Quando a variável biovolume viável foi analisada aos 30 dias, o grupo GNB apresentou o menor valor seguido pelos grupos GBC e VNB sendo que esses últimos grupos não mostraram diferença estatística entre si. De um modo geral, o material experimental GNB teve uma influência maior na inibição da formação de biofilmes microbianos em relação ao demais grupos. Além disso, todos os substratos com vidros bioativos em sua composição tiveram uma maior atividade antimicrobiana, em relação aos demais substratos.

Vidro bioativos são materiais que se tornam ativados quando em contato com fluidos teciduais, induzindo um pH alcalino, semelhante às medicações à base de hidróxido de cálcio (Gubler et al., 2008). Embora o efeito antimicrobiano dos vidros bioativos não seja totalmente compreendido, ele pode estar relacionado à elevação do pH em suspensões aquosas (Stoor et al., 1998) e também ser potencializado na presença de dentina (Zehnder et al., 2004).

O material experimental apresentou o maior valor de pH após 30 dias de imersão em PBS, seguido pela HA e GBC.

Já o VNB não apresentou mudança significativa no pH da solução de PBS para nenhum dos tempos experimentais testados. Nesse grupo foram usados discos de vidro (nas dimensões de 9.7 mm de diâmetro por 1.5 mm de espessura) que apresentam maior àrea de superfície exposta quando comparados com às microparticulas do biovidro moído (86µm) usados na fabricação da guta-percha experimental. Além disso, os discos de vidro sofreram um processo de recozimento para evitar a fratura durante os procedimentos de corte. Apesar do pH neutro, o VNB mostrou certa atividade antimicrobiana. Segundo Waltimo et al. (2007), vidros bioativos 45S5 nanoparticulados (20 a 60 nm) são mais alcalinos que os microparticulados e, consequentemente, exibem um efeito antimicrobiano mais forte. Nesse mesmo estudo, o autor conclui que o tamanho nano proporcionou um aumento em dez vezes na liberação de sílica.

Sabe-se que o efeito do elevado pH promovido pelo hidróxido de cálcio causa alteração na integridade da membrana citoplasmática bacteriana, provocando destruição celular (Mohammadi; Dummer, 2011). A ação antimicrobiana dos vidros bioativos tem sido atribuído à sua capacidade de aumentar o pH em suspensões bacterianas. Apesar da GNB apresentar o maior valor de pH neste estudo, este parece não ser o mecanismo principal de ação antimicrobiana para os materiais bioativos. Zehnder et al. (2004) relatam que o pó do vidro bioativo S53P4 possui efeito anti-séptico maior do que o observado pelo hidróxido de cálcio, e que aparentemente, este efeito não estaria relacionado apenas ao pH. O autor afirma que o biovidro estudado parece não ser um agente bactericida de ação imediata, mas sim de liberação controlada com um efeito de longa duração. Dados desse mesmo estudo, mostram um elevado pH (11) devido a deterioração da superfície do vidro, liberando óxidos de sódio. Para os materiais bioativos analisados no presente estudo parece ocorrer o mesmo efeito de longa duração, sendo que o periodo de maior atividade antimicrobiana ocorreu aos de 14 dias.

A liberação de sódio, cálcio, fósforo, ou sílica isoladamente parece não ser o fator primordial para a efeito antimicrobiano, mas talvez a liberação de diferentes espécies iônicas possa ser um fator importante na capacidade antimicrobiana dos materiais bioativos. Apesar das diferentes guta-percha utilizadas no presente estudo possuirem um alta concentração de ZnO, como demostrado na análise de EDX (mais de 70% para as convencionais e em torno de 30 % para as que contém vidros fosfatos em sua composição) apenas o GNB liberou uma grande quantidade de Zn. Podemos hipotetizar que a adição de vidro niobofosfato à guta-percha, pode favorecer a liberação de Zn, conferindo uma maior atividade antimicrobiana ao material.

Alguns autores sugerem que as nanopartículas de ZnO tem uma potencial aplicação como um agente bacteriostático e pode ter aplicações futuras no desenvolvimento de agentes de controle a propagação de infecções de uma variedade de cepas bacterianas (Jones et al., 2008; Siddique et al., 2013).

Guerreiro-Tanomaru et al. (2013) comparou a formação do biofilme de *Enterococcus faecalis* em diferentes substratos, tais como dentina bovina, gutapercha convencional, hidroxiapatita e osso bovino. Os substratos foram incubadas por 14 e 21 dias, e foi observada a formação de biofilme em todos os grupos, porém a guta-percha mostrou os menores resultados de biovolume total aos 14 dias e a hidroxiapatita o mais alto aos 21 dias. Segundo os autores, esta pode ser uma consequência da presença do óxido de zinco na composição da guta-percha que apresenta uma leve ação antibacteriana.

A obturação endodôntica após o preparo químico-cirúrgico não deve favorecer e preferencialmente inibir a formação desse biofilme, se eventualmente o selamento coronário for rompido, portanto, o desenvolvimento de um material obturador, mesmo que não tenha a capacidade antibacteriana de causar dano á membrana celular, mas que possa interferir nos mecanismos de aderência do biofilme, além de ser bioativo, e promover bom selamento em ambiente úmido parece ser promissor.

Outros estudos devem ser realizados para avaliar o desempenho e atividade antimicrobiana de vidro fosfatos, niobofosfatos bioativos e da GNB em dentina antes que seu uso clínico como material endodôntico possa ser proposto.

# 7 CONCLUSÕES

- O material experimental sob investigação mostrou resultados de resistência de união similares ao padrão ouro de obturação com gutapercha convencional e cimento epóxico (Ah Plus).
- O material GBC apresentou os menores valores de resistência de união e maior liberação de Ca no período de 3 dias em comparação aos demais grupos.
- A adição de vidros fosfatos à guta-percha parece ser vantajosa, inibibindo parcialmente a formação de biofilmes microbianos sobre à superfície desses materiais.
- O material experimental (GNB) apresentou a menor porcentagem de biofilme viável após 3 e 30 dias, menor biovolume viável após 30 dias de incubação e maior pH e liberação de zinco em comparação aos demais grupos.
- O vidro niobofosfato apresentou a menor porcentagem de biofilme viável após 14 dias de incubação.

# **REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

Alani A, Knowles JC, Chrzanowski W, Ng YL, Gulabivala K. Ion release characteristics, precipitate formation and sealing ability of a phosphate glass-polycaprolactone-based composite for use as a root canal obturation material. Dent Mater. 2009 Mar;25(3):400-10.

Altomare L, Bellucci D, Bolelli G, Bonferroni B, Cannillo V, De Nardo L, et al. Microstructure and in vitro behaviour of 45S5 bioglass coatings deposited by high velocity suspension flame spraying (HVSFS). J Mater Sci Mater Med. 2011 Mai;22(5):1303-19.

Atila-Pektaş B, Yurdakul P, Gülmez D, Görduysus O. Antimicrobial effects of root canal medicaments against Enterococcus faecalis and Streptococcus mutans. Int Endod J. 2013 Mai;46(5):413-8.

Bertolini, Márcio J, Zaghete MA, Gimenes R, Padovani GC. Determination of the properties of an experimental glass polyalkenoate cement prepared from niobium silicate powder containing fluoride. Dent Mater. 2008 Jan;24(1):124-8.

Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus G, Miranda CES, Pécora JD. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. Int Endod J. 2012 Mai;45(5):419-28.

Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. J Endod. 2012 Jun;38(6):842-5.

Cao H, Liu X. Plasma sprayed ceramic coatings for osseointegration. Int J Appl Cer Tech. 2013;10(1):1-10.

Carbonari MJ. Desenvolvimento de vidros niobofosfato bioativos [tese]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Ciências Tecnológicas e de Materiais; 2003.

Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. J Endod. 2007 Jun;33(6):652-62.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver

Cormack AN, Tilocca A. Structure and biological activity of glasses and ceramics. Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2012 Mar;28(370):1271-80.

Damas BA, Wheater MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. J Endod. 2011 Mar;37(3):372-5.

Denry IL, Holloway JA, Nakkula RJ, Walters JD. Effect of niobium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. J Biom Mater Res B App Biomater. 2005 Oct;75(1):18-24.

Doremus RH. Glass science. New York: J. Wiley; 1994. 339 p.

Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X, Xiong Z, Haapasalo M. The effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms in vitro. J Endod. 2013 Nov;39(11):1438-43.

Engqvist H, Schultz-Walz JE, Loof J, Botton GA, Mayer D, Phaneuf MW, Ahnfelt NO, Hermansson L. Chemical and biological integration of a mouldable bioactive ceramic material capable of forming apatite in vivo in teeth. Biomater. 2004 Jun;25(14):2781-7.

Filgueiras MR, La Torre G, Hench LL. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. J Bioml Mater Res. 1993 Abr;27(4):445-53.

Fowler CS, Swartz ML, Moore BK, Rhodes BF. Influence of selected variables on adhesion testing. Dent Mater. 1999 Jul;8(4):265-9.

Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. Int Endod J. 2010 Oct;43(10):917-29.

Ghussn L, Prado MO, Russo DO, Martinelli JR. Crystallization of a niobium phosphate glass. J Non Cryst Sol. 2006 Set;352(32):3391-7.

Golubkov VV, Dymshits OS, Zhilin AA, Redin AV, Shepillov MP. Crystallization of glasses in the  $K_2O-Nb_2O_5-SiO_2$  system. Glas Phys Chem. 2001 Nov;27(6):504-11.

Gubler M, Brunner TJ, Zehnder M, Waltimo T, Sener B, Stark WJ. Do bioactive glasses convey a disinfecting mechanism beyond a mere increase in pH? Int Endod J. 2008 Ago;41(8):670-8.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of Enterococcus faecalis biofilm formation on different substrates. J Endod. 2013 Mar;39(3):346-50.

Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Orstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of root canal medicaments by dentine: an in vitro study. Int Endod J. 2000 Mar;33(2):126-31.

Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. Int Endod J. 2013 Sep;46(9):808-14.

Hansen SW, Marshall JG, Sedgley CM. Comparison of intracanal EndoSequence root repair material and ProRoot MTA to induce pH changes in simulated root resorption defects over 4 weeks in matched pairs of human teeth. J Endod. 2011 Abr;37(4):502-6.

Hashimoto M, Iijima M, Nagano F, Ohno H, Endo K. Effect of monomer composition on crystal growth by resin containing bioglass. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Jul;94(1):127-33.

Hench LL, Larry L. Bioceramics: from concept to clinic. J Am Cer Soc. 1991 Jul;74(7):1487-510.

Hench LL, Wilson J. An introduction to bioceramics. New York: World Scientific;1999. 386p.

Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. Sci. 1984 Nov;226(4675):630-6.

Hench LL. The story of Bioglass. J Mater Sci Mater Med. 2006 Nov;17(11):967-78.

Jaramillo DE, Arriola A, Safavi K, Chávez de Paz LE. Decreased bacterial adherence and biofilm growth on surfaces coated with a solution of benzalkonium chloride. J Endod. 2012 Jun;38(6):821-5.
Jones NB, Ray K, Ranjit T, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 2008 Fev;279(1):71-6.

Karlinsey RL, Hara TA, Yi K, Duhn CW. Bioactivity of novel self-assembled crystalline Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> microstructures in simulated and human saliva. Biomed Mater. 2006 Mar;1(1):16-23.

Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. Biomater. 2003 Jun;24(3):2161-75.

Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. J Biomed Mater Res. 1990 Jun;24(6):721-34.

Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomater. 2006 Mai;27(15):2907-15.

Krithikadatta J, Indira R, Dorothykalyani AL. Disinfection of dentinal tubules with 2% chlorhexidine, 2% metronidazole, bioactive glass when compared with calcium hydroxide as intracanal medicaments. J Endod. 2007 Dez;33(12):1473-6.

Lau PC, Dutcher JR, Beveridge TJ, Lam JS. Absolute quantitation of bacterial biofilm adhesion and viscoelasticity by microbead force spectroscopy. Biophys J. 2009 Abr;96(7):2935-48.

Leal F, De-Deus G, Brandão C, Luna AS, Fidel SR, Souza EM. Comparison of the root-end seal provided by bioceramic repair cements and white MTA. Int Endod J. 2011 Jul;44(7):662-8.

Leitune VC, Collares FM, Takimi A, Lima GB, Petzhold CL, Bergmann CP. Niobium pentoxide as a novel filler for dental adhesive resin. J Dent. 2013a Fev;41(2):106-13.

Leitune VC, Takimi A, Collares FM, Santos PD, Provenzi C, Bergmann CP. Niobium pentoxide as a new filler for methacrylate-based root canal sealers. Int Endod J. 2013b Mar;46(3):205-10.

Lin KSK, Tseng YH, Mou Y, Hsu YC, Yang CM, Chan JCC. Mechanistic study of apatite formation on bioactive glass surface using 31P solid-state NMR spectroscopy. Chem Mater 2005 Jul;17(17):4493-501.

Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller N, Pashley DH, Tay FR. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. J Endod. 2011 Mai;37(5):673-7.

Marending M, Bubenhofer SB, Sener B, De-Deus G. Primary assessment of a selfadhesive gutta-percha material. Int Endod J. 2013 Abr;46(4):317-22.

Marending M, Stark WJ, Brunner TJ, Fischer J, Zehnder M. Comparative assessment of time-related bioactive glass and calcium hydroxide effects on mechanical properties of human root dentin. Dent Traumatol. 2009 Fev;25(1):126-9.

Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. 2011 Ago;44(8):697-730.

Mohn D, Bruhin C, Luechinger NA, Stark WJ, Imfeld T, Zehnder M. Composites made of flame-sprayed bioactive glass 45S5 and polymers: bioactivity and immediate sealing properties. Int Endod J. 2010a Nov;43(11):1037-46.

Mohn D, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Radiopaque nanosized bioactive glass for potential root canal application: evaluation of radiopacity, bioactivity and alkaline capacity. Int Endod J. 2010b Mar;43(3):210-7.

Mukhtar-Fayyad D. Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Dec;112(6):e137-42.

Nagas E, Uyanik MO, Eymirli A, Cehreli ZC, Vallittu PK, Lassila LV, Durmaz V. Dentin moisture conditions affect the adhesion of root canal sealers. J Endod. 2012 Fev;38(2):240-4.

Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH, Jin S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. Biomater. 2005 Ago;26(24): 4938-43.

Özcan E, Çapar İD, Çetin AR, Tunçdemir AR, Aydınbelge HA. The effect of calcium silicate-based sealer on the push-out bond strength of fibre posts. Aust Dent J. 2012 Jun;57(2):166-70.

Peters MC, Bresciani E, Barata TJ, Fagundes TC, Navarro RL, Navarro MF, Dickens SH. In vivo dentin remineralization by calcium-phosphate cement. J Dent Res. 2010 Mar;89(3):286-91.

Roggendorf MJ, Ebert J, Petschelt A, Frankenberger R. Influence of moisture on the apical seal of root canal fillings with five different types of sealer. J Endod. 2007 Jan;33(1):31-3.

Sagsen B, Ustün Y, Demirbuga S, Pala K. Push-out bond strength of two new calcium silicate-based endodontic sealers to root canal dentine. Int Endod J. 2011 Dec;44(12):1088-91.

Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. J Mater Sci Mater Med. 2012 Jun;23(6):1521-32.

Sene FF, JR Martinelli, Gomes L. Optical and structural characterization of rare earth doped niobium phosphate glasses. J Non Cryst Sol. 2004 Nov;348:63-71.

Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Characterization of melt-derived 45S5 and solgel-derived 58S bioactive glasses. J Biomed Mater Res. 2001;58(6):734-40.

Shackelford JF, Doremus RH. Ceramic and Glass Materials Structure, Properties and Processing. New York:Springer;2008.

Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three dimensional quantitative analysis. J Endod. 2009 Jul;35(7):981-5.

Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. J Endod. 2011 Mai;37(5):657-661.

Shokouhinejad N, Gorjestani H, Nasseh AA, Hoseini A, Mohammadi M, Shamshiri AR. Push-out bond strength of gutta-percha with a new bioceramic sealer in the presence or absence of smear layer. Aust Endod J. 2013 Dez;39(3)102-6.

Siddique S, Shah ZH, Shahid S, Yasmin F. Preparation, characterization and antibacterial activity of ZnO nanoparticles on broad spectrum of microorganisms. Acta Chim Slov. 2013;60(3):660-5.

Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM. Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000 Nov;90(5):647-50.

Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. Int Endod J. 2003 Jul;36(7):453-63.

Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. Acta Odontol Scand. 1998 Jun;56(3):161-5.

Tamai, M, Isama K, Nakaoka R, Tsuchiya T. Synthesis of a novel B-tricalcium phosphate-hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties. J Artif Orga. 2007 Mar;10(1):22-8.

Ulusoy OIA, Nayir Y, Darendeliler-Yaman S. Effect of different root canal sealers on fracture strength of simulated immature roots. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Out;112(4):544-7.

Velten D, Eisenbarth E, Schanne N, Breme J. Biocompatible  $Nb_2O_5$  thin films prepared by means of the sol-gel process. J Mater Sci Mater Med 2004 Abr; 15(4):457-61.

Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. Acta Biomater. 2007 Nov;3(6):936-3.

Waltimo T, Brunner TJ, Vollenweider M, Stark WJ, Zehnder M. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. J Dent Res. 2007 Aug;86(8):754-7.

Wang Z, Jiang T, Sauro S, Wang Y, Thompson I, Watson TF, Sa Y, Xing W, Shen Y, Haapasalo M. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. J Dent 2011 Nov;39(11):746-56.

Zehnder M, Luder HU, Schatzle M, Kerosuo E, Waltimo T. A comparative study on the disinfection potentials of bioactive glass S53P4 and calcium hydroxide in contralateral human premolars ex vivo. Int Endod J. 2006 Dez;39(12):952-8.

Zehnder M, Söderling E, Salonen J, Waltimo T. Preliminary evaluation of bioactive glass S53P4 as an endodontic medication in vitro. J Endod. 2004 Abr;30(4):220-4.

Zehnder M, Waltimo N, Sener B, Soderling E. Dentin enhances the effectiveness of bioactive glass S53P4 against a strain of Enterococcus faecalis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Abr;101(4):530-5.

Zerlim A. Estudo da dissolução de vidros niobofosfato em água e solução simuladora de fluído fisiológico [dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Ciências Tecnológicas e de Materiais; 2008.

Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against Enterococcus faecalis. J Endod. 2009a Jul;35(7):1051-5.

Zhang W, Li Z, Peng B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009b Jun;107(6):79-82.

Zhang W, Li Z. Effects of iRoot SP on mineralization-related genes expression in MG63 cells. J Endod. 2010 Dec;36(12):1978-82.

Zmener O, Pameijer CH, Serrano SA, Vidueira M, Macchi RL. Significance of moist root canal dentin with the use of methacrylate-based endodontic sealers: an in vitro coronal dye leakage study. J Endod. 2008 Jan;34(1):76-9.

Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang Y, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Nov;112(5):657-61.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 109/11 CAAE 0123.0.017.000-11

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "Desenvolvimento e análise da microinfiltração bacteriana, resistência de união e nanoinfiltração de um compósito a base de vidro Niobofosfatos bioativo e guta-percha para uso endodôntico", de responsabilidade da pesquisadora Ceci Nunes Carvalho, sob orientação do Prof. Dr. Giulio Gavini.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 13 de dezembro de 2011.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". São Paulo - SP - CEP 05508-900 - Tel. (0XX11) 3091-7960