UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Fabiano Gamero Aguilar

Estudo da biocompatibilidade do cimento de aluminato de cálcio para uso odontológico, avaliação do pH, liberação de íons cálcio e atividade antimicrobiana.

Ribeirão Preto
2012

Fabiano Gamero Aguilar

Estudo da biocompatibilidade do cimento de aluminato de cálcio para uso odontológico, avaliação do pH, liberação de íons cálcio e atividade antimicrobiana.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor no Programa de Reabilitação Oral.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Profª Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires - de - Souza

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica criada pela Biblioteca Central do Campus USP- Ribeirão Preto

Aguilar, Fabiano Gamero

Estudo da biocompatibilidade do cimento de aluminato de cálcio para uso odontológico, avaliação do pH, liberação de íons cálcio e atividade antimicrobiana. Ribeirão Preto, 2012.

130 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Pires-de-Souza, Fernanda de Carvalho Panzeri

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabiano Gamero Aguilar

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A **Deus**,*

pela presença constante,

pelas oportunidades

e pela força interior que me impulsionou a seguir em busca de meus sonhos,

mesmo nos momentos que fraquejei.

*Ao meu pai **Antonio Gomes Aguilar Filho***

*e minha mãe **Claudia Helena Gamero Aguilar***

que sempre me ensinaram o caminho certo a seguir, abrindo mão de uma vida

para amar e educar seus filhos.

Obrigado pelo amor incondicional, suporte emocional nos momentos de

necessidade e confiança.

Obrigado por serem tão especiais e me apoiar sempre.

*Ao meu irmão **Carlos Eduardo Gamero Aguilar** que embora distante, faz falta*

em casa para que a família esteja completa.

*A minha namorada **Ana Paula**, que entrou em minha vida para fazer com que eu entendesse o verdadeiro significado de companheira e que sempre me apoia e coloca para cima nos momentos em que mais precisei, Te Amo.*

Agradecimentos

A Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, onde obtive minha formação como Cirurgião-Dentista e Mestre, e pela oportunidade de realização do curso de Doutorado, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

Aos Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, nas pessoas do chefe do departamento Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon.

À atual Coordenadora da Pós-Graduação em Reabilitação Oral e minha orientadora, Profª Dra Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza por sua incansável batalha para levar nosso curso de pós-graduação ao nível de exelência que hoje se encontra.

As Professoras Maria de Fátima Jurca da Motta, Valéria Oliveira Pagnano de Souza, Cláudia Helena Lovato da Silva e Camila Tirapelli, pelos momentos de trabalhos divididos nas atividades clínicas, foram grandes colaboradoras em minha formação sendo exemplos a ser seguido.

Ao Prof. Evandro Watanabe pelo auxílio para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Dr. Lucas da Fonseca Roberti Garcia pelo auxílio para a realização deste trabalho, e pelas palavras em momentos difíceis, sempre dando força para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de pós-graduação pelo excelente convívio.

A todos os colegas integrantes do Laboratório de Análise de Biomateriais (Laabio), Diogo Rodrigues Cruvinel, Fabricio Mariano Mundim, Carla Cecilia Alandia Román, Lourenço de Morais Rego Roselino, Brahim Drubi Filho, Ana Beatriz Souza, Dani e Lucas da Fonseca Roberti Garcia, pelos momentos divididos no laboratório.

Aos Técnicos Marco Antonio dos Santos, Nilza Letícia Magalhães, Adriana de Mattos Gonçalves da Silva, Rafaella Tonani e Francisco Roselino (in memoriam) pelo suporte no desenvolvimento dos trabalhos.

Às funcionárias

Regiane de Cássia Tirado, Ana Paula Xavier, Regiane C. Moi Sacilotto, Isabel Cristina Galino Sola e Fernanda Talita de Freitas, por todo suporte a mim oferecido durante o curso.

À CNPQ e a CAPES pelo auxílio financeiro para a realização do Doutorado.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuiram para o desenvolvimento deste trabalho,

Muito Obrigado.

Agradecimentos Especiais

*A minha orientadora, **Profª Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza**,*

sempre um exemplo de disciplina, serenidade, determinação

e dedicação à odontologia. Agradeço pela oprtunidade de trabalharmos juntos

desde o início de minha graduação,

por todos os ensinamentos transmitidos, e pela enorme contribuição em minha

formação. Meu reconhecimento e sinceros agradecimentos.

*A empresa **Binderware** pela oportunidade em realizar esse trabalho, fornecendo*

todo tipo de auxílio necessário para o desenvolvimento do projeto, sem os quais

seria inviável a realização do mesmo.

AGUILAR, F. G. Estudo da biocompatibilidade do cimento de aluminato de cálcio para uso odontológico, avaliação do pH, liberação de íons cálcio e atividade antimicrobiana. Ribeirão Preto, 2012. 130p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o pH, a liberação de íons cálcio, a atividade antimicrobiana *in vitro* de cimento de aluminato de cálcio (EndoBinder) com diferentes radiopacificadores (óxido de bismuto, óxido de zinco e óxido de zircônia) e a biocompatibilidade do cimento acrescido de óxido de bismuto como agente radiopacificador, em comparação ao mineral trióxido agregado (MTA). Para a avaliação do pH e a liberação de íons cálcio, 25 amostras (n=5) de 2,0 x 10 mm foram obtidas de EndoBinder Puro (EBP), EndoBinder com Óxido de Bismuto (EBOB), EndoBinder com Óxido de Zinco (EBOZn), EndoBinder com Óxido de Zircônia (EBOZr) e Mineral Trióxido Agregado (MTA), que foram imersas em 10 ml água destilada e deionizada (pH=6,9). Após 2, 4, 12, 24, 48 horas, 7, 14 e 28 dias, foi medido o pH e a quantidade de íons cálcio da água onde as amostras foram imersas. Para a determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos cimentos (EBP, EBOB, EBOZN, EBOZr e MTA), foram obtidas 15 amostras de cada material (n=3) de 5,0 x 5,0 mm colocadas em contato com 5 tipos de microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus (*ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231) e a *Candida glabrata* (ATCC 2001) em placas de petri com Agar (Muller Hinton e Sabouraud Dextrose) deixadas em temperatura ambiente por 2 horas para a pré-difusão e depois incubadas a 37°C por 24 horas. Utilizou-se uma régua milimetrada com precisão de 0,5 mm para realizar as medidas dos halos de inibição em torno dos

corpos de prova. A biocompatibilidade dos materiais foi avaliada a partir da implantação de tubos de polietileno em tecido subcutâneo de 15 ratos machos, sendo 1 implante escapular e 1 pélvico, num total de 2 tubos por animal (n=5). Como controle, foi utilizada a lateral do tubo de polietileno. Após 7, 21 e 42 dias os animais foram sacrificados e os tecidos processados para a obtenção dos cortes histológicos e posterior análise histopatológica. Os resultados do ensaio de pH, liberação de cálcio e de atividade microbiológica foram submetidos à análise estatística (2-way ANOVA, Bonferroni, $p<0,05$). Os resultados de biocompatibilidade foram classificados quanto à severidade da reação inflamatória e quantificados em relação aos eventos presentes nas áreas pré-determinadas. Ao final de 28 dias não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre nenhum grupo, tanto para o pH quanto para a liberação de íons cálcio. MTA, EBP e EBOB apresentaram atividade antimicrobiana quando em contato com todos os microrganismos, e EBOZr e EBOZn apenas quando em contato com *Staphylococcus aureus* e *Candida glabrata.* A reação inflamatória observada com os implantes subcultâneos diminuiu no decorrer do período de análise, porém ao final de 42 dias MTA ainda apresentou uma discreta reação inflamatória, situação não encontrada com o EB. Desta forma, concluiu-se que EB apresentou propriedades químicas e biológicas semelhantes ao MTA, além de apresentar menor reação tecidual, sendo biocompatível quando testado em tecido subcutâneo de ratos.

Palavras-Chave: Cimento obturador**,** Biocompatibilidade, Atividade antimicrobiana, pH, liberação de íons cálcio.

AGUILAR, F. G. Biocompatibility, evaluation of pH, calcium ion release and antimicrobial activity of calcium aluminate cement for dental use. Ribeirão Preto, 2012. 130p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the pH, calcium ion release, *in vitro* antimicrobial activity of a calcium aluminate cement (EndoBinder) with different radiopacifiers (bismuth oxide, zinc oxide, or zirconium oxide) and the biocompatibility of calcium aluminate cement with bismuth oxide radiopacifier in comparison with the mineral trioxide aggregate (MTA). For the evaluation of pH and calcium ion release 25 sample (n=5) measuring 2,0 x 10 mm were obtained from EndoBinder Pure (EBP), EndoBinder with bismuth oxide (EBOB), EndoBinder with zinc oxide (EBOZn), EndoBinder with zirconium oxide (EBOZr) and mineral trioxide aggregate (MTA) wich were immersed in a flask containing 10 ml of deionized and distilled water (pH=6,9). After 2, 4, 12, 24, 48 hours and 7, 14, 28 days, meassurements of the pH and calcium ion release from the water where the samples were immersed were assessed. To determine the *in vitro* antimicrobial activity of the cements (EBP, EBOB, EBOZN, EBOZr and MTA) 15 samples of each material (n=3) measuring 5,0 x 5,0 mm were placed in contact with five types of microorganisms: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231) e a *Candida glabrata* (ATCC 2001) .The Muller–Hinton agar (MH) diffusion method was employed and the plates were kept at room temperature for 2 hours for pre diffusion and then incubated at 37 C° for 24 hours. Zones of inhibition around the specimens were measured using a 0.5mm precision millimeter ruler. The biocompatibility of the test materials was evaluated

from the implantation of 2 polyethylene tubes in the subcutaneous tissue of 15 male rats (n=5), 1 being scapular (EBOB) and 1 pelvic (MTA). The external tube wall was considered as the control group. After 7, 21 and 42 days animals were sacrificed, obtaining 5 tissue samples per group at each time interval of analysis then histological analysis was performed. The test results for pH, calcium ion release and *in vitro* antimicrobial activity were submitted to statistical analysis (two-way ANOVA, Bonferroni, $p < 0.05$). The results of biocompatibility were classified according to severity of inflammatory reaction and quantified in relation to present events in pre-determined areas. After 28 days there was no statistical difference ($p > 0.05$) between any group for both the pH and calcium ions release. MTA, EBP and EBOB showed antimicrobial activity against all microorganisms and EBOZr and EBOZn only against *Staphylococcus aureus* and *Candida glabrata*. The inflammatory reaction observed with subcutaneous implants decreased during the period of analysis however, after 42 days MTA still had a discrete inflammatory reaction, this situation was not found with EBOB. Thus, it was concluded that EB has been shown to have similar biological and chemical properties compared with MTA, it also showed less tissue reaction and biocompatibility when tested in rat subcutaneous tissue.

Keywords: sealer, biocompatibility, antimicrobial activity, pH and calcium ion release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tubos de PVC. 33
Figura 2 - Dimensão dos tubos de PVC. 33
Figura 3 - Preenchimento da seringa. 33
Figura 4 - Preenchimento do corpo. 33
Figura 5 - Corpos de prova radiografados para analise do preenchimento. 34
Figura 6 - Grupo EBOZr novo Rx. 34
Figura 7 - Grupo EBP novo Rx. 34
Figura 8 - Tubos Falcon. 35
Figura 9 - Colocação do corpo de prova. 35
Figura 10 - Analyser Microprocessado pH 2000. 35
Figura 11 - Soluções de pH conhecido (4,7). 35
Figura 12 - Espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer Analyst 100. 37
Figura 13 - Matriz de teflon. 38
Figura 14 - Dimensões dos corpos de prova. 38
Figura 15 - Matriz de Teflon preenchida. 39
Figura 16 - Guia para montagem das placas. 39
Figura 17 - Placas de Petri montadas. 39
Figura 18 - Preparo dos microrganismos. 39
Figura 19 - Inoculação dos micro-organismos com o meio de cultura. 39
Figura 20 - Placas de Petri prontas aguardando a pré difusão. 39
Figura 21 - Rattus novergicus, Wistar. 42
Figura 22 - Tubo de polietileno. 42
Figura 23 - MTA White. 42
Figura 24 - EndoBinder®. 42
Figura 25 - Tricotomia da região dorsal. 42
Figura 26 - Desinfecção com Iodo. 42
Figura 27 - Esquematização para implantação dos tubos. 44
Figura 28 - Incisão. 44
Figura 29 - Incisão escapular e pélvica. 44
Figura 30 - Divulsão com tesoura. 44
Figura 31 - Introdução dos tubos. 44
Figura 32 - Introdução dos tubos. 44
Figura 33 - Realização da Sutura. 46

Figura 34 - Região da biópsia excisional. 46
Figura 35 - Biópsia sendo realizada. 46
Figura 36 - Tubo com o material antes de ser biopsiado. 46
Figura 37 - Material identificado para envio ao laboratório. 46
Figura 38 - Peças na solução fixadora..... 46
Figura 39 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Staphylococcus aureus.* 54
Figura 40 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Escherichia coli.* 55
Figura 41 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Enterococcus faecalis.* 55
Figura 42 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Candida albicans.* 55
Figura 43 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Candida glabrata.* 56
Figura 44 - EBOB período de 7 dias,presença de vasos sanguíneos (VS), células gigantes inflamatórias (CGI), e a abertura tubular. 60
Figura 45 - Presença de macrófagos (MAC) fagocitando material disperso. 60
Figura 46 - Medidas da cápsula inflamatória EBOB 7 dias. 60
Figura 47 - EBOB 21 dias, medidas da cápsula inflamatória. 60
Figura 48 - EBOB 42 dias, medidas da cápsula inflamatória. 60
Figura 49 - MTAG 7 dias medida da cápsula..... 62
Figura 50 - Seta indicando fagocitose de resto de material disperso. 62
Figura 51 - Grupo controle, medida da cápsula 7 dias. 63
Figura 52 - Grupo controle, medida da cápsula com 21 dias..... 63
Figura 53 - Grupo controle, medida da cápsula com 42 dias..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cimentos utilizados no estudo. 32

Tabela 2 - Escore adotado para quantificar a reação tecidual. 48

Tabela 3 - Médias e desvio padrão do pH das amostras nos diferentes períodos. ...51

Tabela 4 - Média e desvio padrão da quantidade de íons cálcio em mg/dL nas amostras, nos diferentes períodos de avaliação. 52

Tabela 5 - Média do diâmetro em milímetros dos halos de inibição. 53

Tabela 6 - Eventos histopatológicos observados em cada grupo nos diferentes períodos de análise. 58

Tabela 7 - Espessura média (mm) da cápsula inflamatória na Interface com os cimentos testados (EBOB e MTA) e Controle após períodos de 7, 21 e 42 dias. 58

Tabela 8 - Valores encontrados para células polimorfonucleares e mononucleares em 7 dias. 108

Tabela 9 - Valores encontrados para fibroblastos em 7 dias. 109

Tabela 10 - Valores encontrados para vasos sanguíneos em 7 dias. 110

Tabela 11 - Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 7 dias. 111

Tabela 12 - Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 7 dias. ...112

Tabela 13 - Valores encontrados para espessura da cápsula fibrosa (µm) em 7 dias. 113

Tabela 14 - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 7 dias. 114

Tabela 15 - Valores encontrados para células polimorfonucleares e mononucleares em 21 dias. 115

Tabela 16 - Valores encontrados para fibroblastos em 21 dias. 116

Tabela 17 - Valores encontrados para vasos sanguíneos em 21 dias. 117

Tabela 18 - Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 21 dias. 118

Tabela 19 - Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 21 dias. 119

Tabela 20 - Valores encontrados para espessura da cápsula fibrosa (µm) em 21 dias. 120

Tabela 21 - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 21 dias. 121

Tabela 22 - Valores encontrados para células polimorfonucleares e mononucleares em 42 dias. 122

Tabela 23 - Valores encontrados para fibroblastos em 42 dias. 123

Tabela 24 - Valores encontrados para vasos sanguíneos em 42 dias. 124

Tabela 25 - Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 42 dias. 125

Tabela 26 - Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 42 dias. 126

Tabela 27 - Valores encontrados para espessura da cápsula fibrosa (µm) em 42 dias. 127

Tabela 28 - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 42 dias. 128

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE TABELAS 17
1. Introdução.....20
2. Proposição.....29
3. Materiais e Métodos.....31
3.1 Avaliação do pH e da liberação de Íons Cálcio.....32
3.2 Avaliação In Vitro da atividade Antimicrobiana. 37
3.3 Teste de implantação subcutânea em ratos.....40
4. Resultados.....49
4.1 Análise do pH.....50
4.2 Liberação de íons cálcio.....52
4.3 Atividade Antimicrobiana.....53
4.4 Implantes Subcultâneos em ratos. 56
5. Discussão 65
5.1 Análise do pH e liberação de íons cálcio.....67
5.2 Análise da atividade antimicrobiana.....71
5.3 Análise da Biocompatibilidade. 72
6. Conclusão.....77
7. Referências.....79
8. Apêndice.....90
9. Anexo.....129

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica tem atingido altos índices de sucesso graças ao desenvolvimento de técnicas e materiais que permitem a solução de grande parcela dos casos. Dentro da Endodontia, certos procedimentos clínicos como apicificação, pulpotomia, cirurgias parendodônticas e o reparo de reabsorções e perfurações radiculares necessitam de um cimento selador específico para que se obtenha sucesso no tratamento clínico (Ørstavik *et al.* 2001).

O Agregado Trióxido Mineral (MTA, Angelus, Londrina, PR, Brazil) foi originalmente desenvolvido como um material para obturação retrógada (Torabinejad et al. 1999**,** Al-Kahtani *et al.* 2005, Vosoughhosseini *et al*. 2008) e tornou-se comercialmente disponível em duas formas, o cinza e o branco. A diferença entre eles está na redução de concentração de óxido de ferro, que é responsável pela cor cinza do material (Asgary *et al.* 2005). Porém, ele tem sido aplicado em diversas situações clínicas como capeamento pulpar (Accorinte *et al.* 2008), pulpotomia (Menezes *et al.* 2004), reparo em perfurações (Main *et al.* 2004), tratamento de dentes traumatizados com apicificação incompleta (Simon *et al.* 2007), tratamento de reabsorções radiculares (Hsien *et al.* 2003, Jacobovitz & Lima, 2008), material para barreira intracoronária prévia ao clareamento dental e como plug apical (Saunders 2008, Nair *et al.* 2008, Bogen & Kuttler 2009).

O MTA é composto de: cimento Portland (75% peso), óxido de bismuto (20% peso), sulfato de cálcio desidratado (5% peso) (Jacobovitz *et al*. 2009). O cimento Portland é constituído por SiO_2 (21.2 peso%), CaO (68.1 peso%),Al_2O_3 (4.7 peso%), MgO (0.48 peso%) e Fe_2O_3 (1.89 peso%). Com a adição de água o cimento hidrata e forma-se o gel de sílica hidratada (Camilleri e Pitt Ford, 2006).

Cimentos utilizados rotineiramente na terapia endodôntica são aplicados em íntimo contato com os tecidos periapicais devendo, portanto, apresentar adequada

compatibilidade biológica (Accorinte *et al*. 2008). Dentre estes cimentos, destaca-se o MTA, desenvolvido originalmente como material para obturação retrógada e tratamento de perfurações radiculares e de furca (Al-kahtani *et al.* 2005, Andelin et al. 2003), mas devido ao seu bom desempenho clínico e biocompatibilidade (Accorinte *et al*. 2008, Al-kahtani *et al*. 2005) tem sido utilizado em diversas outras situações, dentre elas, capeamento pulpar (Asgary *et al*. 2005) e pulpotomia (Bakland 2000).

As característicasdesejáveis em um material para obturação retrógrada são: estabilidade dimensional, insolubilidade, radiopacidade, fácil manipulação e inserção, tempo de presa adequado, adequada atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e a capacidade para estimular a formação de tecido mineralizado (Gartner *et al.* 1992). Nenhum material apresenta todas essas propriedades. Portanto, a busca pelo desenvolvimento de um material de preenchimento ideal é continua.

Desde a introdução na odontologia por Lee *et al*. (1993), vários estudos têm demonstrado as excelentes propriedades do MTA, incluindo a alta capacidade de vedação e adaptação nas paredes dentinárias (Torabinejad *et al*. 1993), alta radiopacidade (Torabinejad *et al*. 1995), alcalinidade e a liberação de íons cálcio (Duarte *et al*. 2003 ; Santos *et al*. 2005).

O MTA apresenta atividade antimicrobiana (Estrela *et al*. 2000; Sipert *et al*. 2005), porém sua propriedade mais interessante é a estimulação a deposição de tecido mineralizado (Holland et al. 2001; Cintra et al. 2006). A combinação de todas essas propriedades faz com que o MTA seja o material de escolha para casos de obturação retrógrada e casos de perfuração em cirurgias endodônticas.

MTA é capaz de induzir a formação de tecido duro reparador em polpas expostas, além de promover maior formação de pontes de dentina que materiais

anteriormente utilizados para tal função (Ber *et al*. 2007, Bernabé *et al*. 2003). Estudos relataram que o processo de reparação pulpar em humanos é induzido de forma mais eficaz pelo MTA do que pelo hidróxido de cálcio, conhecido por causar inicialmente inflamação e necrose da área próxima a exposição (Bernabé *et al*. 2003, Bogen *et al*. 2009).

O processo de reparo promovido pelo MTA tem início durante a hidratação do material, quando disilicato e trisilicato de cálcio reagem para formar hidróxido de cálcio e gel de silicato de cálcio hidratado, produzindo um pH alcalino (Brown *et al*. 1931). Íons cálcio são então liberados, e difundidos através dos túbulos dentinários, sendo que a sua concentração aumenta conforme decorre o tempo de presa do material (Camilleri *et al*. 2006).

Assim a liberação de cálcio e um pH alcalino proporcionado pela presença de um material reparador que contenha hidróxido de cálcio ou óxidos em sua composição, são circunstâncias desejáveis e extremamente importantes para o bom desempenho biológico e microbiológico do material.

Apesar da reconhecida capacidade reparadora de MTA, algumas características negativas do material devem ser levadas em consideração, como longo tempo de presa, o que dificulta sua aplicação (Craig *et al*. 2004, Dammaschke *et al*. 2005), dificuldade de manipulação, que o torna altamente instável e compromete suas propriedades mecânicas (De Souza *et al*. 2007 e 2008), baixa capacidade de escoamento (Al-kahtani *et al*. 2005) e alto índice de manchamento das estruturas dentais (Duarte *et al*. 2005, Ersin *et al*. 2005). Tais pontos justificam o desenvolvimento de novos materiais odontológicos, com propriedades mecânicas adequadas e biologicamente compatíveis (Ese 2006).

Vasconcelos *et al*, (2009) avaliaram o pH e a liberação de íons cálcio de 6 materiais utilizados para obturação endodôntica e perfuração radicular: MTA

ProRoot cinza, MTA-Angelus cinza, MTA-Angelus branco e CPM, que foram comparados a dois outros experimentais – MTA experimental, baseado em cimento Portland com um líquido modificado e MBPC que é uma resina epóxi-à base de cimento contendo hidróxido de cálcio. Depois de 3, 24, 72, e 168 horas a água em que cada amostra foi imersa foi testada para determinar o pH e liberação de íons cálcio. Todos os materiais analisados apresentaram pH alcalino e capacidade de liberar íons de cálcio, no entanto, uma tendência de redução destas características foi observado para todos os materiais analisados, com exceção do MBPC, que revelaram um ligeiro aumento de pH entre os três períodos iniciais. Os resultados sugerem que todos os materiais testados apresentaram pH alcalino e capacidade de liberação de cálcio.

Vivan *et al* (2010), avaliaram o pH, liberação de cálcio, o tempo de presa, e solubilidade de dois MTAs comercialmente disponíveis (MTA branco Angelus e MTA Bio) e de três cimentos experimentais (MTA fotopolimerizável, cimento Portland com óxido de bismuto 20% e sulfato de cálcio 5%, e um resina epóxica com base em cimento). Para avaliação do pH e liberação de íons cálcio, tubos de polietileno com 1,0 mm de diâmetro interno e 10,0 mm de comprimento foram preenchidos com os cimentos e imediatamente imersos em frascos contendo 10 mL de água deionizada. Após 3, 24, 72 e 168 horas, os tubos foram removidos e a água do recipiente anterior teve seu pH e o teor de cálcio medido com um medidor de pH e um espectrofotômetro de absorção atômica. Para a análise do tempo de presa, agulhas de Gillmore pesando 100 g e 456,5 g foram usadas, de acordo com a American Society for Testing. Solubilidade de cada cimento também foi testada. Todos os cimentos foram alcalinos e apresentaram liberação íons de cálcio, com uma tendência decrescente ao longo do tempo. Após 3 horas, Cimento Portland +óxido de bismuto e MTA Bio teve o maior pH e o MTA fotopolimerizado o mais baixo. Após

uma semana, MTA Bio teve o maior pH e o MTA fotopolimerizado e o cimento epóxico à base de resina os mais baixos. Em relação aos íons cálcio, após 3 horas, o cimento Portland+ óxido bismuto apresentou a maior liberação. Após uma semana, MTA Bio teve a maior liberação de íons cálcio. Cimento epóxico à base de resina e MTA fotopolimerizado tiveram as menores liberações em todos os períodos de avaliação. Sobre os tempos de presa, os menores tempos de presa foram observados em MTA branco Angelus e MTA Bio; cimento Portland+ óxido bismuto apresentaram um tempo de presa intermediário, e a resina epóxica com base em cimento o maior tempo de presa. Os materiais que apresentaram os menores valores de solubilidade foram a resina epóxica, cimento Portland+óxido de bismuto e MTA fotopolimerizável. Os maiores valores de solubilidade foram apresentados pelo MTA branco Angelus e MTA Bio. O MTA branco Angelus e MTA Bio tiveram os menores tempos de presa, maior pH e liberação de íons cálcio, e solubilidade maior. Em contraste, a resina epóxica e MTA fotopolimerizado apresentaram valores mais baixos de solubilidade, pH e liberação de íons cálcio.

Min *et al* (2008) avaliaram o efeito do MTA na formação de pontes de dentina e na expressão de sialoproteína dentinária e Heme Oxigenase-1 na polpa dental humana. Para tal avaliação foram utilizados 20 terceiros molares de 16 pacientes, onde foram causadas exposições pulpares e realizados os capeamentos diretos com o MTA e o Hidróxido de cálcio (controle). Após 2 meses, os dentes foram extraídos e preparados para as avaliações. Histologicamente, 100% dos dentes do grupo MTA desenvolveram pontes dentinárias, contra 60% do grupo hidróxido de cálcio. Os resultados indicam que o MTA é superior ao hidróxido de cálcio no que diz a indução do processo de dentinogênese em dentes humanos que foram capeados.

Sipert *et al*, (2005) determinaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do Sealapex, MTA, cimento Portland e o EndoRez quando em contato com várias

espécies de microorganismos. O método de difusão em Muller Hinton ágar (MH) foi empregado. A base foi feita utilizando ágar MH e cinco poços foram feitos através da remoção de ágar em pontos eqüidistantes. Os materiais testados foram colocados nos poços imediatamente após a manipulação, em placas semeadas com os microorganismos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 2 horas para pré-difusão e então incubadas a 37° C por 24 horas. Alíquotas de 10 mL de 0,05% trifeniltetrazólio gel de cloreto foram adicionados para a otimização e as zonas de inibição foram medidas. Sealapex e Fill Canal demonstraram atividade antimicrobiana para todos os microorganismos. Para MTA e cimento Portland, só o *E. coli* não foi inibido. Nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada por EndoRez, ao contrário de todos os outros materiais testados.

Ribeiro *et al* (2010) testaram a hipótese de que a atividade antimicrobiana do MTA na cor cinza (GMTA) e MTA de cor branca (WMTA) está relacionada com a indução de espécies reativas de oxigênio(ROS). Atividade antimicrobiana *in vitro* do MTA foi realizada utilizando *E.coli* mutante (AB2463-RecA13), o triplo mutante (BW535) e tipo selvagem (AB1157). O método de difusão em agar Müller-Hinton (MHA) foi utilizado. A camada de base foi feita usando MHA e 4 poços foram feitos através da remoção de ágar em pontos eqüidistantes. MTA foi colocado nos poços imediatamente após a manipulação. As placas foram incubadasa 37°C por 48 horas sob condições aeróbia e anaeróbia e zonas de inibição foram medidas. Também foram avaliados os danos causados ao DNA do plasmídeo na presença do cimento através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Foi possível observar uma zona de inibição em condições aeróbias promovido por ambos os cimentos em *E.coli*

mutante, mas não na *E.coli* do tipo selvagem. Por outro lado, ambos os cimentos não foram capazes de induzir qualquer inibição bacteriana em condições anaeróbias, sugerindo que a ação inibitória é um resultado da produção de ROS. Ambos os cimentos promoveram danos no DNA plasmídeo, quando comparado com água destilada (controle). Concluiram que o MTA em condições aeróbias provocou atividade antimicrobiana por indução de ROS. Além disso, a atividade antimicrobiana ocorreu por danos causados diretamente ao DNA bacteriano.

O mecanismo de formação de dentina reparadora após a utilização de hidróxido de cálcio é conhecido por causar inicialmente inflamação e necrose na área próxima da exposição (Kuratate et al, 2008). Efeitos como estes justificam o desenvolvimento de novos materiais odontológicos não tóxicos e biologicamente compatíveis com a polpa.

Um novo cimento endodôntico, a base de aluminato de cálcio (número de patente PI0704502-6, 2007), chamado EndoBinder (Binderware, São Carlos, SP, Brasil), foi desenvolvido com o intuito de se preservar as propriedades e aplicações clínicas do mineral trióxido agregado (MTA) presente no mercado, porém sem as suas desvantagens.

O EndoBinder é composto de (% peso) Al_2O_3 (≥68.5), CaO (≤ 31), SiO_2 (0.3-0.8), MgO (0.4-0.5) e Fe_2O_3 (<0.3) e segundo Pandolfelli *et al*. (2007) e Jacobovitz *et al.* (2009), apresenta propriedades biológicas e antimicrobiológicas adequadas.

O cimento pode ser produzido pela fusão de Al_2O_3 e $CaCO_3$, mistura ou através do processo de calcinação à temperaturas entre 1315 e 1425 °C, sendo este último o método mais viável para a produção do CAC, com uma composição mais uniforme. No método de fusão, Al_2O_3 e $CaCO_3$ são submetidos a temperaturas entre 1450 e 1550 ° C dentro de fornos elétricos de arco (O'driscoll, 2000). O aluminato de

cálcio formado é resfriado e então esmagado para a dimensão necessária das partículas. Em uma abordagem geral, a formação do CAC pode ser descrita através da seguinte reação química (O'driscoll, 2000):

$$CaCO_3 + Al_2O_3 \longrightarrow Ca\,(AlO_2)_2 + CO_2\uparrow$$

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o pH, a liberação de íons cálcio, a ação antimicrobiana *in vitro* de cimento de aluminato de cálcio (EndoBinder) com diferentes radiopacificadores, além da biocompatibilidade do EndoBinder acrescido de óxido de bismuto (EBOB), comparativamente ao MTA. Foram testadas duas hipóteses nulas: não há diferença entre os níveis de pH, liberação de cálcio e atividade antimicrobiana em função do radiopacificador de EndoBinder em relação ao MTA. A segunda hipótese testada foi que o EBOB apresenta menor resposta inflamatória que o MTA.

2. Proposição

2 Proposição

O objetivo desse estudo foi avaliar o pH, a liberação de íons cálcio e a atividade antimicrobiana de cimento de aluminato de cálcio (EndoBinder) utilizando como radiopacificadores óxido de bismuto, óxido de zinco e óxido de zircônia. Uma vez determinado o radiopacificador mais indicado, avaliar sua biocompatibilidade em comparação ao mineral trióxido agregado (MTA).

3. Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos.

Confecção dos corpos-de-prova

Os cimentos testados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Cimentos utilizados no estudo.

Materiais	Grupo	Fabricante
EndoBinder puro	EBP	
EndoBinder + 20% (peso) Bi_2O_3	EBBO	Binderware, São Carlos, SP,
EndoBinder + 20% (peso) ZnO	EBOZ	Brasil
EndoBinder + 20% (peso) ZrO_2	EBOZr	
MTA	MTA	Ângelus, Londrina, PR, Brasil

3.1 Avaliação do pH e da liberação de Íons Cálcio.

Para a avaliação do pH dos cimentos, foram obtidas 5 amostras para cada grupo, os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes e inseridos em tubos de cloreto de polivinil (PVC) (Fig. 1) medindo 10 mm de comprimento por 2,0 mm de diâmetro interno (Fig. 2), com auxílio de seringa plástica de 1 ml munida de agulha 1,2 x 40 (Figs. 3 e 4). Após o preenchimento, ambas extremidades dos tubos foram limpas e os mesmos foram radiografados para avaliação do preenchimento (Figs. 5, 6 e 7).

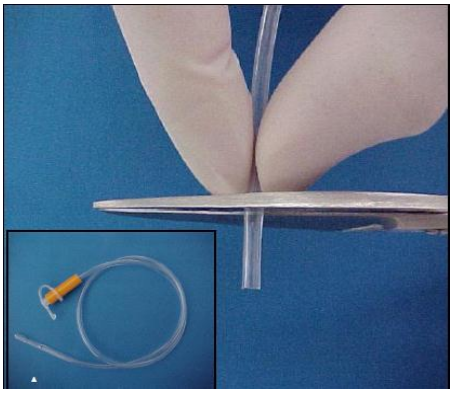


Figura 1 - Tubos de PVC.

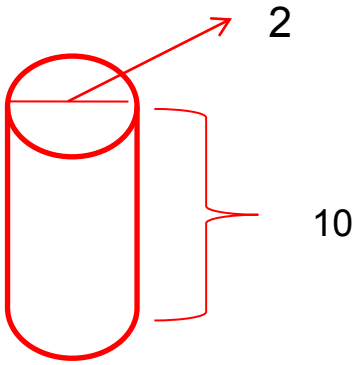


Figura 2 - Dimensão dos tubos de PVC.

Figura 3 - Preenchimento da seringa.

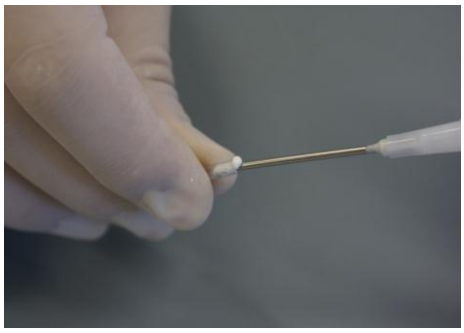


Figura 4 - Preenchimento do corpo.

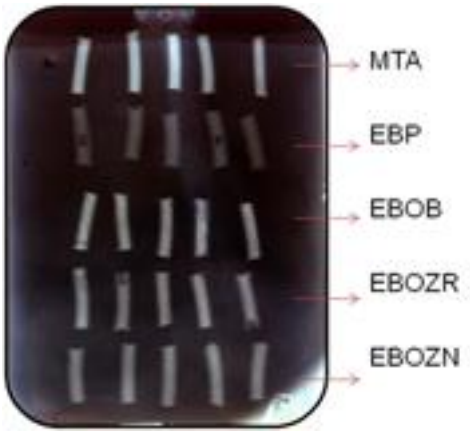


Figura 5 - Corpos de prova radiografados para analise do preenchimento.

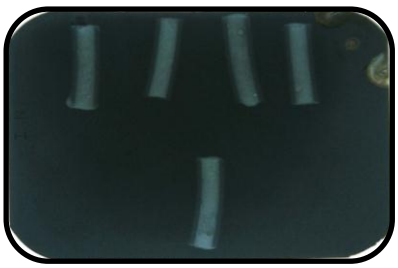


Figura 6 - Grupo EBOZr novo Rx.

Figura 7 - Grupo EBP novo Rx.

Após o preenchimento dos corpos de prova eles foram imediatamente imersos individualmente em tubos Falcon (BD Falcon™- USA) com tampas, contendo 10 ml de água destilada e deionizada com pH neutro (Figs. 8 e 9), e armazenados à 37°C. Após os períodos de pré-determinados de 2, 4,12, 24, 48 horas, 7, 14 e 28 dias foi realizada a avaliação do pH com um dispositivo para a medição do pH (Analyser Microprocessado pH 2000 – Instrutherm, São Paulo, São Paulo, Brasil) (Fig.10) onde o medidor de pH foi previamente calibrado com soluções de pH conhecido (4, 7) (Fig.11). Após cada mensuração do pH, que foi realizada em triplicata os tubos contendo os materiais eram removidos cuidadosamente dos frascos com o auxílio de uma pinça reta e colocados em novos frascos contendo 10 ml de água destilada e deionizada para análise posterior nos diferentes períodos. A

mesma solução armazenada em cada frasco foi utilizada para determinar o pH e a liberação de íons cálcio.

Figura 8 - Tubos Falcon.

Figura 9 - Colocação do corpo de prova.

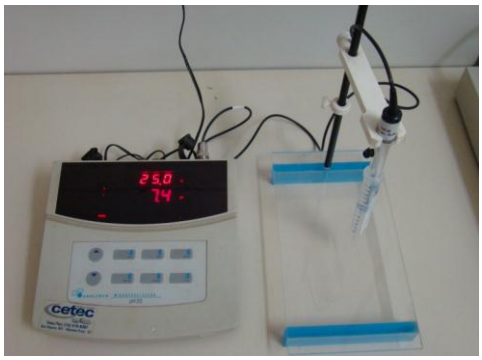


Figura 10 - Analyser Microprocessado pH 2000.

Figura 11 - Soluções de pH conhecido (4,7).

Para a avaliação do cálcio liberado, óxido de lantânio foi adicionado a todas as amostras para eliminar interferências iônicas, principalmente de íons fosfato. Uma solução-padrão de 10 mg/dL foi diluída em água para atingir as seguintes concentrações: 0,025 mg/dL, 0,05 mg/dL, 0,1 mg/dL, 0,25 mg/dL, 0,5 mg/dL, e 1,0 mg/dL.

Soluções contendo concentrações de cálcio de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 partes por milhão (ppm) foram utilizadas para criar uma curva padrão de cálcio com a qual os resultados foram comparados.

O espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer Analyst 100 (Perkin-Elmer Inc., Norwalk, CT, USA) (Fig.12) conectado a um computador foi utilizado para as avaliações dos íons cálcio liberados na solução. A amostra foi aspirada para uma câmara onde após ser misturada com acetileno (combustível) e com o oxidante (óxido nitroso) ela foi queimada. Uma lâmpada de cátodo oco, específica para os íons cálcio (comprimento de onda 422,7 nm e comprimento de fenda de 0,7 nm operando a 20 mA) atravessando a flama quantificava a liberação de íons cálcio nas amostras.

Após cada mensuração, que foi realizada em triplicata tanto para o pH quanto para a liberação de cálcio, média e desvio padrão do pH e liberação de cálcio de cada material em cada período experimental foram calculados. Esses dados foram estatisticamente analisados usando o teste de Analise de Variância a dois critérios (fatores de variação: materiais e tempo de imersão), teste de Bonferroni em 95% de nível de significância.

Figura 12 - Espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer Analyst 100.

3.2 Avaliação *In Vitro* da atividade Antimicrobiana.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos testados (MTA, EBP, EBOB, EBOZn e EBOZr), foram utilizados as seguintes amostras de micro-organismos liofilizadas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus (*ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231) e a *Candida glabrata* (ATCC 2001). Foram confeccionados 15 corpos de prova para cada cimento testado (n=3), com o auxílio de uma matriz de teflon de 5 mm de diâmetro interno por 5 mm de espessura (Figs.13 e 14).

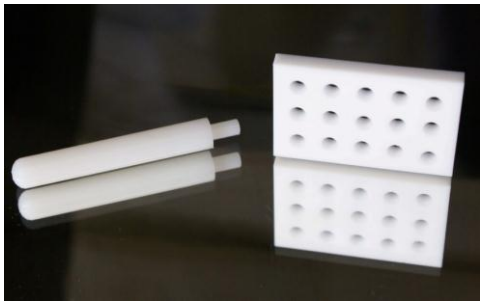


Figura 13 - Matriz de teflon.

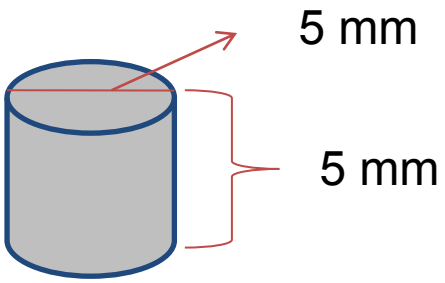


Figura 14 - Dimensões dos corpos de prova.

Os cimentos foram manipulados em uma placa de vidro com espátula 24 estéreis, de acordo com as informações dos fabricantes. Em seguida, foram inseridos na matriz de teflon (Fig.15). Após o preenchimento da matriz e aguardado um período de 10 minutos, um êmbolo de mesmo diâmetro da matriz foi utilizado empurrado o corpo de prova para a remoção da amostra da matriz.

Os microrganismos foram semeados em meio de Soyabean Casein Digest Medium (TryptoneSoyaBroth) (HiMedia, Mumbai, India), de acordo com as instruções do fabricante.

A cultura foi realizada em placas de Petri esterilizadas de 75 mm^2 e em cada placa foi colocado 1 corpo de prova de cada cimento avaliado, assim em cada placa, 5 corpos de prova eram colocados equidistantes, para a montagem das placas foi utilizada um guia confeccionado em papel (Fig. 16) onde a placa era colocada em cima para que todas as placas fossem montadas com a mesma disposição dos corpos de prova (Fig. 17). O meio de cultura Muller Hinton Agar (HiMedia, Mumbai, India) foi utilizado para as bactérias *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* e para a bactéria *Enterococcus faecalis foi utilizado o* Trypitic Soy Agar (HiMedia, Mumbai, India) e o Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, Mumbai, India) foi utilizado para os

fungos *Candida albicans e Candida glabrata.* Todos os meios foram previamente preparados de acordo com as informações dos fabricantes.

Figura 15 - Matriz de Teflon preenchida.

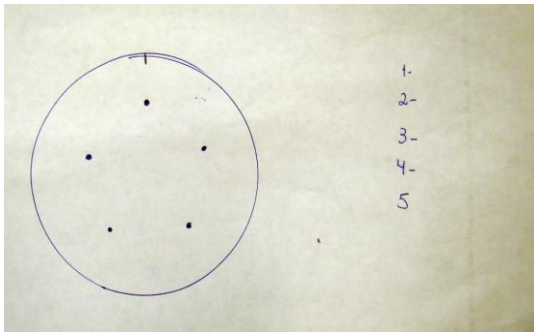


Figura 16 - Guia para montagem das placas.

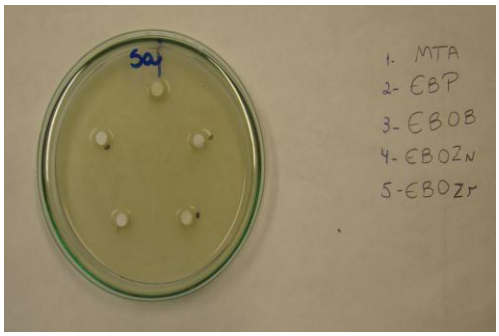


Figura 17 - Placas de Petri montadas.

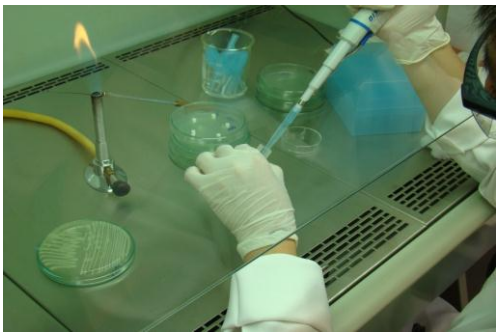


Figura 18 - Preparo dos microrganismos.

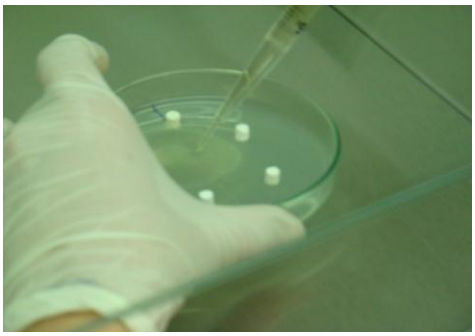


Figura 19 - Inoculação dos micro-organismos com o meio de cultura.

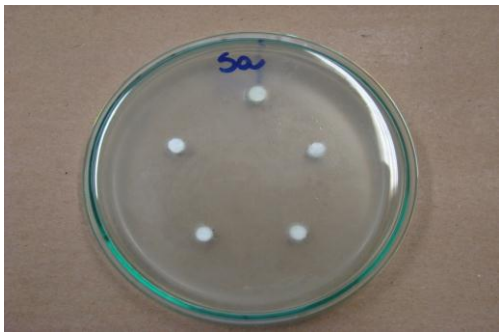


Figura 20 - Placas de Petri prontas aguardando a pré difusão.

A quantidade de microrganismos que foi inoculada em cada placa de petri foi quantificada pelo espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. Após essa fase, 8 ml de

uma solução composta de microrganismos juntamente com o meio de cultura foram colocados nas placas (Figs.18 e 19)

As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas para que ocorresse a pré-difusão dos materiais (Fig. 20) e então após esse período incubado a 37° C por 24 h. Dessa forma foram utilizadas 15 placas ao todo, sendo 3 placas para cada micro-organismo. As zonas de inibição em torno dos corpos de prova foram medidas com o auxílio de uma régua milimetrada com precisão de 0,5 mm. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente (1-way ANOVA, fator de variação material, com teste de Tukey, e nível de significância de 95%).

3.3 Teste de implantação subcutânea em ratos.

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com as determinações da comissão de ética no uso de animais sob o numero de protocolo (10.1.793.53.3).

Foram selecionados 15 ratos de mesma origem (*Rattus novergicus*, Wistar), machos e padronizados quanto a saúde, idade e peso (300g) (Fig. 21), sendo utilizados 5 espécimes para cada um dos períodos de avaliação (7, 21 e 42 dias). Os 15 ratos foram solicitados junto ao biotério central e condicionados no bioterio local da FORP.

Para a obtenção dos tubos de polietileno, foi seguida a metodologia utilizada por Souza Costa (2001), na qual um catéter de uretra com 0,8 mm de diâmetro interno foi seccionado sequencialmente com intervalos de 10 mm (Fig. 22).

Cada tubo após a secção teve uma de suas extremidades vedadas a quente com auxílio de uma pinça hemostática, onde a ponta da pinça foi aquecida com o auxílio de uma lamparina, esse procedimento foi realizado em todos os tubos para evitar o extravazamento do material a ser testado, assim, apenas uma das extremidades dos tubos poderia entrar em contato com os tecidos dos animais. Os

tubos foram autoclavados à 120ºC, por 30 minutos e em seguida separados em 2 grupos, conforme o material introduzido: EndoBinder® (Bindeware, São Carlos, São Paulo, Brasil): cimento de aluminato de cálcio acrescido de óxido de bismuto (Fig. 24) e o Mineral trióxido agregado - MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) (Fig. 23). Como controle, foi utilizada a lateral do tubo de polietileno.

Figura 21 - Rattus novergicus, Wistar.

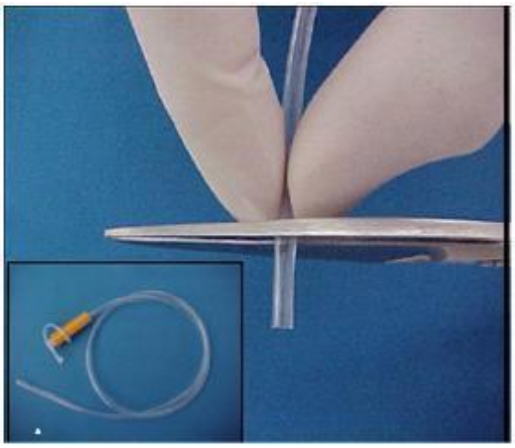


Figura 22 - Tubo de polietileno.

Figura 23 - MTA.

Figura 24 - EndoBinder®.

Figura 25 - Tricotomia da região dorsal.

Figura 26 - Desinfecção com Iodo.

Com o auxílio de espátulas e condensadores, os tubos foram preenchidos com os materiais testados. O EndoBinder foi manipulado com água destilada na proporção 0,21, ou seja 1,0g de material para 0,21ml de água destilada de acordo com as orientações do fabricante. Já para a manipulação do MTA também foram seguidas as orientações do fabricante, onde ele recomenda a utilização de uma medida de pó para uma gota de água destilada. Em uma placa de vidro limpa e estéril, os materiais foram manipulados com o auxílio de uma espátula 24 F também estéril.

Os animais foram anestesiados através da administração de injeção intraperitoneal de uma solução composta de cloridrato de cetamina 10% 75 mg/kg (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xilazina 10 mg/Kg (Dopazer, Laboratórios Calier S.A, Barcelona, Espanha).

A tricotomia da região dorsal do animal foi realizada com máquina de tosquia e a região foi desinfetada com iodopovidona (Figs. 25 e 26). Duas incisões com 5 mm de largura foram realizadas no dorso de cada animal (Fig. 28). A divulsão do tecido subcutâneo foi realizada com uma tesoura de ponta romba (Fig. 30), em uma profundidade de 20 mm em média, para que fosse obtida 2 lojas cirúrgicas, sendo 1 escapular (EndoBinder) e 1 pélvica (MTA) (Figs. 27 e 29).

Os tubos preenchidos com os materiais testados foram introduzidos com o auxílio de uma pinça, de forma que a abertura tubular ficasse em contato com o conjuntivo do animal, perpendicular a incisão, com sua abertura direcionada para a cabeça do animal e sutura com fio de seda 4-0 foi realizada (Figs. 31, 32 e 33).

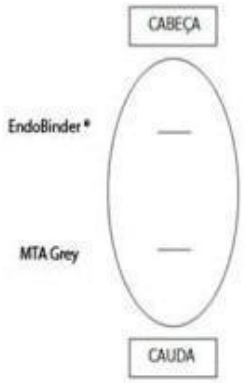


Figura 27 - Esquematização para implantação dos tubos.

Figura 28 - Incisão.

Figura 29 - Incisão escapular e pélvica.

Figura 30 - Divulsão com tesoura.

Figura 31 - Introdução dos tubos.

Figura 32 - Introdução dos tubos.

Após os períodos experimentais, os animais foram submetidos a nova tricotomia e a morte do animal foi realizada através de uma sobredosagem anestésica através da administração de injeção intraperitoneal de uma solução composta de cloridrato de cetamina 10% 225 mg/kg (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xilazina 30 mg/Kg (Dopazer, Laboratórios Calier S.A, Barcelona, Espanha) para realização de biópsia excisional da área do implante. As peças cirúrgicas foram removidas com uma margem de segurança de 2,0 cm ao redor do tubo e fixadas em pedaços de cartolina, e assim foram colocadas para a fixação em formalina a 10% tamponado (Figs. 34, 35, 36, 37 e 38)

Figura 33 - Realização da Sutura.

Figura 34 - Região da biópsia excisional.

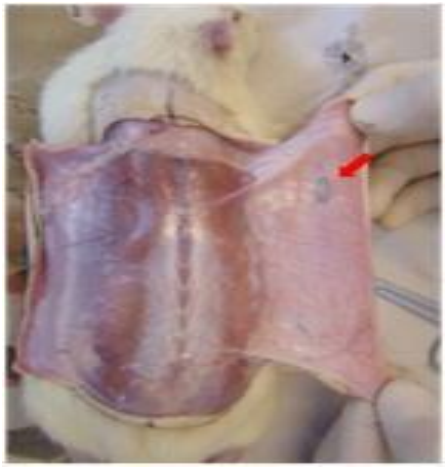


Figura 35 - Biópsia sendo realizada.

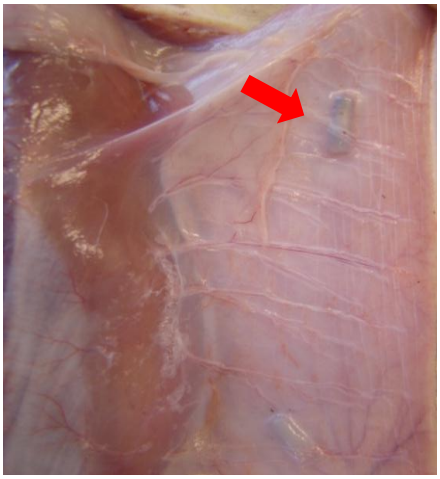


Figura 36 - Tubo com o material antes de ser biopsiado.

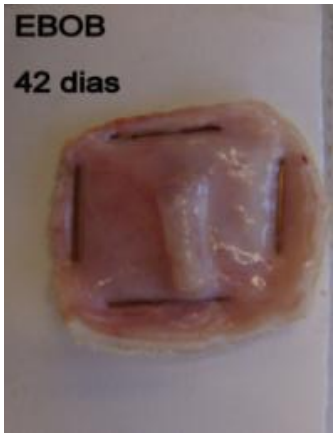


Figura 37 - Material identificado para envio ao laboratório.

Figura 38 - Peças na solução fixadora.

Após 24 horas de fixação, as peças cirúrgicas passaram pelo processamento laboratorial de rotina e foram incluídas em parafina para a confecção dos blocos que foram levados para a realização dos cortes no Micrótomo Leica. Antes de se realizar os cortes histológicos, os tubos de polietileno foram cuidadosamente removidos. Em seguida, foram obtidos cortes semi-seriados no sentido longitudinal, com espessuras de 5μm.

Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina e os seguintes eventos histopatológicosforam avaliados: infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e células mononucleares), capacidade de celularidade e vascularização (fibroblastos e vasos sanguíneos) e atividade macrofágica (fagócito mononuclear ou macrófago e células gigantes inflamatórias).

As reações inflamatórias foram classificadas de acordo com a norma ISO 7405 (2008):

- Ausência de reação inflamatória ou reação discreta: formação de cápsula fibrosa e ausência de células inflamatórias; ou presença de cápsula fibrosa com poucos linfócitos e plasmócitos.
- Reação inflamatória moderada: formação de cápsula fibrosa com presença de macrófagos, células polimorfonucleares e mononucleares.
- Reação inflamatória severa: formação de cápsula fibrosa e presença de grandes acúmulos de células polimorfonucleares e mononucleares, macrófagos, células gigantes inflamatórias e vasos sanguíneos congestos.

Com base nas reações inflamatórias acima descritas, foi utilizado um escore (Tabela 2) para graduar a reação tecidual provocada pelos diferentes materiais:

Tabela 2 - Escore adotado para quantificar a reação tecidual.

Grau	Significado
0	Ausente
1	Discreta
2	Moderada
3	Severa

As análises das amostras foram realizadas com base nas respostas teciduais estimuladas pelos cimentos testados, comparando-os entre si e ao controle. Foi considerado controle o tecido das regiões laterais do tubo de polietileno, mais precisamente na região intermediária entre as duas extremidades. Foram avaliados, por meio de análise histopatológica, os eventos a seguir descritos: infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e células mononucleares), capacidade de celularidade e vascularização (fibroblastos e vasos sanguíneos) e atividade macrofágica (fagócito mononuclear ou macrófago e células gigantes inflamatórias). Estes eventos histopatológicos foram avaliados e aferidos com imagens em aumento de 5, 10 e 40 vezes, utilizando-se um microscópio óptico Axio Star Plus (Carl Zeiss, Oberkachen, Germany) o microscópio possui uma câmera acoplada, que transfere a imagem para o computador mediante o uso do software Axio Vision 4.6 e através desse programa permitiu que fosse realizada a quantificação dos eventos histopatológicos. Quantificados os diversos componentes dos eventos histopatológicos, os dados obtidos foram submetidos à análise estatística.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Análise do pH.

Os valores médios do pH e o desvio padrão das amostras nos diferentes períodos podem ser vistos na tabela 3. O MTA apresentou os maiores valores de pH em todos os períodos de análise, variando de 8,0, no período inicial, a 9,4, após 28 dias. No período inicial, MTA não apresentou diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) em relação a EBP, havendo diferença significante ($p>0,05$) em relação aos demais grupos. Entre os grupos com EndoBinder, EBP apresentou diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) em relação aos grupos EBOB e EBOZn, mas não houve diferença ($p>0,05$) em relação a EBOZr. Não houve diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre EBOB e EBOZn.

Nos períodos de 4/12/24 horas, MTA apresentou diferença estatisticamente significante em relação a todos os demais grupos ($p < 0.05$), porém estes foram similares entre si ($p > 0.05$). No período de 48 horas MTA foi similar a todos os grupos exceto EBOZn ($p < 0.05$) e os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si ($p > 0.05$).

Aos 7 dias, MTA apresentou o maior valor de pH (9,4) e não apresentou diferença estatisticamente ($p>0,05$) em relação aos grupos EBOB e EBOZr, não havendo diferenças estatisticamente significantes ($p > 0.05$) entre todos os grupos de EndoBinder. No período de 14 e 28 dias todos os materiais apresentaram resultados similares, não havendo diferença estatisticamente significante entre eles ($p>0,05$).

Comparando o comportamento do mesmo material nos diferentes períodos de análise, observou-se que o cimento MTA teve seu pH aumentando progressivamente do período inicial até o período final, havendo diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) a partir dos 7 dias, sem diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre as amostras antes ou depois desse período. Para os cimentos a base de EndoBinder, ocorreu uma pequena oscilação entre os períodos de 2 a 24 horas, sem diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) para os grupos EBOB, EBOZn e EBOZr. Quando utilizado puro (EBP), houve diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) entre 2 e 4 horas, com diminuição do pH, permanecendo essa diferença até 24 horas, quando houve um aumento do pH progressivamente até 28 dias, sem diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) a partir de 7 dias.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão do pH das amostras nos diferentes períodos.

	MTA	EBP	EBOB	EBOZn	EBOZr
2 horas	8,0 (0,6) a A	7,6 (0,5) ac A	6,7 (0,1) b A	6,7 (0,1) b AB	7,1 (0,2) bc A
4 horas	8,1 (0,4) a A	6,6 (0,2) b B	6,8 (0,2) b A	6,5 (0,1) b A	6,7 (0,2) b A
12 horas	8,7 (0,8) a AB	6,7 (0,2) b B	6,7 (0,1) b A	6,6 (0,0) b AB	6,9 (0,6) b A
24 horas	8,2 (0,2) a A	6,7 (0,1) b B	6,9 (0,1) b AB	6,6 (0,1) b AB	6,8 (0,3) b A
48 horas	8,3 (0,2) a A	7,6 (0,2) ab A	7,6 (0,1) ab B	7,3 (0,3) b B	7,9 (0,3) ab BC
7 dias	9,4 (0,1) a B	8,4 (0,2) b C	9,1 (0,1) ab C	8,6 (0,2) b C	8,8 (0,2) ab D
14 dias	9,2 (0,4) a B	8,6 (0,3) a C	9,0 (0,1) a C	8,6 (0,3) a C	8,5 (0,3) a CD
28 dias	9,4 (0,4) a B	8,9 (0,5) a C	8,9 (0,4) a C	9,0 (0,4) a C	8,8 (0,5) a D

Letras diferentes minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferença estatisticamente significante.

4.2 Liberação de íons cálcio.

Os valores médios e o desvio padrão da quantidade de cálcio em mg/dL liberada pelas amostras nos diferentes períodos de avaliação, podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da quantidade de íons cálcio em mg/dL nas amostras, nos diferentes períodos de avaliação.

	MTA	EBP	EBOB	EBOZn	EBOZr
2 horas	0,60 (0,01)aA	1,54 (0,02)bA	0,57 (0,01)aA	0,68 (0,01)aA	1,06 (0,02)abA
4 horas	0,40 (0,01)aA	0,24 (0,01)aB	0,13 (0,01)aA	0,19 (0,00)aA	0,21 (0,01)aB
12 horas	0,54 (0,02) aA	0,30 (0,01)aB	0,24 (0,01)aA	0,23 (0,00)aA	0,23 (0,01)aB
24 horas	0,31(0,01) aA	0,18 (0,00)aB	0,19 (0,01)aA	0,16 (0,00)aA	0,17 (0,01)aB
48 horas	0,63(0,01) aA	0,46 (0,01)aB	0,52 (0,01)aA	0,35 (0,01)aA	0,36 (0,01)aB
7 dias	2,32 (0,04)aB	1,88 (0,04)aA	2,44 (0,05)aB	1,94 (0,02)aBC	2,02 (0,03) aCD
14 dias	2,00 (0,02)aB	1,84 (0,05)aA	2,00 (0,05)aB	1,81 (0,03)aB	1,76 (0,03)aC
28 dias	3,00 (0,07)aC	2,66 (0,06)aC	2,45 (0,07)aB	2,50 (0,05)aC	2,56 (0,06)aD

Letras diferentes minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferença estatisticamente significante.

Quando comparamos os diferentes materiais testados em um mesmo período de avaliação, apenas no período de 2 horas houve diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) do EBP em relação aos demais grupos, que não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p>0,05$). Nos demais períodos de análise, não houve diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre nenhum grupo.

4.3 Atividade Antimicrobiana.

A tabela 5 mostra os resultados do diâmetro médio em milímetros, dos halos de inibição dos microrganismos, proporcionado pelos cimentos testados.

Tabela 5 - Média do diâmetro em milímetros dos halos de inibição.

	MTA	EBP	EBOB	EBOZr	EBOZn
Staphylococcus aureus	**11,0 a**	**7,0 b**	**7,3 b**	**7,0 b**	**8,3 ab**
Escherichia coli	**10,0 a**	**7,0 a**	**8,0 a**	**-**	**-**
Enterococcus faecalis	**10,0 a**	**7,3 a**	**8,0 a**	**-**	**-**
Candida albicans	**13,7 a**	**7,0 b**	**8,3 b**	**-**	**-**
Candida glabrata	**20,3 a**	**9,0 b**	**10,3 b**	**9,0 b**	**8,0 b**

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatisticamente significante (P < 0,05).

Para o microorganismo *Staphylococcus aureus* (Fig. 39)*, o* MTA apresentou o maior halo de inibição, porém sem diferença estatisticamente significante (p>0,05) em relação a EBOZn, diferente estatisticamente (p<0,05) em relação aos demais grupos. Entre os grupos com EndoBinder, não houve diferença estatisticamente significante (p>0,05).

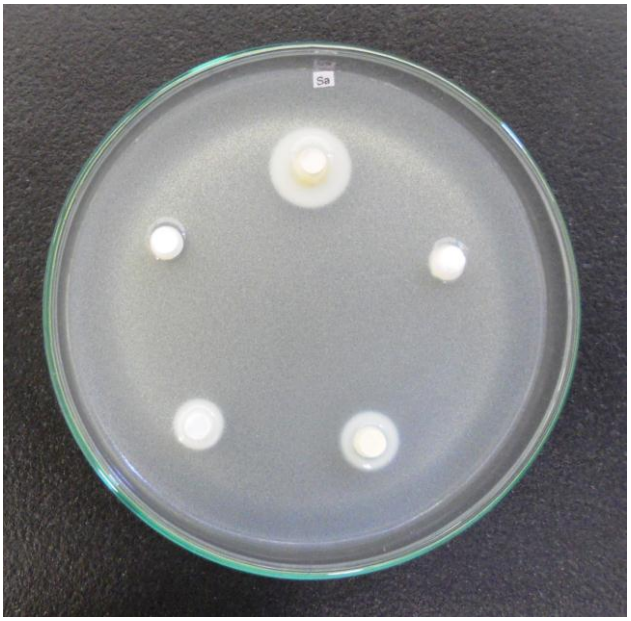


Figura 39 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Staphylococcus aureus.*

Para os microrganismos *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* (Figs. 40 e 41) os cimentos EBOZr e EBOZn não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana e os cimentos MTA, EBP e EBOB não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre si.

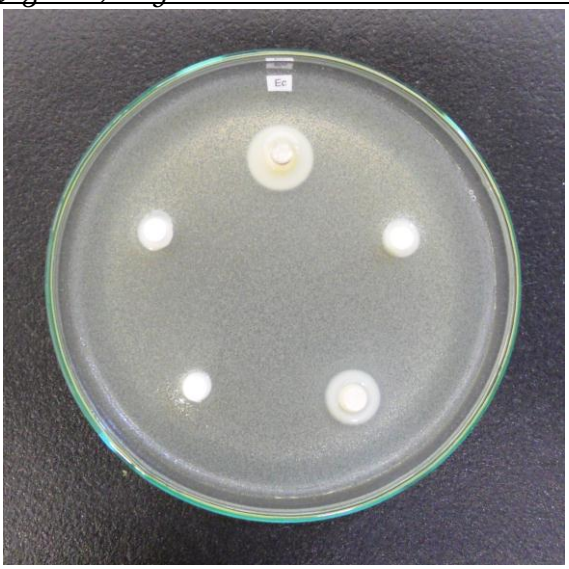


Figura 40 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Escherichia coli.*

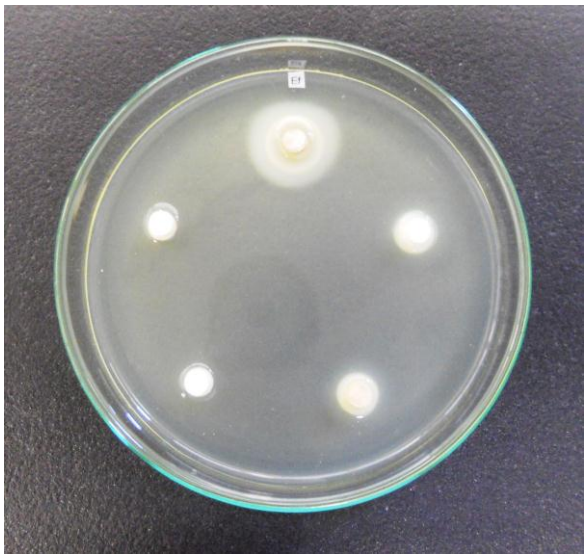


Figura 41 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Enterococcus faecalis.*

Quando os cimentos estiveram em contato com o microrganismo *Candida albicans* (Fig. 42), EBOZr e EBOZn não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana. O MTA apresentou diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) em relação aos grupos EBP e EBOB, que não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre si.

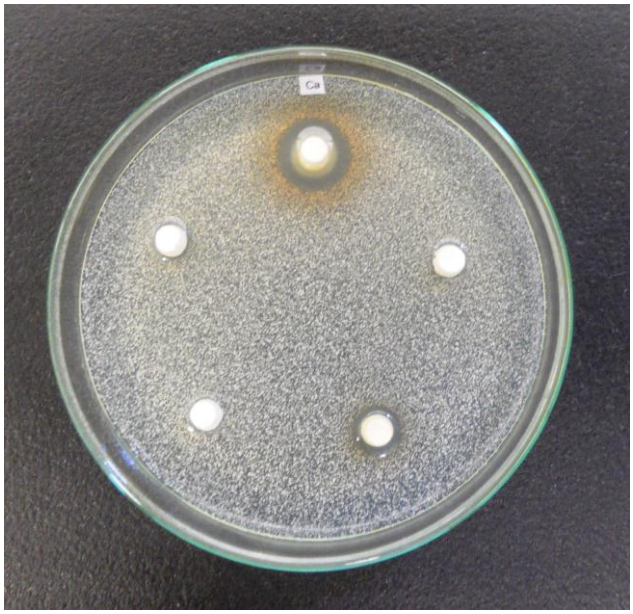


Figura 42 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Candida albicans.*

Para o microrganismo *Candida glabrata* (Fig. 43), o MTA apresentou diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) em relação a todos os grupos de Endobinder, que não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre si.

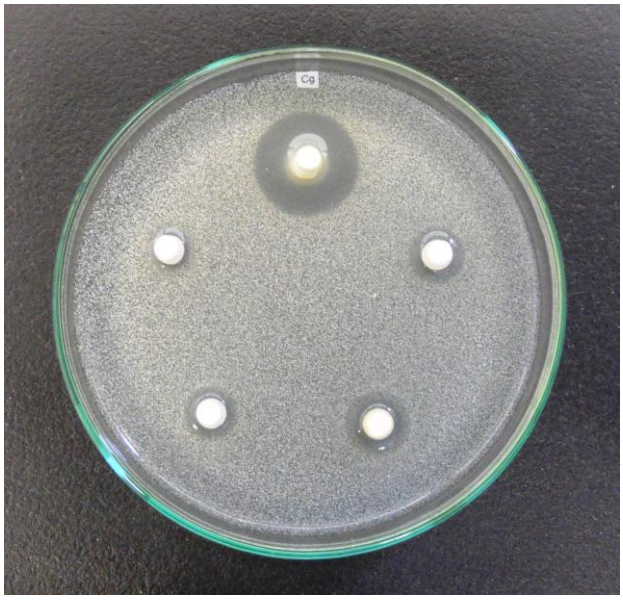


Figura 43 - Halos de inibição quando em contato com o microrganismo *Candida glabrata.*

4.4 Implantes Subcultâneos em ratos.

Os tecidos analisados correspondiam a fragmentos de tecido subcutâneo de ratos, onde se pode observar a epiderme, derme e parte da hipoderme. Entre a derme e a hipoderme observou-se espaços de formato retangular ou irregular, resultantes da remoção dos tubos de polietileno anteriormente implantados.

Os tubos tiveram uma das extremidades selada a quente com auxílio de instrumental pré-aquecido (pinça hemostática) e outra extremidade aberta para que o material testado entrasse em contato com o tecido subcutâneo. Assim foram

analisadas 2 áreas por tubo: uma em contato com a lateral do tubo plástico (controle negativo) e outra em contato com o material.

As reações inflamatórias foram classificadas de acordo com a norma ISO 7405 (2008):

- Ausência de reação inflamatória ou reação discreta: formação de cápsula fibrosa e ausência de células inflamatórias; ou presença de cápsula fibrosa com poucos linfócitos e plasmócitos.
- Reação inflamatória moderada: formação de cápsula fibrosa com presença de macrófagos, células polimorfonucleares e mononucleares.
- Reação inflamatória severa: formação de cápsula fibrosa e presença de grandes acúmulos de células polimorfonucleares e mononucleares, macrófagos, células gigantes inflamatórias e vasos sanguíneos congestos.

Com base nas reações inflamatórias acima descritas, foi utilizado um escore para graduar a reação tecidual provocada pelos diferentes materiais:

Grau	Significado
0	Ausente
1	Discreta
2	Moderada
3	Severa

Os valores obtidos para todos os eventos histopatológicos avaliados em cada período estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Eventos histopatológicos observados em cada grupo nos diferentes períodos de análise.

Eventos Histopatológicos	7dias			21 dias			42 dias		
	EB	GMTA	CG	EB	GMTA	CG	EB	GMTA	CG
Polimorfonucleares/ Mononucleares	2	2	2	2	2	1	1	1	0
Fibroblastos	2	2	1	1	1	0	1	1	0
Vasos sanguíneos	2	3	0	1	2	0	0	1	0
Macrofagos	2	2	1	1	2	0	1	1	0
Células Gigantes Inflamatórias	2	2	1	2	2	1	0	1	0

Score: (0) ausente; (1) discreta; (2) moderada; (3) severa.

Tabela 7 - Espessura média (mm) da cápsula inflamatória na Interface com os cimentos testados (EBOB e MTA) e Controle após períodos de 7, 21 e 42 dias.

Período	Grupos		
	EBOB	MTA	Controle
7	121.22 [a]	134.66 [a]	90.83 [b]
21	63.02 [ab]	81.75 [a]	56.29 [b]
42	41.74 [ab]	57.36 [a]	26.14 [b]

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa (P <0,05).

Grupo I (EBOB)

No período inicial de 7 dias, junto à abertura tubular, área onde foi realizada a principal análise, observou-se formação de cápsula fibrosa com uma espessura média de 121,22 µm com presença de uma moderada infiltração de células polimorfo e mononucleares. Também foi verificada a presença de moderada

proliferação fibroangioblástica e moderada colageinização, com neoformação de vasos sanguíneos, porém não houve sinal de congestão. Foi observada ainda moderada presença de fagócitos mononucleares (macrófagos) e células gigantes inflamatórias, onde estas se apresentavam na sua maioria periféricas a área de análise, sem resíduo necrótico (Figs. 44, 45 e 46). Aos 21 dias observou-se uma redução na espessura da cápsula inflamatória que passou a ter uma espessura média de 63 µm e houve um decréscimo no número de células do infiltrado inflamatório e discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por células gigantes inflamatórias. Não foram evidenciados focos de mineralização ou necrose adjacente à área de análise (Fig. 47). Aos 42 dias a cápsula inflamatória atingiu a espessura média de 41,7 µm e pôde-se observar um infiltrado inflamatório discreto, com a presença de um reduzido número de células mononucleares. Neste período não foram observadas células gigantes inflamatórias, além de uma discreta quantidade de fagócitos mononucleares. Ainda pôde ser observada uma discreta/ausente proliferação fibroangioblástica. Também neste período não foram observados sinais de mineralização, necrose ou efeitos residuais de material disperso (Fig.48). O índice geral de inflamação (IGI) neste período ficou em 0 (ausente), comprovando a compatibilidade biológica do material.

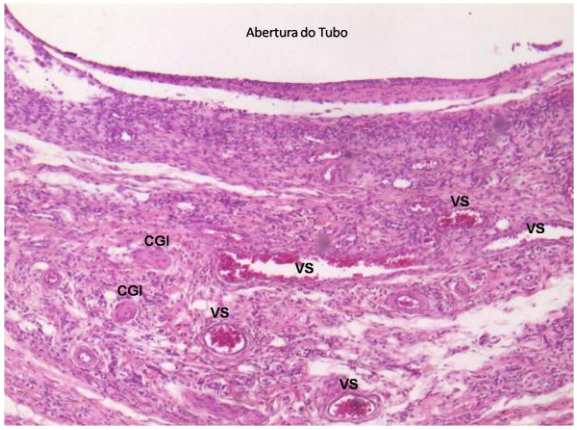


Figura 44 - EBOB período de 7 dias,presença de vasos sanguíneos (VS), células gigantes inflamatórias (CGI), e a abertura tubular.

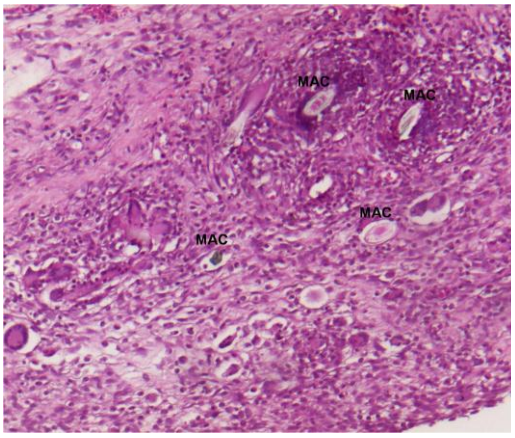


Figura 45 - Presença de macrófagos (MAC) fagocitando material disperso.

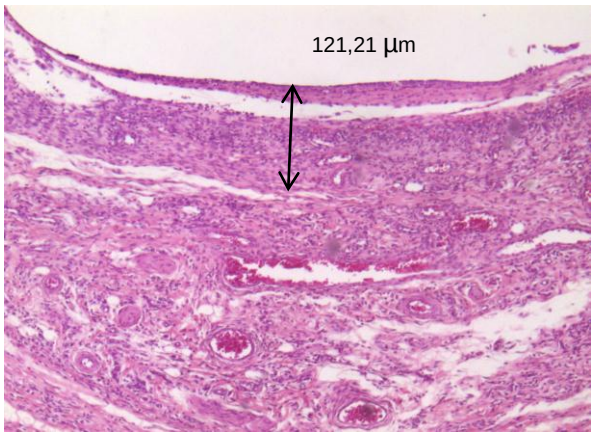


Figura 46 - Medidas da cápsula inflamatória EBOB 7 dias.

Figura 47 - EBOB 21 dias, medidas da cápsula inflamatória.

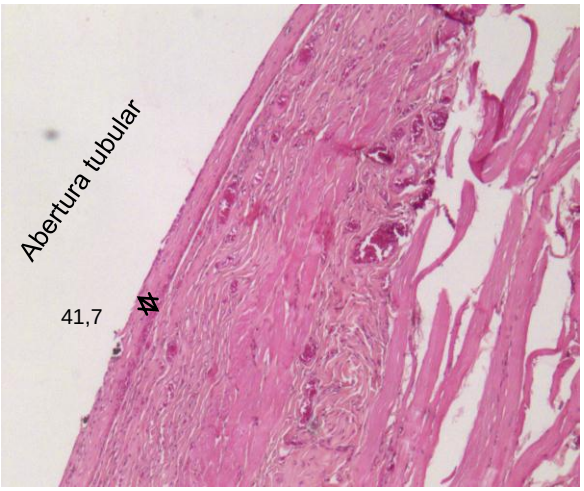


Figura 48 - EBOB 42 dias, medidas da cápsula inflamatória.

GRUPO II (MTA)

No período inicial de 7 dias observou-se formação de cápsula fibrosa com uma espessura média de 134,66 µm com moderada infiltração de células polimorfo e mononucleares. Foi observada intensa proliferação fibroangioblástica e moderada colageinização, com presença de vasos sanguíneos congestos, indicativo de formação de edema (Fig. 49). Foi observada ainda moderada presença de fagócitos mononucleares (macrófagos) e células gigantes inflamatórias, muitas realizando a fagocitose de resíduos de material dispersos (Fig. 50). Foi encontrado mínimo residual necrótico e ausência de calcificação. Aos 21 dias observou-se decréscimo na espessura da cápsula inflamatória que atingiu uma espessura média de 81,70 µm e assim houve uma redução no número de células do infiltrado inflamatório e discreta/moderada atividade macrofágica, exercida por fagócitos mononucleares e células gigantes inflamatórias. Também se pôde observar decréscimo no número de vasos sanguíneos congestos, caracterizando diminuição na formação de edema periférico a área de análise. Não foram observados focos de mineralização ou necroses adjacentes à área de análise. Aos 42 dias pôde-se observar uma cápsula inflamatória com espessura média de 57,40 µm e a presença de um infiltrado inflamatório discreto, com pequeno número de células mononucleares. Neste período foi observada discreta quantidade de células gigantes inflamatórias e fagócitos mononucleares. Ainda pôde ser observada uma discreta proliferação fibroangioblástica, porém sem vasos sanguíneos congestos. Também neste período não foram observados sinais de mineralização, necrose ou efeitos residuais de material disperso. O índice geral de inflamação (IGI) neste período ficou em 1

(discreto), característico de um tênue processo inflamatório crônico, porém sem comprometer a compatibilidade biológica do material.

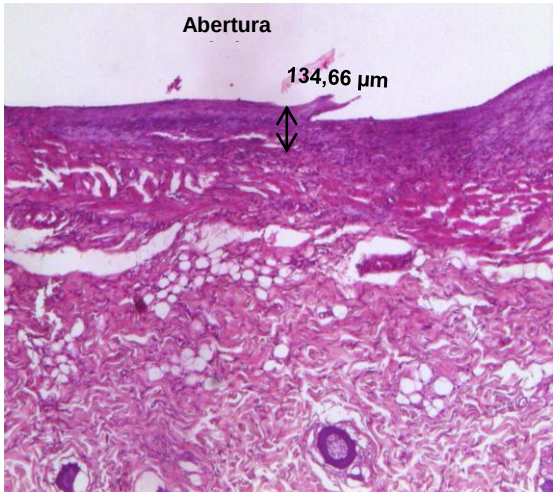


Figura 49 - MTAG 7 dias medida da cápsula.

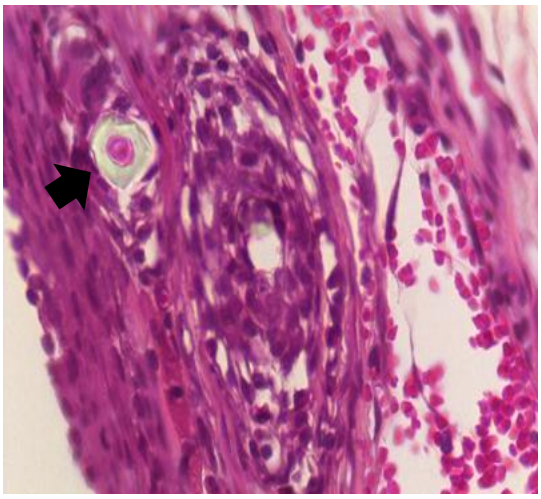


Figura 50 - Seta indicando fagocitose de resto de material disperso.

Grupo Controle

No período inicial de 7 dias, junto a lateral do tubo, observou-se formação de cápsula fibrosa com espessura média de 90,82 µm e a presença de moderada infiltração de células inflamatórias. Também foi observada discreta proliferação fibroangioblástica e colageinização, com neoformação de vasos sanguíneos, porém sem sinal de congestão. Foi observada ainda discreta presença de fagócitos mononucleares (macrófagos) e células gigantes inflamatórias, sem resíduo necrótico (Fig. 51). Aos 21 dias observou-se decréscimo na espessura da cápsula inflamatória que se apresentou com uma espessura média de 56,30 µm, houve também uma redução no número de células do infiltrado inflamatório e discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por células gigantes inflamatórias. Não foram observados focos de mineralização ou necrose adjacentes à área de análise

(Fig. 52). Aos 42 dias a cápsula inflamatória se apresentou com uma espessura média de 26,10 µm e não foi observado infiltrado inflamatório e proliferação fibroangioblástica. Ainda neste período não foram observadas células gigantes inflamatórias e fagócitos mononucleares, sinais de mineralização, necrose ou efeitos residuais de material disperso (Fig 53). O índice geral de inflamação (IGI) neste período ficou em 0 (ausente).

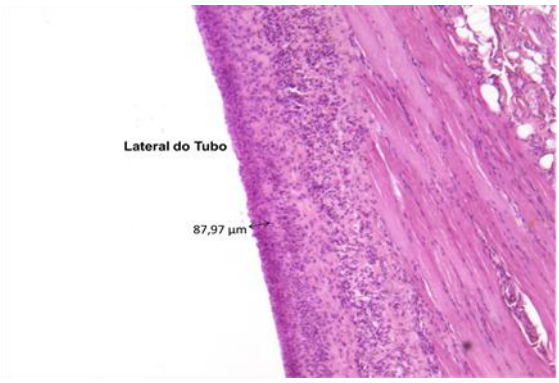


Figura 51 - Grupo controle, medida da cápsula 7 dias.

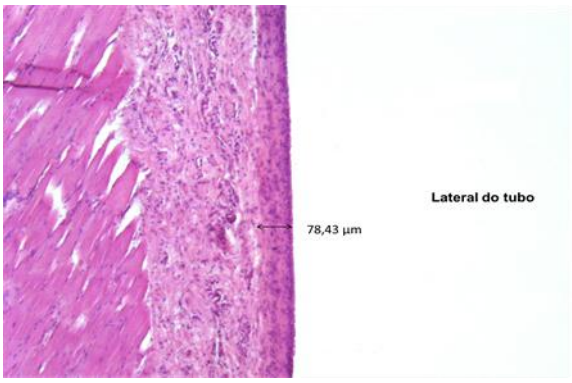


Figura 52 - Grupo controle, medida da cápsula com 21 dias.

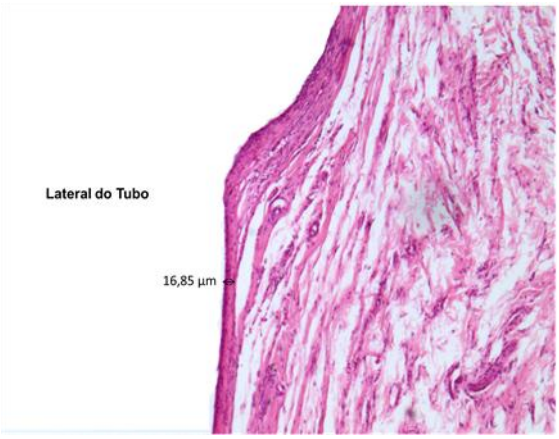


Figura 53 - Grupo controle, medida da cápsula com 42 dias.

Considerações

A classificação da severidade das reações teciduais foram baseadas no número, tipo e localização dos eventos histopatológicos observados. Segundo a norma ISO 7405 (2008), os seguintes critérios devem ser levados em consideração quando a biocompatibilidade de determinado material é avaliada:

- Ausência ou discreta reação inflamatória no período entre 2 e 12 semanas de análise é aceitável. Ausência ou discreta reação inflamatória no período de 2 semanas, com evolução para reação moderada ou severa até o período de 12 semanas não é aceitável.
- Reação inflamatória moderada no período entre 2 e 12 semanas não é aceitável. Reação inflamatória moderada no período de 2 semanas que regride até o período de 12 semanas é aceitável.
- Reação inflamatória severa em qualquer período de análise não é aceitável.

Levando-se em consideração os critérios acima citados, pôde-se observar que ambos os materiais testados apresentaram processo inflamatório moderado no período inicial de análise, com regressão da reação para discreto/ausente no período final de 42 dias, o que é aceitável do ponto de vista biológico. De uma maneira geral, houve diminuição em todos os valores dos eventos histopatológicos observados, com regressão da cápsula fibrosa, característico de um processo inflamatório reparador, comprovando a biocompatibilidade dos materiais.

5. Discussão

5. Discussão

Na metodologia para a avaliação dos cimentos, o cimento EndoBinder foi avaliado com diferentes agentes radiopacificadores, o óxido de bismuto, óxido de zircônia e o óxido de zinco. Foi adotada essa forma de avaliação, pois ainda não havia sido definido, por parte do fabricante, o agente radiopacificador que seria utilizado na composição final do material. Assim, optou-se por esses radiopacificadores por serem substâncias radiopacificadoras presentes em outras categorias de materiais odontológicos (Dukic et al. 2012), por seus componentes apresentarem alto número atômico (Bismuto-83; Zircônia-40 e Zinco-30).

O óxido de Bismuto está presente na composição do MTA (Hwang et al. 2009). Entretanto, segundo Jacobovitz et al (2009), este é responsável pelo escurecimento das estruturas dentais adjacentes à sua aplicação. Por isso, 2 outros materiais foram utilizados. Porém paralelamente a esse trabalho de doutorado, foi realizada uma pesquisa, com acompanhamento de 1 ano, para a avaliação dos agentes radiopacificadores e sua capacidade manchadora, quando aplicado em dentes bovinos, e foi concluído que tanto o Óxido de Bismuto como o Óxido de Zircônia apresentam radiopacidade semelhante, porém o custo da Zircônia é mais elevado. Em relação ao manchamento, não pode ser observada qualquer ligação entre o bismuto e alteração de cor das estruturas dentais. O artigo foi submetido à publicação e está em análise (Anexo pag. 126).

5.1 Análise do pH e liberação de íons cálcio.

A metodologia utilizada para avaliação do pH e a liberação de íons cálcio, foi utilizada por vários autores (Massi *et al.* 2011, Vivan *et al*. 2010, Duarte *et al.* 2004, Tanomaro-Filho *et al*. 2009 e 2011). A água destilada e deionizada foi utilizada devido à sua pureza e o pH neutro, conforme comprovado na leitura inicial da solução (6,9). A metodologia utilizada permiti garantir que as leituras de pH e liberação de íons cálcio refletia o aumento real em cada período, em vez de uma soma de valores ao período final.

O método para avaliação da liberação de íons cálcio, utilizando espectrofotômetro de absorção atômica, tem sido descrito com frequência na literatura (Duarte *et al.* 2003, Santos *et al*. 2005, De Vasconcellos *et al.* 2009) e também permite obter resultados fidedignos para essa propriedade.

Embora muitos cimentos presentes no mercado sejam a base de hidróxido de cálcio, a presença do hidróxido de cálcio em sua composição não garante a liberação de íons cálcio e hidroxila no produto final (Tanomaro-Filho *et al.* 2011). Após a presa do cimento, os íons podem não ser mais liberados (Silva *et al.* 1997), ou o hidróxido de cálcio acaba por ser inativado por outros componentes do cimento (Tanomaro-Filho *et al*. 2011).

Com relação aos resultados do pH, diferente do presente estudo onde o MTA apresentou um pH máximo de 9,4, valores maiores que 12 foram encontrados por Torabinejad *et al.* (1995) e Islam *et al.* (2006). Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que estes autores mediram o pH diretamente da massa resultante da manipulação do material, com auxílio de micro eletrodos e não em tubos de imersão em água, como no método utilizado no presente estudo. O método descrito neste estudo tem a vantagem de permitir medições de pH em períodos mais

longos do que o tempo de presa, não representando apenas o pH do material durante a presa, mas também sua capacidade de alcalinização do meio em que ele estiver presente por um período de até 28 dias.

O valor do pH inicial para o MTA foi maior que o EndoBinder em suas diferentes formas. Isso pode ser explicado pela presença de cloreto de cálcio na composição do MTA, acrescentado para acelerar o tempo de presa (Wiltbank *et al.* 2007). Bortoluzzi *et al.* (2006) relatou que a presença de cloreto de cálcio pode aumentar significativamente as leituras de pH, mas apenas imediatamente após a manipulação do material.

Durante o processo de hidratação, o MTA resulta em silicato de cálcio hidratado e como um subproduto o hidróxido de cálcio. As reações envolvendo silicato de cálcio na presença de água, promovem a hidrogenação de CaO e $Ca(OH)_2$ (Dammaschke *et al*. 2005). Assim, quando em contato com a água, o MTA libera uma alta concentração de íons cálcio para o meio. O cálcio lixiviado é simultaneamente produzido a partir do hidróxido de cálcio e também a partir da decomposição da sílica de cálcio hidratada, que é liberado em ritmo mais lento em comparação com o hidróxido de cálcio (Camilleri 2008 a, b, c). A dissociação do hidróxido de cálcio em íons Ca^{2+}e OH^- resulta no aumento do pH do meio (Duarte *et al*. 2003).

Por outro lado, o processo de hidratação do cimento de aluminato de cálcio resulta em hidratos de aluminato de cálcio e hidróxido de alumínio (Alt *et al*. 2003). Assim sendo, a liberação de íons Ca^{2+} e OH^- pelo cimento também pode ser atribuída à decomposição do aluminato de cálcio hidratado em ritmo mais lento em comparação ao MTA, o que poderia explicar os menores valores de pH do cimento de aluminato de cálcio em contato com a água nos períodos iniciais e o aumento mais lento do pH, quando em comparação com o MTA.

O processo de hidratação das partículas de cimento em água envolve três períodos distintos: dissolução de íons, nucleação e precipitação de fases hidratadas. Tão logo as partículas de cimento entram em contato com a água, fases anidras de aluminato de cálcio começam a dissociar e liberam íons cálcio (Ca^{2+}) e tetra hidróxido aluminato (Al(OH)4-) no meio líquido. O processo de dissolução ocorre até que a concentração desses íons na solução aquosa alcance um certo nível de saturação, promovendo a sua precipitação na forma de hidratos de aluminato de cálcio, por meio de mecanismos de nucleação e crescimento. A precipitação dos primeiros produtos hidratados diminui a concentração de íons em solução para níveis abaixo da condição de saturação, favorecendo a dissociação de fases anidras. Isso resulta num processo contínuo de dissolução-precipitação que ocorre até que a maioria ou toda fase anidra tenha reagido. (Oliveira et al. 2007).

No caso do cimento de aluminato de cálcio, em particular, a relação em massa entre água e cimento (a/c) e a temperatura são determinantes no que diz respeito às fases que resultarão do processo de hidratação. Nas condições em que os experimentos foram realizados, isto é, temperatura ao redor de 37°C e relação a/c = 0,21, as fases mais estáveis relativas à hidratação do cimento de aluminato de cálcio, ou seja, AH3 ($Al_2O_3.3H_2O$) e C3AH6 ($3CaO.Al_2O_3.6H_2O$), foram privilegiadas (Luz *et al*. 2011). Assim, entende-se que os resultados obtidos para a liberação de íons cálcio pelo cimento de aluminato de cálcio, ao longo do tempo, são coerentes com a explanação acima. Em poucas palavras, para o EBP, a dissolução e a precipitação das fases hidratadas do cimento é rápida, de modo que a concentração de íons cálcio em solução é elevada nas primeiras horas.

Considerando que as fases que resultaram da hidratação são as mais estáveis, ao fim da hidratação, estimada em 2 horas, a taxa de liberação de íons

cálcio fica bastante reduzida. Essa taxa só volta a crescer com a hidratação retardada do óxido de cálcio (CaO) que geralmente se faz presente na composição anidra do cimento de aluminato de cálcio pela forma como o cimento é obtido, isto é, a calcinação de misturas de alumina (Al_2O_3) e carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Por isso, os resultados mostram aumento na liberação de íons cálcio a partir de 48 horas em meio aquoso. A tendência é a mesma quando se aditiva EBP com radiopacificadores distintos, como mostra a Tabela 3. Os resultados de pH (Tabela 2) seguem a mesma direção supracitada, embora sejam ligeiramente influenciados nas primeiras horas pela presença de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) na formulação, o qual tende a atuar como tampão para a solução em que as fases do cimento de aluminato de cálcio se hidratam. Em parte, tais resultados dão suporte também às análises de biocompatibilidade para o cimento, como ficou evidenciado na seção 4.4.

5.2 Análise da atividade antimicrobiana.

Neste trabalho, a atividade antimicrobiana dos cimentos, foi verificada pelo método de difusão em ágar (Sipert et al. 2005, Tanomaro-Filho et al. 2007) e foi avaliada para microrganismos diferentes, incluindo bactérias e fungos que são predominantemente encontrados em casos de lesões periapicais e em dentes submetidos a cirurgia parendodôntica (Molander et al 1998, Sundqvist et al 1998). Os resultados revelaram que apenas os cimentos EBOZr e EBOZn não apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* sendo eficientes contra o *Staphylococcus aureus* e a *Candida glabrata*. Todos os demais cimentos apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos.

A atividade antimicrobiana do MTA foi avaliada por Torabinejad et al. (1995), que detectaram sua eficiência contra algumas bactérias facultativas, embora nenhuma atividade tenha sido encontrada para *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis e E. coli* ou contra bactérias anaeróbicas. Estrela et al. (2000) não encontraram nenhuma atividade antimicrobiana para o MTA contra o *S. Aureus*, *Enterococcus faecalis e a Candida albicans,* diferente do encontrado por Sipert et al (2005), cujos resultados demonstram que o MTA também atuou como bom agente inibidor do crescimento dos microrganismos avaliados com exceção do microrganismo *E. Coli*, e dos resultados do presente estudo, em que o MTA foi eficiente na inibição de todos os microrganismos avaliados, incluindo *E. Coli.* Esses resultados encontrados são justificados pelo aumento do pH dos materiais estudados, conforme argumentos apresentados no ítem anterior, devido à formação de hidróxido de cálcio o que induz aumento do pH devido a dissociação de íons cálcio e hidroxila (Duarte et al, 2003). No caso do EndoBinder o processo de

hidratação do cimento de aluminato de cálcio resulta em hidratos de aluminato de cálcio e hidróxido de alumínio (Alt et al. 2003). Assim sendo, a liberação de íons Ca^{2+} e OH^{-} pelo cimento também pode ser atribuída à decomposição do aluminato de cálcio hidratado.

5.3 Análise da Biocompatibilidade.

Uma das principais características dos cimentos endodônticos deve ser a biocompatibilidade (Duarte *et al.* 2005). Implantes subcutâneos em ratos têm sido utilizados frequentemente para avaliar a compatibilidade biológica de diversos materiais odontológicos (Ozbas *et al.* 2003), pois são capazes de determinar com precisão o tipo e extensão da reação local provocada por estes materiais (Zmener *et al.* 2004, Zafalon *et al.* 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar a reação tecidual provocada por um novo cimento de aluminato de cálcio e, de acordo com os resultados obtidos, a hipótese nula testada deve ser rejeitada, pois a utilização de EBOB produziu menor reação tecidual que MTA, em níveis semelhantes ao Controle após 42 dias, comprovando sua biocompatibilidade quando testado em tecido subcutâneo de ratos.

Cimentos de presa hidráulica dependem inteiramente da interação físico-química do cimento com o meio, fator este associado à solubilidade e desintegração do material (Sarkar *et al*. 2005). É sabido que MTA, devido ao seu longo tempo de presa (Torabinejad *et al.* 1995), se torna altamente instável quando umedecido antes de seu endurecimento completo (Ber *et al.* 2007), circunstância esta encontrada no meio oral onde MTA é utilizado rotineiramente (Fridland et al. 2003). Tal situação promove maior solubilidade e desintegração do cimento e consequentemente maior lixiviação de componentes presentes no material (Bodanezi et al. 2008), dentre eles

o arsênico (Duarte *et al.* 2005). Estudos já relataram a lixiviação deste componente por parte de MTA (Duarte *et al.* 2005, Schembri *et al*. 2010), no entanto, de acordo com Matsunaga *et al.* 2010, a quantidade de arsênico liberada está abaixo dos limites seguros propostos pela norma ISO 9917-1 , não comprometendo a biocompatibilidade de MTA.

Cimentos a base de aluminato de cálcio, como EBOB, são geralmente constituídos por três fases autógenas principais, responsáveis pelo processo de presa hidráulica do material: fase anidra CA ($CaO.Al_2O_3$), compreendendo cerca de 40 a 70% do produto; fase CA_2 ($CaO.2Al_2O_3$), que é a segunda em proporção (>25%), e fase $C_{12}A_7$($12CaO.7Al_2O_3$), com cerca de 10% (Oliveira et al. 2010). Independente da proporção das fases cristalinas presentes no cimento, a presa do material inicia-se com a reação entre cimento e água, o que resulta em uma dissolução de íons de cálcio (Ca^{2+}) e tetra-hidroxi aluminato ($Al(OH)_4^-$). Este processo continua até a solução atingir nível de saturação suficiente para promover sua precipitação, seguida de crescimento dos cristais presentes nas fases conhecidas como hidratos de aluminato de cálcio (Oliveira et al. 2010). As fases hidratadas precipitadas formam fortes ligações entre as partículas que compõem o cimento, caracterizando sua presa e conferindo ao material resistência mecânica e tolerância biológica em relação aos tecidos vivos, devido ao balanço permitido entre fases ricas em Al_2O_3 e $CaCO_3$ (Oliveira et al. 2010, Pandolfelli et al. 2007, Castro et al. 2011). Este balanço permite o controle do tempo de presa do cimento, evitando a incorporação de aditivos a sua fórmula original (Oliveira et al. 2010, Pandolfelli et al. 2007). Este tempo de presa mais curto, por sua vez, garante ao cimento melhores condições de aplicação clínica, além de diminuir sua solubilidade e desintegração no meio oral (Pandolfelli et al. 2007, Hammad et al. 2008).

Os resultados do presente estudo demonstraram ausência de reação inflamatória para EBOB ao final dos 42 dias de análise. Neste mesmo período, observou-se para MTA discreta reação inflamatória, o que significa persistência de um processo inflamatório crônico. No entanto, de acordo com a norma ISO 7405, uma moderada reação inflamatória após 2 semanas da colocação do implante, com tendência ao decréscimo após 12 semanas, é considerada aceitável, resultados observado em MTA.

Materiais em contato íntimo com tecidos vivos se tornam irritantes, porém, mais importante que o potencial irritativo destes materiais é a duração deste efeito sobre os tecidos (Shahi *et al*. 2006). Yaltirik *et al.* (2004), demonstraram processo inflamatório crônico em amostras que continham MTA 60 dias após implantação subcutânea do material. A quantidade de células presentes no infiltrado inflamatório (polimorfo e mononucleares) havia reduzido significativamente em relação aos períodos iniciais de análise: no entanto, macrófagos e células gigantes inflamatórias ainda estavam presentes fagocitando partículas de MTA dispersas no tecido conjuntivo, situação semelhante à encontrada no presente estudo, caracterizando a permanência de processo inflamatório.

Por outro lado, diversos outros estudos demonstraram as excelentes propriedades biológicas de MTA (Torabinejad *et al.* 2010, Min *et al.* 2008, Dammaschke *et al.* 2005), sendo que estas estão relacionadas à capacidade de liberação de íons cálcio e, consequentemente, ao pH alcalino produzido pelo material (Sarkar *et al.* 2005, Vivan *et al.* 2009). Quando exposto ao meio úmido, MTA libera fosfato de cálcio e óxido de cálcio (Torabinejad *et al.* 1995). O óxido de cálcio liberado produz hidróxido de cálcio após reagir com os fluidos teciduais, que por sua vez libera íons cálcio, que em excesso se torna irritante aos tecidos, dando início a um processo inflamatório (Torabinejad *et al.* 1995, Yaltirik *et al.* 2004). Apesar da

diminuição no processo inflamatório observada em MTA com o passar do tempo, a persistência de irritação tecidual ao final de 42 dias indica que a gradual liberação de hidróxido de cálcio e sua reação com a umidade dos tecidos adjacentes é a responsável pela irritação contínua provocada pelo material, mesmo que em menor intensidade (Shahi et al. 2006).

Embora essa liberação de íons cálcio, promovida por MTA, contribua para tornar o meio inóspito ao crescimento de bactérias (Estrela et al. 2000), sua alta concentração após hidratação pode contribuir para a fibrose dos tecidos adjacentes (Ber *et al.* 2007). No entanto, tal evento não foi observado para MTA neste estudo, uma vez que apenas discreta proliferação fibroangioblástica foi observada ao final de 42 dias de análise.

Da mesma forma que ocorre com MTA, cimentos a base de aluminato de cálcio são capazes de elevar o pH do meio, tornando-o alcalino (Santos *et al*. 2005). A alcalinização do meio ocorre através da dissociação de íons cálcio e íons hidroxila quando o material entra em contato com a água. Entretanto, no processo de sinterização de EndoBinder, fases com baixo teor de Ca são formadas, fazendo com que o cimento tenha uma liberação de íons cálcio menor, tornando-o menos irritativo e citotóxico, porém sem comprometer sua capacidade antimicrobiológica (Pandolfelli *et al.* 2007, Jacobovitz *et al*. 2009). Tal fato pode ter sido fundamental na boa resposta biológica observada para EBOB ao final dos 42 dias de análise, situação não encontrada para MTA.

De maneira geral, observou-se reação inflamatória de evolução crônica nos diferentes grupos com o decorrer do período de análise, com cápsula reacionária de amplitude decrescente, ricamente vascularizada e celularizada durante o período inicial de análise, apresentando colagenização progressiva nos período seguinte e infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares (Torabinejad *et al*.

2010, Silva *et al.* 2009, Shahi *et al.* 2006, Yaltirik *et al*. 2004). Em algumas amostras, a presença de fagócitos mononucleares e células gigantes inflamatórias, mesmo que em número reduzido, condicionaram um processo reacionário ativo, sendo sempre de menor expressão para EBOB.

O óxido de cálcio liberado produz hidróxido de cálcio após reagir com os fluidos teciduais, que por sua vez libera íons cálcio, que em excesso se torna irritante aos tecidos, dando início a um processo inflamatório (Torabinejad *et al*. 1995, Yaltirik *et al.* 2004). Assim sendo, como as quantidades de cálcio encontradas nas amostras de EBOB sempre foram menores do que as encontradas nas amostras de MTA, isso permitiu melhor biocompatibilidade do EBOB. No processo de sinterização de EndoBinder, fases com baixo teor de Ca são formadas, fazendo com que o cimento tenha uma liberação de íons cálcio menor, tornando-o menos irritativo e citotóxico, porém sem comprometer sua capacidade antimicrobiológica (Pandolfelli et al. 2007, Jacobovitz et al. 2009). Assim uma maior liberação de cálcio nas amostras de MTA pode ter ocasionado uma reação inflamatória ainda com 42 dias de análise enquanto que EBOB apresentou menor reação tecidual que MTA, sendo biocompatível quando testado em tecido subcutâneo de ratos.

Desta forma, concluiu-se que EBOB apresentou menor reação tecidual que MTA, sendo biocompatível quando testado em tecido subcutâneo de ratos. No entanto, apesar dos bons resultados obtidos por EBOB, é válido enfatizar que estudos relacionados a outras propriedades biológicas deste novo cimento, como citotoxicidade e capacidade reparadora, devem ser realizados previamente à sua validação como opção de tratamento endodôntico.

6. Conclusão

6 Conclusão

- pH

Apesar de MTA apresentar pH inicial maior que as diferentes formulações de EndoBinder, todos alcalinizaram o meio progressivamente ao final de 28 dias.

- Liberação de íons cálcio

Todos os cimentos avaliados liberaram altas quantidades de íons cálcio no período inicial de 2 horas, sendo maior para EBP. Em todos os períodos analisados, a liberação de cálcio foi semelhante para todos os materiais.

- Atividade antimicrobiana

O EndoBinder, puro e com óxido de bismuto, apresentou ação antimicrobiana contra todos os microrganismos avaliados. As demais formulações de EB apresentaram eficiência somente contra Staphylococcus aureus e Candida glabrata.

- Biocompatibilidade

EBOB apresentou menor reação tecidual que MTA, sendo biocompatível quando testado em tecido subcutâneo de ratos.

7. Referências

7 Referências

1. Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agent in human teeth. J Endod. 2008; 34:1-6.

2. Al-kahtani A, Shostad S, Schifferle R, Bhambhani S. In vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral trioxide aggregate in permanent teeth with simulated immature apices. J Endod. 2005; 31(2):117-9.

3. Alt C, Wong L, Parr C. Measuring castable rheology by exothermic profile. Refractories Applications and News. 2003; 8:15-8.

4. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. J Endod. 2003; 29 (10): 646-50.

5. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MF, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. J Endod. 2005; 31:101-3.

6. Bakland LK. Management of traumatically injured pulps in immature teeth using MTA. Journal of the California Dental Association. 2000; 28: 855-8.

7. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. J Endod. 2007; 33(10):1231-4.

8. Bernabé, PFE; Holland, R. MTA e Cimento Portland: Considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas. In: Cardoso, R.J.A. coordenador. Odontologia – Arte e Conhecimento – 20º. Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo/vol.1. São Paulo: Artes Médicas; 2003.

9. Bodanezi A, Carvalho N, Silva D, Bernardineli N, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG. Immediate and delayed solubility of mineral trioxide aggregate and Portland cement. JAppl Oral Sci. 2008; 16(2):127-31.

10. Bogen G, KUTTLER S. Mineral Trioxide Aggregate Obturation: A Review and Case Series. J Oral Endo.2009; 35 (6):777-790.

11. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Duarte MAH, et al. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and White Portland Cement. J Endod. 2006; 32:1194-7.

12. Brown JH, Brenn L. A method for differential staining of gram positive and negative bacteria in tissue sections. Bull. Johns Hopkins Hosp. 1931; 48: 69-73.

13. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. International Endodontic Journal. 2008a; 41: 408–17.

14. Camilleri J. Modification of mineral trioxide aggregate: physical and mechanical properties. International Endodontic Journal. 2008b; 41: 843-9.

15. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontics use. International Endodontic Journal. 2008c; 41, 151–7.

16. Camilleri J, Pitt ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. International Endodontic Journal. 2006; 39: 747-754.

17. Castro-Raucci LM, Oliveira IR, Teixeira LN, Rosa AL, Oliveira PT, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progressionof osteogenic cell cultures. Braz Dent J 2011; 22:99-104.

18. Cintra LT, Moraes IG, Estrada BP, Gomes filho JE, Bramante CM, Garcia RB, et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. J Endod. 2006; 32:556-9.

19. Craig RG, Powers JM. Biocompatibilidade dos materiais dentários. In: _____. Materiais Dentários Restauradores. São Paulo, Santos, 11ª ed, p. 126-162, 2004.

20. Dammaschke T, Gerth HUV, Zuchner H, Schafer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. Dent Mater. 2005; 21:731-8.

21. Souza costa CA, Duarte PT, De souza PP, Giro EM, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. Am J Dent. 2008; 21(4):255-61.

22. Souza costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of Resin-Based Dental Materials Applied as Liners in Deep Cavities Prepared in Human Teeth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007; 81(1):175-84.

23. De Vasconcelos BC, Bernardes RA, Cruz SM, Duarte MA, Padilha PdM, Bernardineli N, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of new root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 108:135-9.

24. Duarte MA, de O Demarchi AC, de Moraes IG. Determination of pH and calcium ion release provided by pure and calcium hydroxide-containing AHPlus. Int Endod J. 2004;37(1):42-5.

25. Duarte MA, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod. 2003; 95:345-7.

26. Duarte MAH, De Oliveira Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 2005; 99(5):648-50.

27. Dukic W, Delija B, Derossi D, Dadic I. Radiopacity of composite dental materials using a digital X-ray system. Dent Mater J. 2012; 31(1): 47–53.

28. Ersin NK, Eronat N. The comparison of a dentin adhesive with calcium hydroxide as a pulp-capping agent on the exposed pulps of human and sheep teeth. Quintessence Int. 2005; 36(4):271-80.

29. ESE. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. International Endodontic Journal. 2006; 39: 921–30.

30. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J. 2000; 11:3-9.

31. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. J Endod. 2003; 29:814-7.

32. Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. Dent Clin North Am. 1992; 36: 357- 65.

33. Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Extended setting shrinkage behavior of endodontic sealers. J Endod. 2008; 34:90-3.

34. Hwang YC, Lee SH, et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 107:e96-e102.

35. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PEF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. Braz Dent J. 2001; 12:3-8.

36. Hsien HC, Cheng YA, Lee YL, Lan WH, Lin CP. Repair of perforating internal resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. Journal of Endodontics. 2003; 29: 538-9.

37. International Standards Organization. Dentistry - Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. 2008; 7405.

38. InternationaL Standards Organization. Water-based cements - Part 1: Powder/liquid acid-base cements. 2007; 9917-1.

39. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. J Endod. 2006;3:193-7.

40. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 2009; 108 (1): 140-4.

41. Jacobovitz M, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Castro LMS, Rosa AL, Rossetto HL, Oliveira PT. Effects of a Novel Calcium Aluminate endodontic Cement (EndoBinder®) on the Progression of Osteogenic Cell Cultures.

42. Jacobovitz M, Lima RKP. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. Int Endod Journal.2008; 41: 905-912.

43. Jacobovitz M. et al. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 108:140-144.

44. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. J Endod. 2008; 34 (8): 970-4.

45. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. J Endod. 1993; 19:541-4.

46. Luz AP, Pandolfelli V. C.CaCO3 addition effect on the hydration and mechanical strength evolution of calcium aluminate cement for endodontic applications, Ceramics International.2011; 38 (2): 1417-25.

47. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. Journal of Endodontics. 2004; 30: 80-3.

48. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA, Guerreiro-Tanomaru JM. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. J Endod. 2011; 37(6): 844-6.

49. Matsunaga T, Tsujimoto M, Kawashima T, Tsujimoto Y, Fujiwara M, Ookubo A, Hayashi Y. Analysis of arsenic in gray and white mineral trioxide aggregates by using atomic absorption spectrometry. J Endod 2010; 36:1988-90.

50. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics. 2004; 98: 376-9.

51. Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, Lee HH, Kim EC. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin Sialoprotein and Heme Oxygenase-1 in human dental pulp. J Endod. 2008; 34:666-70.

52. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998; 31(1):1-7.

53. Nair PNR, et al - Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. Int Endod J. 2008; 41 (2): 128-50.

54. O'driscol LM. "Alumina cements - Lining up against steel and sewage", Industrial Minerals. 2000; 35-45.

55. Oliveira IR, Garcia JR, Pandolfelli V C. Cinética de hidratação de ligantes à base de alumina hidratável ou aluminato de cálcio. Cerâmica 53. 2007; 20-28.

56. Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. IntEndod J. 2010; 43:1069-76.

57. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. Dent Mater. 2001; 17(6):512-9.

58. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. Int Endod J. 2003; 36(4): 281-7.

59. Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rosseto HL, Jacobovitz M. A composition based on aluminate cement for application in endodontics and the obtained cement product. Patent registration INPI 0704502-6. (Patent registration, Portuguese), 2007.

60. Ribeiro CS, et al. The antimicrobial activity of gray-colored mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109: e109-e112.

61. Santos AD, Moraes JC, Araujo EB, Yukimitu K, Valerio Filho WV. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. Int Endod J. 2005; 38:443-7.

62. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. J Endod. 2005; 31(2):97-100.

63. Saunders WP. A Prospective Clinical Study of Periradicular Surgery Using Mineral Trioxide Aggregate as a Root-end Filling. J Endod. 2008; 34(6): 660-5.

64. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Endod; 2010; 36(7):1210-5.

65. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. J Endod. 2006; 32:776-80.

66. Silva LAB, Leonardo MR, Silva RS, Assed S, Guimarães LFL. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. Int Endod J. 1997; 30:205-9.

67. Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LA, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. Braz Dent J. 2009; 20: 99-106.

68. Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. International Endodontic Journal. 2007; 40: 186-97.

69. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. Int Endod J. 2005; 38: 539-43.

70. Souza Costa - Testes de biocompatibilidade de materiais odontológicos. In: ESTRELA, C – Metodologia científica. São Paulo: Artes Médicas, 1ª ed, p. 161-194, 2001.

71. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 85(1): 86-93.

72. Tanomaro-Filho M, Tanomaro JMG, Barros DB, Watanabe E, Ito I. *In Vitro* antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. Journal of Oral Science. 2007; 49 (1): 41-45.

73. Tanomaru-Filho M, Chaves Faleiros FB, Saçaki JN, Hungaro Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. J Endod. 2009; 35(10): 1418-21.

74. Tanomaru-Filho M, Saçaki JN, Faleiros FB, Guerreiro-Tanomaru JM. pH and calcium ion release evaluation of pure and calcium hydroxide-containing Epiphany for use in retrograde filling. J Appl Oral Sci. 2011; 19(1): 1-5.

75. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root end filling in dogs. Journal of Endodontics. 1995; 21: 603–8.

76. Torabinejad M, Hong CU, Mcdonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod. 1995; 21: 349-53.

77. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. J Endod. 1995; 21(8): 403-6.

78. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. J Endod. 2010; 36:190-202.

79. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. J Endod. 1993; 19:591-5.

80. Torabinejad M, Chivian N. Clinical Applications of Mineral Trioxide Aggregate. J Endod. 1999; 25(3): 197-205.

81. Vasconcelos BC, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of new root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108:135-139

82. Vivan RR, et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 110:250-256.

83. Vivan RR, Ordinola-zapata R, Bramante CM, et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 2009; 108:e35-8.

84. Vosoughhosseini, S. et al. Influence of White versus Gray Mineral Trioxide Aggregate on inflammatory cells. J Endod, 2008; 6:715-717.

85. Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Endod. 2007; 10: 1235–8.

86. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod. 2004; 30:95-9.

87. Zafalon EJ, Versiani MA, de Souza CJ, Moura CC, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103(5):e88-94.

88. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. J Endod. 2004; 30(5):348-51.

8. Apêndice

Basic Research—Technology

Radiopacity Evaluation of Calcium Aluminate Cement Containing Different Radiopacifying Agents

Fabiano Gamero Aguilar, DDS, MSc, Lucas da Fonseca Roberti Garcia, DDS, MSc, PhD,* Hebert Luis Rossetto, B Eng, MSc, PhD,† Luiz Carlos Pardini, DDS, MSc, PhD,‡ and Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza, DDS, MSc, PhD**

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the radiopacity of calcium aluminate cement (EndoBinder) with 3 different radiopacifiers (bismuth oxide, zinc oxide, or zirconium oxide) in comparison with gray mineral trioxide aggregate (GMTA), white MTA, and dental structures (enamel and dentin). **Methods:** Eighteen test specimens of each cement with thicknesses of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 mm (n = 3) were made by using a stainless steel matrix and were adapted to a standardizing device (8 × 7 cm) with a graduated aluminum stepwedge varying from 2.0–16.0 mm in thickness. To compare the radiopacity of the cements with that of dental structures, slices of first molars with a thickness increasing from 0.5–3.0 mm were obtained and placed on the standardizing device. One occlusal radiograph for each tested cement was taken, with exposure time of 0.1 seconds and focus-film distance of 20 cm. Films were processed in an automatic device, and the mean radiopacity values were obtained by using a photodensitometer. **Results:** Mean values showed that the thicker the specimen was, the greater was its radiopacity. Only EndoBinder + bismuth oxide (EBBO) and GMTA demonstrated radiopacity values greater than 3.0 mm of the aluminum scale for all thicknesses. When zinc oxide was used as radiopacifier agent, EndoBinder only reached the desired radiopacity with a thickness of 2.0 mm, and with zirconium oxide it was 2.5 mm. **Conclusions:** Bismuth oxide was the most efficient radiopacifier for EndoBinder, providing adequate radiopacity in all studied thicknesses, as recommended by ISO 6876, being similar to GMTA. *(J Endod 2011;37: 67–71)*

Key Words

Calcium aluminate cement, mineral trioxide aggregate, optical density, radiopacity

Endodontic therapy has reached high success rates thanks to the development of techniques and materials that allow a large portion of clinical cases to be resolved, including apexification, pulpotomy, paraendodontic surgeries, and repair of root resorptions and perforations, which require a specific cement sealant (1).

An ideal filling material must be atoxic, noncarcinogenic, nongenotoxic, biocompatible with adjacent tissues, insoluble in oral fluids, dimensionally stable, and radiopaque (2, 3). Because there is no ideal restorative material used in endodontics, mineral trioxide aggregate (MTA), which was originally developed as a cement for retrograde filling (4), has been used for pulp capping (5), pulpotomy (6), apexogenesis and to repair root perforations (7), treatment of traumatized teeth with incomplete apexification (8), root resorptions (9), as an intracoronal barrier before dental bleaching and apical plug (10), as well as filling material (11). It was made commercially available in 2 forms, gray and white, differing only as regards the reduction in ferrous oxide concentration in white MTA (WMTA) (12).

Nevertheless, some of the negative points of MTA must be pointed out, such as the long setting time, which makes it difficult to insert in deep areas of the root canal (13). It is difficult to manipulate, which leads to the formation of porosities after spatulation and makes it highly unstable (14). It has low resistance to compression (11), low flow capacity (15), high cost (16), high rate of dental structure staining (9, 17), high solubility in a humid environment (18, 19), as well as presence and release of arsenic (20, 21). Effects such as these justify the development of new biocompatible materials with adequate mechanical properties (19).

A new calcium aluminate–based endodontic cement (Patent Number PI0704502-6, 2007) called EndoBinder (Binderware, São Carlos, SP, Brazil) has been developed, with the intention of preserving the properties and clinical applications of MTA without its negative characteristics. It is a material composed of (% by weight): Al_2O_3 ($\geq$68.5), CaO ($\leq$31.0), SiO_2 (0.3–0.8), MgO (0.4–0.5), and Fe_2O_3 (<0.3), which, according to Pandolfelli et al (22) and Jacobovitz et al (23), presents suitable biological and antimicrobiological properties. The cement is produced by the process of calcining Al_2O_3 and $CaCO_3$ at temperatures between 1315°C and 1425°C, the most feasible method for the production of materials with a more uniform composition. The calcium aluminate formed is cooled and then triturated until an adequate particle size is obtained. In a general approach, the formation of EndoBinder can be described by the following chemical reaction: $CaCO_3 + Al_2O_3 = Ca(AlO_2)_2 + CO_2$.

Radiopacity is an important physical property for endodontic materials. In accordance with the ISO 6876 standard (24), endodontic cements must have a radiopacity

From the *Department of Dental Materials and Prosthodontics, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; †Binderware Biomaterials Ltda, São Carlos, SP, Brazil; and ‡Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Address requests for reprints to Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Avenida do Café, s/n, Bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. E-mail address: ferpanzeri@forp.usp.br.
0099-2399/$ - see front matter
Copyright © 2011 American Association of Endodontists.
doi:10.1016/j.joen.2010.10.001

greater than 3.0 mm in relation to the aluminum scale (Al). In accordance with ANSI/ADA specification no. 57 (25), all endodontic cements must be 2.0 mm of Al more radiopaque than dentin or bone. Thus, a radiopacifying agent must be added to EndoBinder to allow the cement and the quality of the root canal filling to be radiographically visualized and for the cement to be distinguished from the adjacent anatomic structures (16).

The ideal radiopacifying agent should be inert, contaminant-free, and atoxic, and the minimum possible quantity of it should be added (16), without ignoring that this minimum quantity must be of a material that is composed of elements with high atomic numbers. The bismuth oxide used in the composition of MTA increases the radiopacity of endodontic cements, with values higher than those equivalent to the Al scale (26), but it is not inert and interferes in the mechanism of hydration of the material (27), diminishing the release of calcium ions by the cement (28), altering its reparative capacity (29) and its physicochemical properties (30). Therefore, alternative radiopacifiers have been proposed (3, 31). Zinc and zirconium oxides are radiopacifying agents used in dental materials for prosthetic and implant purposes and do not present toxicity (32). Thus, the aim of this study was to evaluate the radiopacity of the calcium aluminate cement (EndoBinder), by using 3 different radiopacifying agents (bismuth oxide, zinc oxide, or zirconium oxide), in comparison with gray MTA (GMTA), WMTA, and dental structures (enamel and dentin). The null hypotheses tested were that there would be no difference in the level of radiopacity of the tested cements, irrespective of the radiopacifying agent used, among them and in comparison with GMTA and WMTA, and that all would present the recommended levels of radiopacity in relation to the aluminum scale and greater than that of enamel and dentin.

Materials and Methods

Standardization of the Radiographic Procedure

All the geometrical factors that might interfere in the formation of the radiographic image were standardized by creating a transparent acrylic matrix called the standardizing device, measuring 8 × 7 cm. These measurements corresponded to the width and length of an occlusal radiographic film, which was adapted to the bottom part of the device, fixed on lateral channels (Fig. 1*A*). The upper part of the device was composed of steps that gradually increased in thickness every 0.5 mm up to the thickness of 3.0 mm. Therefore, the first step was 0.5-mm thick, the second 1.0-mm, and so on, up to the last step of 3.0-mm thickness, which was a total of 6 steps. On each step, 3 circular orifices measuring 5 mm in diameter were opened in which to place the material to be radiographed, totaling 18 orifices.

An opening was made in the center of the thickness standardizing device, suitable for adapting the aluminum scale (stepwedge), measuring 10 × 32 mm, and scaled in 8 steps, with incremental thicknesses of 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, and 16.0 mm, according to the recommendations of Manson-Hing and Bloxom (33). The purpose of this stepwedge was to simulate, by means of shade nuances produced after exposure and processing of the radiographs, the densities of the structures of the oral cavity in comparison with the hard and soft tissues for laboratory analyses of the quality of the radiographic images to show the homogeneity of the procedures and to detect possible variations during the procedures of the radiographic techniques and processing.

To certify that the acrylic material of the thickness standardizing device would not interfere with the radiographic image of the materials, an initial radiographic image was taken with an occlusal film (Insight; Kodak, New York, NY) and the stepwedge only.

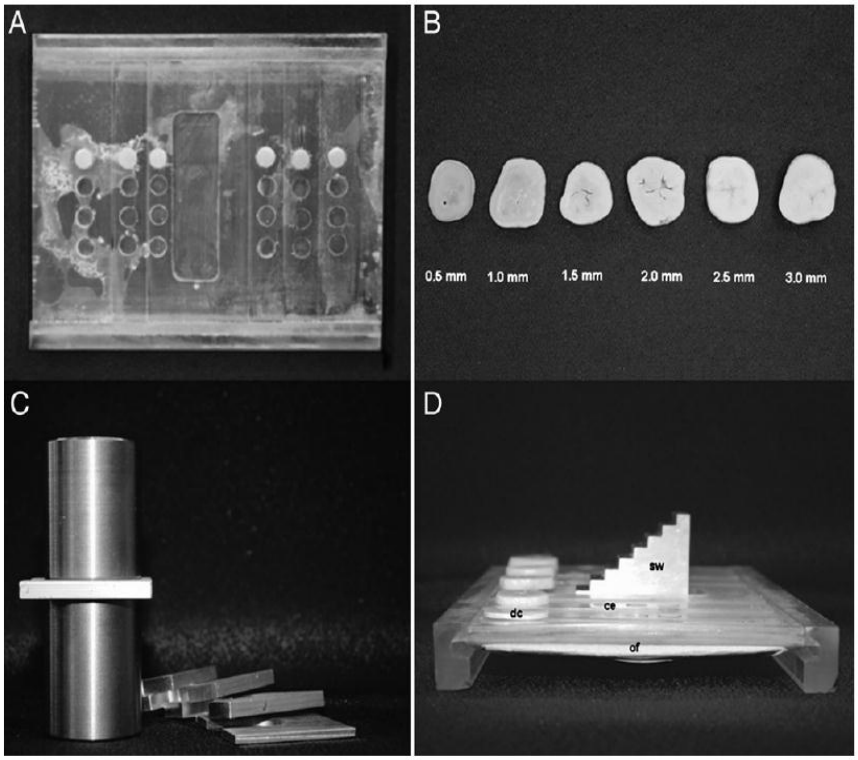


Figure 1. Standardizing device used to determine OD of the tested cements (*A*), dental cuts (cervical region, mesiodistal direction) (*B*), stainless steel matrix used to make the test specimens (*C*), and standardizing device assembled with cements (ce), dental cuts (dc), occlusal film (of), and stepwedge (sw) (*D*).

After receiving approval from the Research Ethics Committee of the Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo (process no. 2005.1.1374.58.0), the study was conducted to compare the radiopacity of the material with that of the dental structures (enamel and dentin). Dental cuts increasing in thickness from 0.5–3.0 mm were obtained from 6 healthy adult teeth (first molar), with one cut being taken from each tooth. These slices were acquired by sectioning the tooth in the mesiodistal direction with a diamond disk (Buehler, Lake Bluff, IL) cut in a microtome (MTI Corporation, Richmond, CA) to obtain regular dental slices with enamel and dentin, with thicknesses of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 mm (Fig. 1*B*). The slices were stored in artificial saliva in an oven at a temperature of 37.5°C before performing the experiment.

To regularize the 2 sides of these cuts and to assure that they presented the recommended thickness for the experiment, the dental cuts were submitted to polishing by using 800-grain water abrasive papers (Norton Abrasivos Brasil, São Paulo, SP, Brazil) in a manual polishing machine (Struers, Ballerup, Denmark). The thickness was strictly controlled with the aid of a digital pachymeter (Digimess, São Paulo, SP, Brazil).

Specimen Preparation

The cements tested in this study are described in Table 1.

The test specimens of each cement were obtained in thicknesses of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 mm by manipulating the materials strictly in accordance with the manufacturers' recommendations. Thus, after manipulation, the cements were immediately placed in a stainless steel matrix formed by 2 parts fitted together, one external and the other an internal portion, in the form of a plunger, with an internal diameter of 3 mm. Accompanying the matrix, the spacers were placed according to the thickness of the test specimen that was to be obtained. These spacers were fitted into the plunger between the top and bottom portions of the matrix, so that the external part of the matrix would provide the adequate test specimen thickness (Fig. 1*C*). After the cement had set, the spacer was removed by lowering the matrix plunger, which released the test specimen.

Eighteen test specimens of each studied cement were made, 3 of each thickness. After obtaining the test specimens, they were fitted into the orifices of the matrix and radiographed. For this procedure, occlusal radiographic films (Insight; Kodak) sensitivity group "E" (REF 1169143, Lot 4107790) and an x-ray appliance (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) with a central opening, 11 mm in diameter, were used. Pilot tests were conducted to determine the exposure time of 0.1 seconds, which was defined as that which presented an optical density of 1 (+) in the radiographic image of a 10-mm stepwedge thickness. In addition to the cements tested, the dental disks with thicknesses according to the step height were placed next to the orifices on each step (Fig. 1*D*).

TABLE 1. Cements Used in the Study

Groups	Cements	Manufacturer
EBBO	EndoBinder + 20% (weight) bismuth oxide	Binderware, São Carlos, SP, Brazil
EBZn	EndoBinder + 20% (weight) zinc oxide	
EBZr	EndoBinder + 20% (weight) zirconium oxide	
GMTA	Gray MTA	Ângelus, Londrina, PR, Brazil
WMTA	White MTA	

The locator cylinder was adjusted perpendicular to the standardizing device at a focus-film distance of 20 cm and set for 70 kVp, with exposure time of 0.1 seconds. After taking the radiographs, the films were submitted to a radiographic film processor (NDT; Kodak, Rochester, NY) following the manufacturer's recommendations with regard to the time/temperature processing method.

The optical density value (OD) readouts were performed with the aid of a photodensitometer (MRA; Indústria de Equipamentos Eletrônicos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil) with the collimated light beam 1.0 mm in diameter. Three readouts were performed for each step of the stepwedge for each sample and dental cut (enamel and dentin) per thickness. Having obtained the OD values, the means were calculated and submitted to a polynomial regression to obtain the equivalence in radiopacity for each tested cement.

Results

The mean radiopacity values for each tested cement are presented in Fig. 2.

Analysis of the data allowed it to be verified that the thicker the cement, the greater was its radiopacity. When the radiopacifiers were compared, EndoBinder + bismuth oxide (EBBO) and GMTA presented

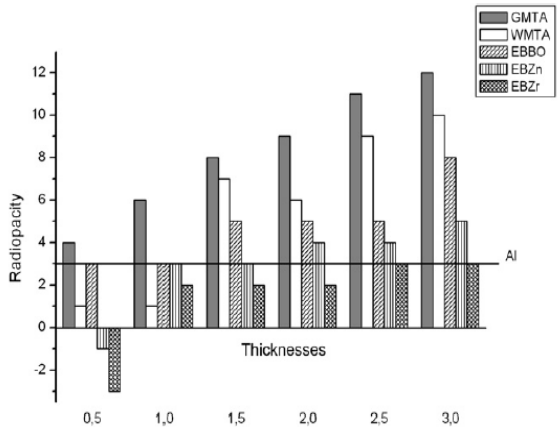


Figure 2. Mean radiopacity values expressed in aluminum thickness (Al) for all the tested cements.

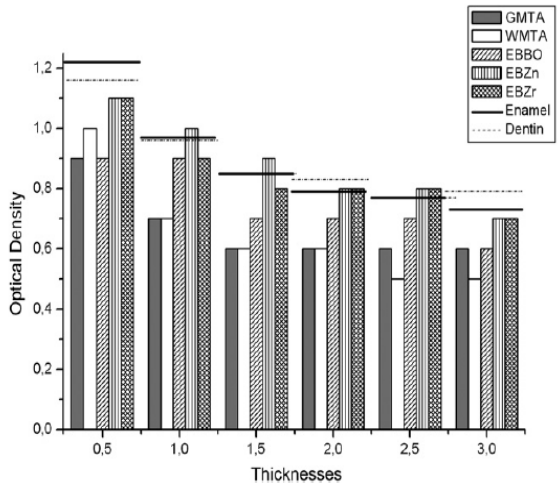


Figure 3. Comparison of mean OD values for the tested cements and dental structures.

radiopacity values greater than or equal to 3.0 mm of the Al scale for all the thicknesses.

When EndoBinder + zinc oxide (EBZn) was used, EndoBinder attained the limit imposed by the ISO 6876 standard only with a thickness of 1.0 mm and EndoBinder + zirconium oxide (EBZr) with 2.5 mm. With regard to WMTA, it presented better radiopacity than EndoBinder as from 1.5 mm; in smaller thicknesses, EBBO was better. The same occurred with EBZn and EBZr in a thickness of 1.0 mm.

The mean OD values when the various cements were compared with dental structures are shown in Fig. 3.

It was observed that instead of an increase in the thickness of samples occurring, a decrease in OD occurred, that is, the image became progressively more radiopaque. The mean variation in OD for enamel was between 0.73 and 1.22, and for dentin it was between 0.79 and 1.16. With the thickness of 0.5 mm, all the cements presented a lower OD than the dental structures. EBBO, GMTA, and WMTA presented lower OD values than enamel and dentin for all the thicknesses, showing a more radiopaque radiographic aspect, allowing radiographic differentiation among the cements and dental structures.

EBZn presented a lower OD than enamel and dentin only with thicknesses of 0.5 and 3.0 mm, and EBZr presented a lower OD than the tooth structures for all thicknesses, except with thickness of 2.0 and 2.5 mm.

Discussion

The biocompatible product market grows 11% per year and already accounts for an annual amount of US$35 billion. Within this market, inorganic materials are among those that present a major growth potential and should grow 20% annually during the next 5 years (34). Fast-setting hydraulic cements, in particular, have found a niche market with a high added value in endodontics, leading to the development of new products that must be compared with a reference commercial product such as MTA, which is basically composed of (% by weight) Portland cement (75.0), dehydrated $CaSO_4$ (5.0), and bismuth oxide (21.6), which provides its radiopacity (35). Portland cement in turn is constituted by (% by weight) SiO_2 (21.2), CaO (68.1), Al_2O_3 (4.7), MgO (0.48), and Fe_2O_3 (1.89) (12). With the addition of water, the cement is hydrated and forms hydrated silica gel (36).

There were 3 main reasons for the development of EndoBinder. (1) Because it is destined for dental applications, the selection of the reagent materials allows control of the level of impurities such as Fe_2O_3, which promotes tooth darkening (9), and free MgO and CaO, which might be responsible for an undesirable level of expansion of the material in contact with humidity (1). (2) Although calcium hydroxide and MTA contribute to making the environment inhospitable to the growth of bacteria (37), an excessive concentration after its hydration might contribute to fibrosis of the adjacent tissues (38). Therefore, the balance between the phases rich in Al_2O_3 and $CaCO_3$ allowed by EndoBinder promotes better results with regard to biocompatibility and the physicochemical properties of the cement. (3) The third reason is the formation of autogenous phases capable of helping to control the cement setting time, thereby avoiding the inclusion of unnecessary additives (39).

Optical density is a logarithmic measure of the ratio of incident light transmission through the image of the film and does not depend only on the inherent x-ray absorption properties of materials but also on the film characteristics and the exposure and processing conditions (40). In this study, all the variables were standardized. Therefore, any difference in OD and, consequently, radiopacity occurred as a result of the different properties of the tested cements and their radiopacifiers. According to the results obtained in this study, only EBBO and GMTA presented adequate radiopacity for all the thicknesses, rejecting the null hypothesis that all the cements would behave in a similar manner. The radiopacifying agent used in these 2 materials was bismuth oxide at a concentration of 20%, which has a higher atomic number (Z = 83) than zinc oxide (Z = 30) and zirconium oxide (Z = 40), results that corroborate the findings of Camilleri (16). However, WMTA, which has the same radiopacifying agent and at the same concentration as that in GMTA, only attained the desired radiopacity with a thickness of 1.5 mm. This difference in the results between GMTA and WMTA can be explained by the small variations in the composition of the 2 cements, such as the higher concentration of ferrous oxide in GMTA (12, 35). In another study (36), WMTA presented greater radiopacity than GMTA, and the presence of different substances in the 2 cements would be the explanation for this result, a fact that does not corroborate the results of this study.

In a recent study by Camilleri and Gandolfi (31), calcium silicate–based cements only attained adequate radiopacity with the use of 30% zinc oxide, once again demonstrating the importance of a high atomic number to obtain adequate radiopacity. Moreover, additions in large proportions of radiopacifying agents should be avoided, because they might compromise the physicomechanical performance of the cement (16). A similar result was found by Húngaro Duarte et al (41), who used zirconium oxide as radiopacifying agent for Portland cement. In this study, zirconium oxide did not attain the limit of 3.0 mm of the Al scale demanded by the ISO 6876 standard (24); however, in accordance with the ANSI/ADA specification no. 57 (25), the radiopacifying agent attained the desired limits. Nevertheless, in this study also, bismuth oxide presented the best radiopacity results, irrespective of the standard used.

With regard to OD, some authors considered that the material must have an OD equal to or greater than dentin, thus guaranteeing that the material will not be confused with carious dentin (42). Others considered that the restorative material needs to have a slightly higher degree of OD than enamel (43). Dental structures must present a similar radiopacity up to a thickness of 1.5 mm. This is an important factor for differential clinical diagnosis; otherwise, it is not possible to distinguish the 3 structures (enamel/cement/dentin) in the radiographic image (3). In the present study, this phenomenon occurred up to the thickness of 1.0 mm, because the dental structures were not thick enough to prevent the passage of the x-rays and formed a radiolucent image on the film (3).

In this study, the mean OD values for EBBO, GMTA, and WMTA were lower than those of enamel and dentin for all the evaluated thicknesses, which confers greater radiopacity for the cements, allowing differentiation between cements and dental structures, proving the good performance of bismuth oxide as a radiopacifying agent.

In spite of the good results obtained for EndoBinder with the addition of 20% bismuth oxide as regards radiopacity, further research is necessary to evaluate the effect of the addition of this radiopacifying agent on the other physicomechanical and biological properties of the cement.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. Dent Mater 2001;17:512–9.
2. Ribeiro DA. Do endodontic compounds induce genetic damage? a comprehensive review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;105:251–6.
3. Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Duarte MA, Gonçalves M, Tanomaru JM. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. J Appl Oral Sci 2008;16:376–9.

4. Al-Kahtani A, Shostad S, Schifferle R, Bhambhani S. In vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral trioxide aggregate in permanent teeth with simulated immature apices. J Endod 2005;31:117–9.
5. Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. J Endod 2008;34:1–6.
6. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;98:376–9.
7. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. J Endod 2004;30:80–3.
8. Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. Int Endod J 2007;40:186–97.
9. Jacobovitz M, de Lima RK. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. Int Endod J 2008;41:905–12.
10. Saunders WP. Prospective clinical study of periradicular surgery using mineral trioxide aggregate as a root-end filling. J Endod 2008;34:660–5.
11. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and antibacterial properties. J Endod 2010;36:16–27.
12. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MF, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. J Endod 2005;31:101–3.
13. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 1995;21:349–53.
14. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. J Endod 2007;33:1231–4.
15. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. J Endod 2006;32:897–900.
16. Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. Int Endod J 2010;43:231–40.
17. Jacobovitz M, de Pontes Lima RK. The use of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on apexification of a replanted tooth: a case report. Dent Traumatol 2009;25:e32–6.
18. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. J Endod 2003;29:814–7.
19. Porter ML, Bertó A, Primus CM, Watanabe I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. J Endod 2010;36:524–8.
20. Duarte MA, De Oliveira Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99:648–50.
21. Monteiro Bramante C, Demarchi AC, de Moraes IG, et al. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;106:909–13.
22. Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rosseto HL, Jacobovitz M. A composition based on aluminate cement for application in endodontics and the obtained cement product. Patent registration INPI 0704502-6, Portuguese, 2007.
23. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:140–4.
24. International Standards Organization. Dental root canal sealing materials. Geneva, Switzerland: International Standards Organization; 2001. BS EN ISO 6876-7.8.
25. ANSI/ADA. Specification no. 57 endodontic sealing material. Chicago, IL: ANSI/ADA; 2000.
26. Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;105:e54–7.
27. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. Int Endod J 2008;41:408–17.
28. Ozdemir HO, Ozçelik B, Karabucak B, Cehreli ZC. Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects. Dent Traumatol 2008;24:70–3.
29. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. Int Endod J 2007;40:462–70.
30. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. Int Endod J 2008;41:151–7.
31. Camilleri J, Gandolfi MG. Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. Int Endod J 2010;43:21–30.
32. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. Biomaterials 1999;20:1–25.
33. Manson-Hing LR, Bloxom RM. A stepwedge quality assurance test for machine and processor in dental radiography. J Am Dent Assoc 1985;110:910–3.
34. Hertz A, Bruce IJ. Inorganic materials for bone repair or replacement applications. Nanomedicine (Lond) 2007;2:899–918.
35. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. J Conserv Dent 2008;11:141–3.
36. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. J Endod 2006;32:193–7.
37. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J 2000;11:3–9.
38. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. J Endod 2008;34:715–7.
39. Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Extended setting shrinkage behavior of endodontic sealers. J Endod 2008;34:90–3.
40. Watts DC, McCabe JF. Aluminium radiopacity standards for dentistry: an international survey. J Dent 1999;27:73–8.
41. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. J Endod 2009;35:737–40.
42. Mjör IA. Human coronal dentine: structure and reactions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1972;33:810–23.
43. Turgut MD, Attar N, Onen A. Radiopacity of direct esthetic restorative materials. Oper Dent 2003;28:508–14.

Mechanical and microstructural characterisation of new calcium aluminate cement (EndoBinder)

L. F. R. Garcia[1], F. G. Aguilar[1], M. G. Sabino[2], H. L. Rossetto[2] and F. C. P. Pires-de-Souza*[1]

The aim of this study was to carry out a mechanical and microstructural characterisation of calcium aluminate cement [EndoBinder (EB)] by compressive and diametral tensile strength tests, Vickers microhardness test and scanning electron microscopy analysis. Test specimens were made according to the type of cement used [EB, grey mineral trioxide aggregate (GMTA) and white mineral trioxide aggregate (WMTA)] and the setting time tested (24 h, 7 days and 21 days). The mean values obtained after mechanical tests showed that EB presented higher compressive strength, with statistically significant difference to WMTA (7/21 days), and higher diametral tensile strength, with statistically significant difference to GMTA (7/21 days) and WMTA (21 days). EndoBinder presented higher microhardness values, differing statistically from GMTA (21 days) and WMTA (7/21 days). The SEM analysis showed a more homogeneous microstructural arrangement for EB, with particles of uniform size and shape. EndoBinder presented adequate mechanical properties, frequently superior to mineral trioxide aggregate, making it a feasible option for endodontic treatment.

Keywords: Calcium aluminate cement, Mineral trioxide aggregate, Compressive strength, Diametral tensile strength, Vickers microhardness

This paper is part of a special issue on Cement and Concrete Research

Introduction

Endodontic perforations occur more frequently in the floor of the pulp chamber and in the cervical region of the root, promoting damaging alterations to the periradicular tissues.[1,2] The treatment indicated for this situation could be either radical, by extracting the tooth, or conservative, by sealing the perforation with specific cement that is easy to manipulate and apply, biocompatible, radiopaque, promote new mineralised tissue formation and present adequate mechanical properties.[1–3]

Mineral trioxide aggregate (MTA) was originally developed as a material for retrograde filling and root and furcal perforation treatment[4,5] and is commercially available in two forms: grey and white. The main difference between them lies in the reduction in the concentration of ferrous oxide, which is responsible for the grey colour of the material.[6] Both have a composition similar to Portland cement, except for the addition of bismuth oxide as radiopacifying agent.[7,8] Owing to its good performance, this material has been used in various other applications, among them, conservative treatments such as pulp capping[9] and pulpotomy.[10]

According to Andelin *et al.*,[11] MTA is capable of inducing the formation of reparative tissue in exposed pulps, in addition to promoting larger formation of dentine bridges than materials previously used for this function.[12] Moreover, studies have reported that the process of pulp repair in humans is induced more efficiently by MTA than calcium hydroxide, known for initially causing inflammation and necrosis of the area close to the exposure.[12–14] During the process of MTA hydration, when calcium disilicate and trisilicate react to form calcium hydroxide and calcium silicate hydrate gel, an alkaline pH is produced.[15] The calcium ions released during the setting process of MTA are diffused through the dentinal tubules, and their concentration tends to increase as the material setting time elapses.[16]

However, some of the negative points of MTA should be taken into consideration, such as the long setting time, which makes it difficult to insert into cavity preparations and root canals;[17,18] poor handling characteristics, which causes porosities after spatulation, making it highly unstable and compromising its mechanical properties;[19,20] low viscosity;[21] and low compressive strength.[20,22] These characteristics justify the development of new, biologically compatible dental materials with adequate mechanical properties.[23]

[1]Department of Dental Materials and Prosthodontics, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[2]Research and Development, Binderware Biomaterials Ltda., São Carlos, São Paulo, Brazil

*Corresponding author, email ferpanzeri@forp.usp.br

© 2011 Institute of Materials, Minerals and Mining
Published by Maney on behalf of the Institute
Received 22 February 2011; accepted 24 August 2011
DOI 10.1179/1743676111Y.0000000049

Therefore, a new calcium aluminate based endodontic cement (patent no. PI0704502-6, 2007), called EndoBinder (EB; Binderware, São Carlos, São Paulo, Brazil), has been developed with the intention of preserving the properties and clinical applications of MTA, however, without its negative characteristics.

The EB synthesis process provides the material advantages in comparison with MTA, such as control of levels of Fe_2O_3 impurities that cause tooth darkening,[24] and free MgO and CaO, responsible for the undesirable expansion of the material in contact with humidity.[3] Although MTA contributes to making the environment inhospitable to bacterial growth, an excess in its concentration after hydration may contribute to fibrosis of the adjacent tissues.[25] However, the balance between phases rich in Al_2O_3 and $CaCO_3$ allowed by EB provides better results as regards the biocompatibility and physicomechanical properties of the material.[26]

According to Pandolfelli *et al.*[26] and Jacobovitz *et al.*,[27] this cement presents adequate biological and antimicrobiological properties; however, its mechanical properties must be evaluated since the mechanical strength should be taken into consideration when a cement is placed into a cavity that bears occlusal pressure, such as root canal filling, pulp capping or restorative base.[17]

Therefore, the aim of this study was to carry out the characterisation of EB mechanically by means of compressive and diametral tensile strength and Vickers microhardness tests and microstructurally by scanning electron microscopy (SEM), in comparison with grey and white MTAs (GMTA and WMTA) (Ângelus, Londrina, Paraná, Brazil). The hypothesis tested was that EB would present superior mechanical properties than GMTA and WMTA, with distribution, shape and size of particles more homogeneous.

Material and methods

Sample preparation and test specimen fabrication

The EB powder is composed of Al_2O_3 ($\geqslant$68·5 wt-%), CaO ($\leqslant$31 wt-%), SiO_2 (0·3–0·8 wt-%), MgO (0·4–0·5 wt-%) and Fe_2O_3 (<0·3 wt-%).[26] The powder was produced by the process of Al_2O_3 and $CaCO_3$ calcination at temperatures between 1315 and 1425°C. The calcium aluminate formed was cooled and triturated to obtain particles of suitable size, and Bi_2O_3 (20·0 wt-%) was added to the material to guarantee sufficient radiopacity, in accordance with specification ISO 6876.[28]

The cement used as commercial reference, MTA, is composed of Portland cement (75 wt-%), Bi_2O_3 (20 wt-%) and dehydrated $CaSO_4$ (5 wt-%). Portland cement, in turn, is constituted by SiO_2 (21·2 wt-%), CaO (68·1 wt-%), Al_2O_3 (4·7 wt-%), MgO (0·48 wt-%) and Fe_2O_3 (1·89 wt-%).[7,8] In the manufacturing process, they are proportioned and heated up to 1600°C to obtain a powder composed of $3CaO.SiO_2$, $2CaO.SiO_2$, $3CaO.Al_2O_3$ and $4CaO.Al_2O_3.Fe_2O_3$. Gypsum ($CaSO_4.4H_2O$) is then added to control the setting time of the cement.[7,8]

The cements were manipulated in accordance with the manufacturers' recommendations, with the proportion of 1 g of powder to 0·21 mL of distilled water for EB, and for MTA, one dose of powder to one drop of distilled water. The cements were manipulated on a glass plate, one at a time, until a homogeneous paste was obtained. The paste was then placed into a stainless steel matrix for making the test specimens for the following tests.

Compressive and diametral tensile strengths

Ten test specimens measuring 6 mm in diameter and 12 mm in thickness were made for each cement/setting time (24 h, 7 days and 21 days post-setting) for the compressive strength test. For the diametral tensile strength test, 10 test specimens measuring 6 mm in diameter and 3 mm in thickness were made in accordance with specification no. 57 of ANSI/ADA.[29] Tests were performed in a universal test machine (Emic-DL; São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) at a speed of 0·5 mm min^{-1} with a load cell of 1000 kgf.

For the compression test, the test specimens were placed in the vertical position, with the force applied on its long axis. The compression force was calculated using the following formula[20]

$$\zeta = P/\pi r^2$$

where P is the fracture speed (kgf), π (constant)=3·14 and r is the test specimen radius (mm).

For the diametral tensile strength evaluation, the test specimens were placed in the horizontal position and diametrically compressed, inducing stress on their surfaces. The diametral tensile values were calculated using the following formula[20]

$$\zeta = 2(P/\pi dh)$$

where P is the force applied (kgf), π (constant)=3·14, d is the test specimen diameter (mm) and h is the test specimen height (mm).

Vickers microhardness

Ten test specimens, measuring 2 mm in thickness × 3 mm in diameter, were made according to the type of cement/setting time using a stainless steel matrix. The Vickers microhardness of the samples was measured in a Shimadzu microhardness tester (HMV Shimadzu, Kyoto, Japan), in which a pyramid shaped tip, 1·5 mm in diameter, was applied on the test specimen surface, under a constant load of 50 g/5 s, at three different points. The mean of the three values obtained was calculated, and the Vickers hardness value (VH) was determined.

The values obtained in the various mechanical tests were statistically analysed [two-way analysis of variance (ANOVA), Bonferroni test, $p<0·05$].

Analysis by SEM

Two test specimens for each cement/setting time were made in a stainless steel matrix (2 mm in thickness × 3 mm in diameter) and submitted to microstructural evaluation protocol by SEM (JEOL JSM 5410; Sony, Tokyo, Japan). The test specimens were fixed onto numbered metal stubs using double faced carbon adhesive tape, and the sample surfaces were coated with gold palladium alloy (300–500 Å) under high vacuum (Desk II; Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA) for 120 s. After this, the samples were taken to SEM set at 15 kV, and the surface topography was analysed at ×500 and ×1500 magnifications.

Results

Compressive strength

The mean values obtained for compressive strength and their comparison are shown in Table 1.

EndoBinder presented higher compressive strength, with statistically significant difference in comparison with WMTA after 7 and 21 days ($p<0{\cdot}05$). Grey MTA and WMTA showed no statistically significant difference between them in any of the evaluated periods ($p>0{\cdot}05$).

Diametral tensile strength

The mean values obtained for the diametral tensile test and their comparison are shown in Table 2.

EndoBinder showed higher diametral tensile strength values with statistically significant difference in comparison with GMTA at 7 and 21 days, and with WMTA at 21 days ($p<0{\cdot}05$). Grey MTA and WMTA presented statistically significant difference between them only in the period of 21 days ($p<0{\cdot}05$).

Vickers microhardness

The mean values obtained for Vickers microhardness and their comparisons are shown in Table 3. It was not possible to obtain adequate Vickers microhardness values for the samples of the tested cements at 24 h due to their particular hardening, and consequently, low surface mechanical strength was shown by them in this period.

EndoBinder presented higher Vickers microhardness than GMTA at 21 days and WMTA at 7 and 21 days, with statistically significant difference ($p<0{\cdot}05$). Grey MTA and WMTA showed no statistically significant difference between them in any of the evaluated periods ($p>0{\cdot}05$).

Scanning electron microscopy analysis

The SEM analysis (Figs. 1–3) revealed a variety of accidents that formed the microstructure of the tested cements, such as channels, grooves and depressions, pores and asymmetrical crystalline formations. For EB, in all the evaluated periods, the formation of a crystallised structure was observed, with aggregated particles of globular shape, uniform distribution and homogeneous size. In the 24 h post-setting period, at $\times 500$ magnification, it may be observed that EB (Fig. 1*a*) presented a regular surface, with less pronounced grooves and depressions and fewer in number than GMTA and WMTA (Figs. 2*a* and 3*a*). No morphological differences related to setting time were observed in the microstructure of the cements (sequence $a \rightarrow c \rightarrow e$ or its respective magnification in $b \rightarrow d \rightarrow f$ in all figures). In general, all the cements presented similar topographic accidents in their microstructural arrangement, nevertheless, less pronounced for EB.

Discussion

Considering the results of the study, the tested hypothesis could be accepted since EB presented adequate mechanical properties, frequently superior to GMTA and WMTA, in addition to a more homogeneous microstructural arrangement.

Several studies reported that the compressive and diametral tensile strengths of MTA after 24 h are significantly lower than amalgam and intermediate restorative material, materials routinely used in retrograde fillings.[17,21] However, after 3 weeks, there was no significant difference among these materials with regard to these properties.[21] The MTA is basically composed of tricalcium and dicalcium silicate, composition similar to Portland cement,[8] except for the addition of bismuth oxide. As dicalcium silicate has a slower hydration rate than tricalcium silicate,[7] mechanical properties, such as compressive and diametral strengths,[17] reach their maximum point only several days after cement setting.[30,31]

This result could be observed in the present study, in which an increase in the mean strength and hardness values was verified, with the increase in setting time of the three tested cements, particularly for compressive and diametral tensile strengths, when comparing the extreme periods (24 h and 21 days). In the case of Vickers microhardness, the particular hardening characteristics exhibited by the cements was evident, as it was not possible to perform the test on the 24 h samples due to the low mechanical strength of the surface in this period.[7]

In the scientific literature, there are controversial results as regards the difference in compressive strength between GMTA and WMTA.[32,33] Islam *et al.*[33] reported

Table 1 Mean values and standard deviation for compression test (MPa) of cements and setting times evaluated*

	Cements		
Time	EB	GMTA	WMTA
24 h	$25{\cdot}42 \pm 1{\cdot}60^{a,A}$	$23{\cdot}40 \pm 1{\cdot}75^{a,A}$	$22{\cdot}77 \pm 2{\cdot}30^{a,A}$
7 days	$50{\cdot}06 \pm 10{\cdot}62^{a,B}$	$41{\cdot}52 \pm 13{\cdot}52^{ab,B}$	$34{\cdot}37 \pm 9{\cdot}42^{b,B}$
21 days	$57{\cdot}95 \pm 5{\cdot}71^{a,B}$	$49{\cdot}64 \pm 10{\cdot}52^{ab,B}$	$45{\cdot}11 \pm 9{\cdot}62^{b,C}$

*Different letters (lower case in the line and capital letters in the column) indicate statistically significant difference (two-way ANOVA, Bonferroni test, $p<0{\cdot}05$).

Table 2 Mean values and standard deviation for diametral tensile test (MPa) of different cements and setting times evaluated*

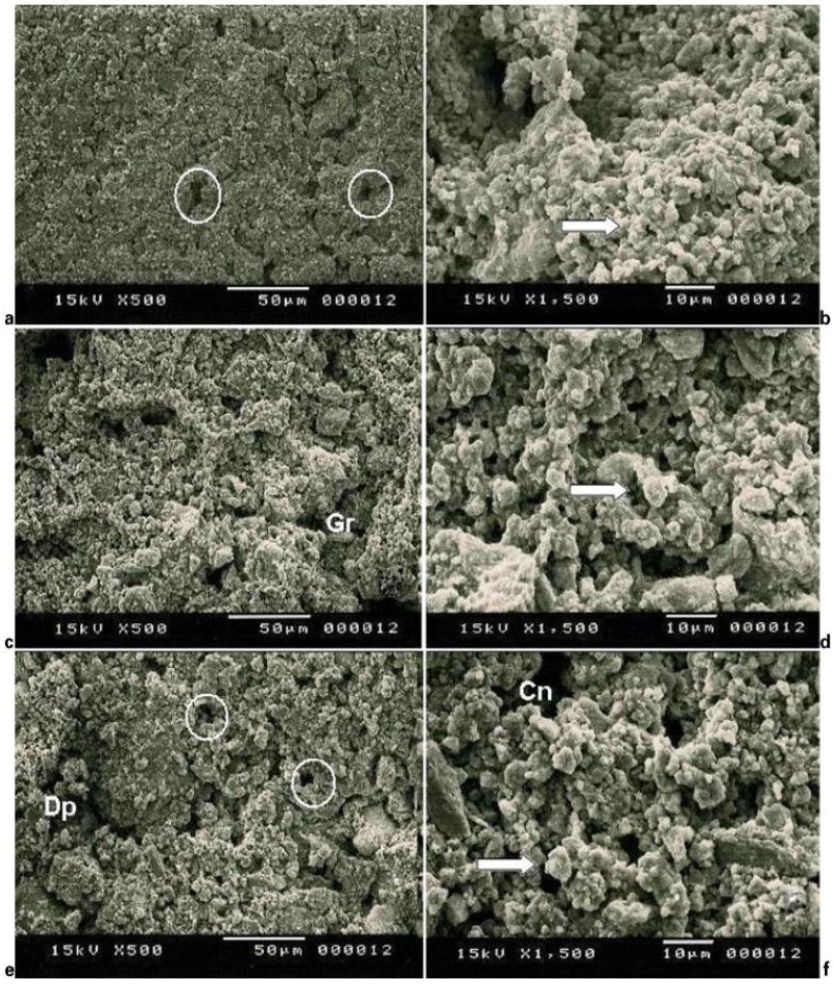
	Cements		
Time	EB	GMTA	WMTA
24 h	$3{\cdot}88 \pm 0{\cdot}37^{a,A}$	$3{\cdot}72 \pm 0{\cdot}53^{a,A}$	$3{\cdot}60 \pm 0{\cdot}57^{a,A}$
7 days	$5{\cdot}18 \pm 1{\cdot}00^{a,B}$	$4{\cdot}18 \pm 0{\cdot}95^{b,A}$	$4{\cdot}51 \pm 0{\cdot}37^{ab,B}$
21 days	$10{\cdot}26 \pm 1{\cdot}08^{a,C}$	$9{\cdot}14 \pm 0{\cdot}31^{b,B}$	$6{\cdot}52 \pm 1{\cdot}42^{c,B}$

*Different letters (lower case in the line and capital letters in the column) indicate statistically significant difference (two-way ANOVA, Bonferroni test, $p<0{\cdot}05$).

Table 3 Mean values and standard deviation for Vickers microhardness (HV) test of cements and setting times evaluated*

	Cements		
Time	EB	GMTA	WMTA
7 days	$39{\cdot}61 \pm 3{\cdot}59^{a,A}$	$37{\cdot}03 \pm 3{\cdot}99^{ab,A}$	$35{\cdot}60 \pm 3{\cdot}50^{b,A}$
21 days	$57{\cdot}18 \pm 1{\cdot}92^{a,B}$	$47{\cdot}78 \pm 2{\cdot}94^{b,B}$	$44{\cdot}98 \pm 2{\cdot}46^{b,B}$

*Different letters (lower case in the line and capital letters in the column) indicate statistically significant difference (two-way ANOVA, Bonferroni test, $p<0{\cdot}05$).



1 Micrographs of EB samples 24 h post-setting (*a* and *b*): *a* cement surface more regular than GMTA and WMTA, with less pronounced and lower number of grooves and depressions (indication) and *b* crystallised microstructure of cement, with globular shaped aggregated particles (arrow). EndoBinder 7 days post-setting (*c* and *d*): *c* grooves (Gr) on cement surface and *d* globular shaped particle (arrow). EndoBinder 21 days post-setting (*e* and *f*): *e* porosities (indication) and depressions (Dp) on cement surface and *f* channels that formed microstructure of cement (Cn). Globular shaped particle (arrow)

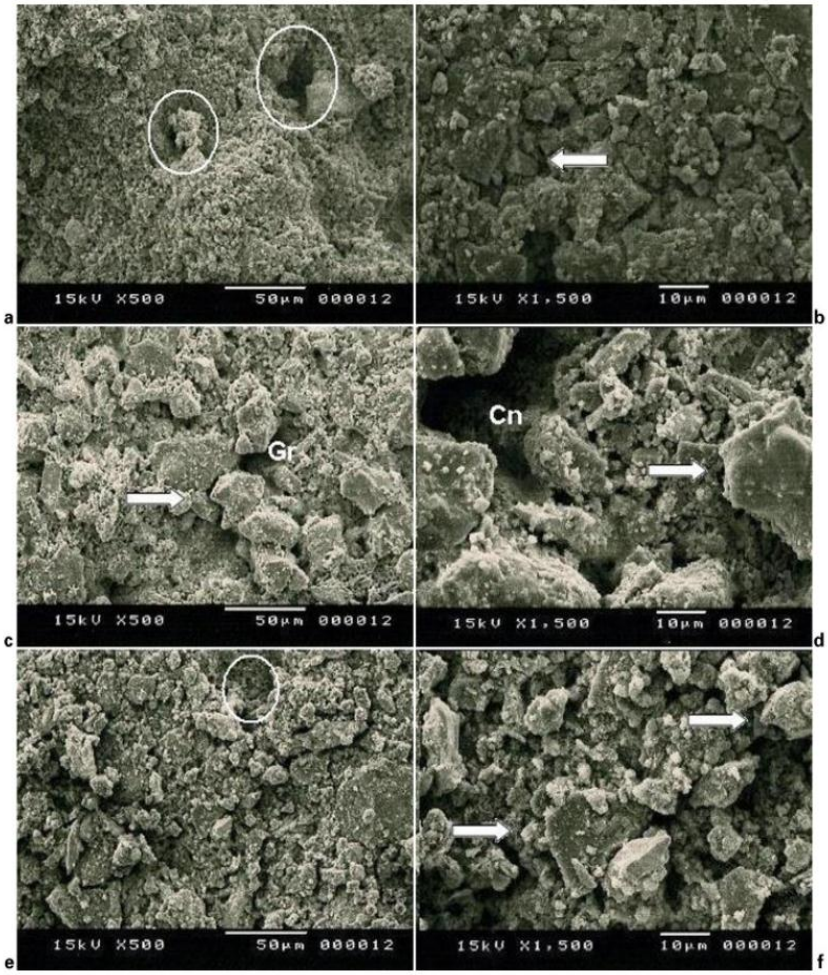
that the compressive strength of WMTA at 3 and 28 days post-setting was significantly lower than that of GMTA. On the other hand, two other studies comparing the compressive strength of the two cements demonstrated that WMTA presented higher compressive strength than GMTA.[32,34] The results obtained in the mechanical tests in this study are in agreement with the findings of Oliveira *et al.*,[20] who found higher values for a calcium aluminate based cement in comparison with MTA.

The difficulty in manipulating MTA may be one of the factors that determined the controversial results found in the literature, since this difficulty in manipulation promotes the incorporation of air bubbles and induces the formation of porosities in the cement after spatulation, making the microstructure of the material unstable and more brittle,[18,19] a fact that could be observed in this study by SEM analysis.

Although the evaluated cements presented the same topographic accidents on their surfaces (grooves, depressions and microchannels), these were more pronounced and more numerous in GMTA and WMTA. In addition, EB showed a regular arrangement of globular shaped particles, similar in shape and size, a factor that may have been determinant in the superior results obtained in the compressive and diametral tensile strength tests.[35]

The differences in particle size and shape observed among EB, GMTA and WMTA may justify the mechanical characteristics of the cements. With particles of similar size and shape, as observed in EB, a higher mechanical strength is expected due to the better stress distribution through the material.[35]

Calcium aluminate based cements, such as EB, are generally composed of three main phases that are responsible for the hydraulic setting process of the material: the anhydrous phase CA ($CaO.Al_2O_3$), comprising around 40–70% of the product; the CA_2 ($CaO.2Al_2O_3$) phase, which is ranked second in proportion (>25%); and the $C_{12}A_7$ ($12CaO.7Al_2O_3$) phase, consisting of ~10%. Irrespective of the proportion of crystalline phases present in the cement, setting of the material begins with the reaction between cement and water, which results in the dissolution of calcium ions



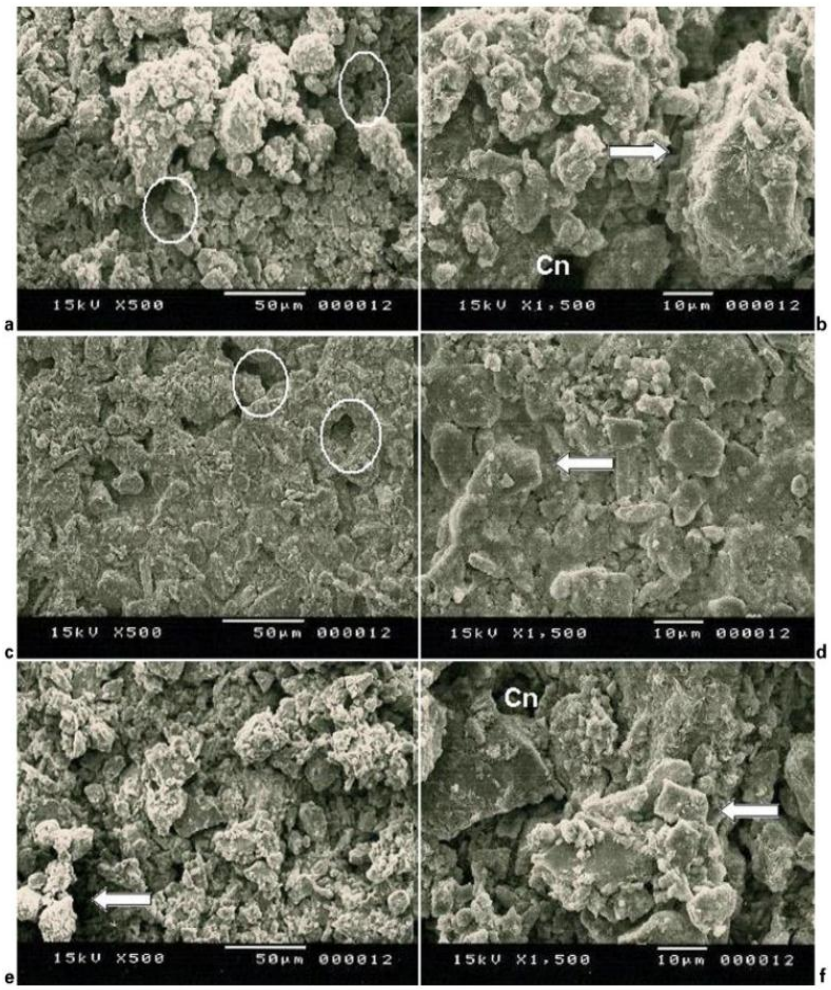
2 Micrographs of GMTA samples 24 h post-setting (*a* and *b*): *a* cement surface less regular than EB, with more pronounced and higher number of grooves and depressions (indication) and *b* microstructure of cement, with irregular shaped and asymmetric aggregated particles (arrow). Grey MTA 7 days post-setting (*c* and *d*): *c* grooves (Gr) on cement surface and particles with irregular size and shape (arrow) and *d* channel (Cn) that forms cement microstructure and particles with asymmetric shapes (arrow). Grey MTA 21 days post-setting (*e* and *f*): *e* depression on cement surface (indication) and *f* particles that compose crystalline phase of cement have asymmetric shapes and sizes (arrow)

(Ca^{2+}) and tetrahydroxy aluminate [$Al(OH)_4^-$]. This process continues until the solution attains a sufficient level of saturation to promote its precipitation, followed by the growth of crystals present in the phases known as calcium aluminate hydrates.[26] The precipitated hydrated phases form strong bonds between the particles that compose the cement, characterising its hardening and giving the material high mechanical strength.[20] The kinetics of hydration and precipitation of the hydrate formed is dependent on the crystalline composition of EB as well as on the structure of the materials that form during its precipitation. This situation is highly influenced by the amount of water available during the reaction, the temperature and the concentration of Ca^{2+} and $Al(OH)_4^-$ ions that are generated in the solution during the dissolution process of the anhydrous phase.[20,26]

In addition, the balance between phases rich in Al_2O_3 and $CaCO_3$ allowed by EB gives the material a better performance than MTA, particularly as regards rheology, facilitating its application inside the pulp chamber and root canals, and less porosity, as could be seen in the SEM analysis, providing greater mechanical strength.[20]

Conclusion

The results obtained in this study allow us to conclude that EB improved some negative properties of MTA, such as mechanical strength. Nevertheless, it is valid to emphasise that studies related to other properties of this new cement, such as its biological behaviour, must be conducted before its validation as an endodontic treatment option.



3 Micrographs of WMTA samples 24 h post-setting (*a* and *b*): *a* cement surface less regular than EB and GMTA, with more pronounced depressions (indication) and *b* less organised microstructure with larger number of irregularities. Microstructure of cement, with channels (Cn) and irregular shaped and sized aggregated particles (arrow). White MTA 7 days post-setting (*c* and *d*): *c* irregularities and depressions on cement surface and *d* asymmetric shaped particle (arrow). White MTA 21 days post-setting (*e* and *f*): *e* particles with asymmetric shapes and sizes (arrow) and *f* particles (arrow) and channels (Cn) that form microstructure of cement

References

1. S. J. Lee, M. Monsef and M. Torabinejad: Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J. Endod.*, 1993, **19**, 541–544.
2. W. P. Saunders: A prospective clinical study of periradicular surgery using mineral trioxide aggregate as a root-end filling. *J. Endod.*, 2008, **34**, 660–665.
3. D. Ørstavik, I. Nordahl I and J. E. Tibballs: Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent. Mater.*, 2001, **17**, 512–519.
4. M. Torabinejad and N. Chivian: Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, 1999, **25**, 197–205.
5. C. Main, N. Mirzayan, S. Shabahang and M. Torabinejad: Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J. Endod.*, 2004, **30**, 80–83.
6. S. Asgary, M. Parirokh, M. F. Eghbal and F. Brink: Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, 2005, **31**, 101–103.
7. T. Dammaschke, H. U. V. Gerth, H. Zuchner and E. Schafer: Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent. Mater.*, 2005, **21**, 731–738.
8. J. Camilleri and Pitt Ford T. R: Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int. Endod. J.*, 2006, **39**, 747–754.
9. M. L. Accorinte, R. Holland, A. Reis A, M. C. Bortoluzzi, S. S. Murata, E. Dezan, V. Souza and L. D. Alessandro: Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J. Endod.*, 2008, **34**, 1–6.
10. R. Menezes, C. M. Bramante, A. Letra, V. G. Carvalho and R. B. Garcia: Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2004, **98**, 376–379.
11. W. E. Andelin, S. Shabahang, K. Wright and M. Torabinejad: Identification of hard tissue after experimental pulp caping using dentin Sialoprotein (DSP) as a marker. *J. Endod.*, 2003, **29**, 646–650.
12. I. M. Faraco and R. Holland: Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent. Traumatol.*, 2001, **17**, 163–166.
13. K. S. Min, H. J. Park, S. K. Lee, S. H. Park, C. U. Hong, H. W. Kim, H. H. Lee and E. C. Kim: Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin Sialoprotein and Heme Oxygenase-1 in human dental pulp. *J. Endod.*, 2008, **34**, 666–670.
14. M. Kuratate, K. Yoshiba, Y. Shigetani, N. Yoshiba, H. Ohshima and T. Okiji: Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, 2008, **34**, 970–974.

15. J. Camilleri, F. E. Montesin, K. Brady, R. Sweeney, R. V. Curtis and T. R. Ford: The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent. Mater.*, 2005, **21**, 297–303.
16. H. O. Ozdemir, B. Ozçelik, B. Karabucak and Z. C. Cehreli: Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects. *Dent. Traumatol.*, 2008, **24**, 70–73.
17. M. Torabinejad, C. U. Hong, F. McDonald and T. R. Pitt Ford: Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J. Endod.*, 1995, **21**, 349–353.
18. B. S. Ber, J. F. Hatton and G. P. Stewart: Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J. Endod.*, 2007, **33**, 1231–1234.
19. M. Fridland and R. Rosado: Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J. Endod.*, 2003, **29**, 814–817.
20. I. R. Oliveira, V. C. Pandolfelli and M. Jacobovitz: Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *Int. Endod. J.*, 2010, **43**.
21. J. K. Jr Weldon, D. H. Pashley, R. J. Loushine, R. N. Weller and W. F. Kimbrough: Sealing ability of mineral trioxide aggregate and super-EBA when used as furcation repair materials: a longitudinal study. *J. Endod.*, 2002, **28**, 467–470.
22. M. H. Nekoofar, G. Adusei, M. S. Sheykhrezae, S. J. Hayes, S. T. Bryant and P. M. Dummer: The effect of condensation pressure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *Int. Endod. J.*, 2007, **40**, 453–461.
23. M. L. Porter, A. Bertó, C. M. Primus and I. Watanabe: Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. *J. Endod.*, 2010, **36**, 524–528.
24. M. Jacobovitz and R. K. de Pontes Lima: The use of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on apexification of a replanted tooth: a case report. *Dent. Traumatol.*, 2009, **25**, e32–36.
25. S. Vosoughhosseini, M. Lotfi, S. Shahi, H. Baloo, M. Mesgariabbasi, M. A. Saghiri, V. Zand, S. Rahimi and B. Ranjkesh: Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J. Endod.*, 2008, **34**, 715–717.
26. V. C. Pandolfelli, I. R. Oliveira, H. L. Rosseto and M. Jacobovitz: A composition based on aluminate cement for application in endodontics and the obtained cement product. Patent registration INPI 0704502-6. (Patent registration, Portuguese), 2007.
27. M. Jacobovitz, M. E. Vianna, V. C. Pandolfelli, I. R. Oliveira, H. L. Rossetto and B. P. Gomes: Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2009, **108**, 140–144.
28. International Standards Organization. Dental Root Canal Sealing Materials. BS EN ISO 6876-7·8, 2001
29. ANSI/ADA. Specification N°. 57 Endodontic sealing material. Chicago, IL: ANSI/ADA, 2000 (Reaffirmed 2006).
30. K. B. Wiltbank, S. A. Schwartz and W. G. Schindler: Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J. Endod.*, 2007, **33**, 1235–1238.
31. T. H. Huang, M. Y. Shie, C. T. Kao and S. J. Ding: The effect of setting accelerator on properties of mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, 2008, **34**, 590–593.
32. J. D. Watts, D. M. Holt, T. J. Beeson, T. C. Kirkpatrick and R. E. Rutledge: Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, 2007, **33**, 970–973.
33. I. Islam, H. K. Chng and A. U. Yap: Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J. Endod.*, 2006, **32**, 193–197.
34. D. M. Holt, J. D. Watts, T. J. Beeson, T. C. Kirkpatrick and R. E. Rutledge: The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J. Endod.*, 2007, **33**, 844–847.
35. F. W. Locher, S. Sprung and P. Korf: Effect of the particle size distribution on the strength of Portland cement. *ZKG Int.*, 1973, **26**, 349–355.

Biocompatibility of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder)

Fabiano Gamero Aguilar, DDS, MSc, Lucas Fonseca Roberti Garcia, DDS, MSc, PhD, and Fernanda Carvalho Panzeri Pires-de-Souza, DDS, MSc, PhD

Abstract

Introduction: The purpose of this study was to evaluate the biocompatibility of calcium aluminate cement (EndoBinder) in subcutaneous tissue of rats. **Methods:** Fifteen rats, weighing 300 g, were separated into 3 groups (n = 5) in accordance with the time of death (7, 21, 42 days). Two incisions were made in the dorsal subcutaneous tissue of each rat in which were implanted 2 polyethylene tubes filled with the test materials, EndoBinder (EB) and Grey MTA (GMTA). The external tube walls were considered the negative control group (CG). After 7, 21, and 42 days, animals were killed, obtaining 5 samples per group, at each time interval of analysis. **Results:** From the morphologic and morphometric analyses by using a score of (0–3) (50, 100, and 400×), results showed absence of inflammatory reaction (0) for EB after 42 days. However, for GMTA, a slight inflammatory reaction (1) was observed after 42 days, which means the persistence of a chronic inflammatory process. When compared with CG, tissue reaction ranging from discrete (1–7 days) to absent (0–42 days) was observed. **Conclusions:** EndoBinder presented satisfactory tissue reaction; it was biocompatible when tested in subcutaneous tissue of rats. *(J Endod 2012;38:367–371)*

Key Words

Biocompatibility, calcium aluminate cement, mineral trioxide aggregate, tissue reaction

From the Department of Dental Materials and Prosthodontics, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Address requests for reprints to Professor Fernanda Carvalho Panzeri Pires-de-Souza, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP), Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Avenida do Café, s/n, Bairro Monte Alegre, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail address: ferpanzeri@forp.usp.br

0099-2399/$ - see front matter

Copyright © 2012 American Association of Endodontists.

doi:10.1016/j.joen.2011.11.002

Cements routinely used in endodontic therapy are applied in intimate contact with periapical tissues and must therefore present adequate biological compatibility (1). Among these cements, mineral trioxide aggregate (MTA) is outstanding. It was originally developed as a material for retrograde filling and treatment of root and furca perforations (2, 3), but because of its good clinical performance and biocompatibility (1, 2) it has been used in various other situations, among them pulp capping (4) and pulpotomy (5).

MTA is composed of Portland cement (75 wt-%), Bi_2O_3 (20 wt-%), and dehydrated $CaSO_4$ (5 wt-%). Portland cement, in turn, is constituted by SiO_2 (21.2 wt-%), CaO (68.1 wt-%), Al_2O_3 (4.7 wt-%), MgO (0.48 wt-%), and Fe_2O_3 (1.89 wt-%). In the manufacturing process, they are proportioned and heated up to 1600°C to obtain a powder composed of $3CaO.SiO_2$, $2CaO.SiO_2$, $3CaO.Al_2O_3$, and $4CaO.Al_2O_3.Fe_2O_3$. Gypsum ($CaSO_4.4H_2O$) is then added to control the setting time of the cement (1, 2).

MTA is capable of inducing reparative hard tissue formation on exposed pulp in addition to promoting greater dentin bridge formation than materials previously used for this purpose (6, 7). Studies have reported that in humans, the pulp repair process is induced in a more effective manner by MTA than by calcium hydroxide, which is known to cause inflammation initially and necrosis of the area close to the exposure (7–9).

The repair process promoted by MTA begins during hydration of the material, when calcium disilicate and trisilicate react with water to form calcium hydroxide and hydrated calcium silicate gel, producing an alkaline pH (10). Calcium ions are then released and diffused through dentinal tubules so that their concentration increases as the setting time of the material passes (11).

In spite of the recognized reparative capacity of MTA, some negative characteristics of the material must be taken into consideration, such as the long setting time, which makes it difficult to apply (12, 13); difficulty with manipulating it, which makes it highly unstable and compromises its mechanical properties (14, 15); low flow capacity (2); and high rate of dental structure staining (16, 17). These points justify the development of new dental materials that have adequate mechanical properties and are biologically compatible (18).

Therefore, a new calcium aluminate–based endodontic cement (patent number PI0704502-6, 2007), called EndoBinder (Binderware, São Carlos, SP, Brazil), has been developed, with the intention of preserving the properties and clinical applications of MTA without its negative characteristics.

EndoBinder is produced by the process of calcining Al_2O_3 and $CaCO_3$ at temperatures between 1315°C and 1425°C. The calcium aluminate formed is cooled and triturated until a suitable particle size is obtained with high levels of purity (19), eliminating traces of free MgO and CaO, which are responsible for the undesired expansion of the material (20), and Fe_2O_3, which is responsible for tooth darkening (16, 17). Bismuth oxide (20 wt-%) is then added to the material to guarantee sufficient radiopacity (21), in accordance with ISO specification 6876 (22). It is known that this material presents adequate physical and mechanical properties (15) and good cell response, allowing greater development of cells at an advanced state of osteoblastic differentiation than obtained with MTA (23). However, there are no data with regard to inflammatory response to the material in connective and pulp tissues.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the biocompatibility of the new calcium aluminate cement (EndoBinder) comparatively with MTA by subcutaneous implants in rats. The null hypothesis tested was that there would be no difference in tissue reaction caused by the 2 cements.

Materials and Methods

This study was developed in accordance with the determinations of the Research Ethics Committee on the Use of Animals of the Ribeirão Preto School of Dentistry (USP) (process no. 10.1.793.53.3), in compliance with the ethical principles for use of laboratory animals at all stages of the experiment. Fifteen male rats (*Rattus novergicus*, Wistar) were selected; they were standardized with regard to health, age, and weight (300 g), with 5 specimens being used for each of the evaluation time intervals (7, 21, and 42 days).

Two materials were analyzed, EndoBinder (EB) and MTA Grey (GMTA) (Ângelus, Londrina, Paraná, Brazil), which were manipulated in accordance with the manufacturers' recommendations. For EB, the proportion of 1 g of powder to 0.21 mL of distilled water was used, and for GMTA 1 dose of powder to 1 drop of distilled water was used.

After manipulation, polyethylene tubes with an internal diameter of 0.8 mm, obtained according to the methodology described by Cunha et al (24), were filled with the cements by using sterile lentulo spiral (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland) compatible with the internal diameter of the tubes.

For the surgical procedures, the animals were anesthetized by intraperitoneal administration of a solution composed of 10% ketamine chloride (Ketamina Agener; União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brazil; 75 mg/kg) and xylazine (Dopazer; Laboratórios Calier S.A, Barcelona, Spain; 10 mg/kg).

After trichotomy and disinfection with 5% iodine solution, two 5-mm-wide incisions were made in the dorsum of each animal by using a scalpel blade no. 15. Divulsion of the subcutaneous tissue was performed with a rhomboid tip scissors, obtaining 2 surgical recesses measuring an average of 20 mm, 1 scapular (EB) and 1 pelvic (GMTA), in which the tubes filled with the cements were implanted. After this, suturing was performed with silk thread 3/0. The external tube walls were considered the negative control group (CG) (24).

After time intervals of 7, 21, and 42 days, the animals were killed by anesthetic overdose, and excisional biopsy of the implant area was performed for histologic processing, totaling 5 samples for each time interval of analysis (n = 5). After this, the surgical parts were fixed in 10% formalin solution (Merck, Darmstadt, Germany) for 24 hours and submitted to laboratory processing. Connective tissue adjacent to the opening of each tube was sectioned in a microtome into semi-serial cuts 5 μm thick in the longitudinal direction, with 10 cuts being discarded and 5 stained with hematoxylin-eosin.

Histopathologic analysis was carried out blindly by a single examiner who used an optical light microscope Axio Star Plus (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 50, 100, and 400× magnifications. The histopathologic events quantified were as follows: inflammatory infiltrate (polymorphonuclear and mononuclear cells), cellularity and vascularization capacity (fibroblasts and blood vessels), and macrophagic activity (mononuclear phagocytes or macrophages and inflammatory giant cells). On the basis of the values obtained from the quantitative analysis and in accordance with the ISO standard 7405 (25), a score was produced to grade the inflammatory reaction: (0) absent: inflammatory capsule formation of small amplitude and absence of inflammatory infiltrate; (1) discrete: inflammatory capsule formation and absence of inflammatory infiltrate or inflammatory capsule formation with few plasmocytes and lymphocytes; (2) moderate: inflammatory capsule formation with the presence of mononuclear phagocytes, polymorphonuclear cells, plasmocytes, and lymphocytes; and (3) intense: large accumulation of polymorphonuclear cells, plasmocytes, lymphocytes, mononuclear phagocytes, inflammatory giant cells, congested blood vessels (edema formation), and necrosis.

The amplitude of the inflammatory capsule (μm) was gauged with the aid of Axio Vision 4.6 (Carl Zeiss) software, and the values obtained were submitted to statistical analysis (2-way analysis of variance, Bonferroni, $P < .05$).

Results

The values obtained for all the histopathologic events evaluated in each time interval are presented in Table 1.

Period of 7 Days

After 7 days, EB and GMTA presented inflammatory infiltrate of moderate amplitude, with predominance of polymorphous and mononuclear cells. With EB there were moderate fibroangioblastic proliferation and collagen formation, with blood vessel neoformation without evidence of congestion, as compared with GMTA, in which congested blood vessels were observed, indicative of edema formation (Fig. 1*A*). In both groups mononuclear phagocytes were found (macrophages) and a moderate quantity of inflammatory giant cells; this was at the periphery of the area of analysis in EB, without necrotic residue (Fig. 1*B*). In group GMTA many macrophage phagocyting residues of dispersed material were found, in addition to the presence of small quantities of necrotic residues. As regards the control analysis, discrete fibroangioblastic proliferation and collagen formation were identified, with blood vessel neoformation but without signs of congestion, in addition to discrete presence of mononuclear phagocytes and inflammatory giant cells, without necrotic residue (Fig. 1*C*).

Period of 21 Days

After 21 days there was evidence of a decrease in the number of inflammatory infiltrate cells in all groups. EB and CG presented discrete macrophagic activity, which was performed preponderantly by inflammatory giant cells. GMTA presented discrete/moderate macrophagic

TABLE 1. Summary of Data Obtained for Histopathologic Events Observed in Each Group in Different Time Intervals of the Study

	7 days			21 days			42 days		
Histopathologic events	EB	GMTA	CG	EB	GMTA	CG	EB	GMTA	CG
Polymorphonuclear/mononuclear	2	2	2	2	2	1	1	1	0
Fibroblasts	2	2	1	1	1	0	1	1	0
Blood vessels	2	3	0	1	2	0	0	1	0
Macrophage	2	2	1	1	2	0	1	1	0
Giant inflammatory cells	2	2	1	2	2	1	0	1	0

Score: (0) absent; (1) discrete; (2) moderate; (3) intense.

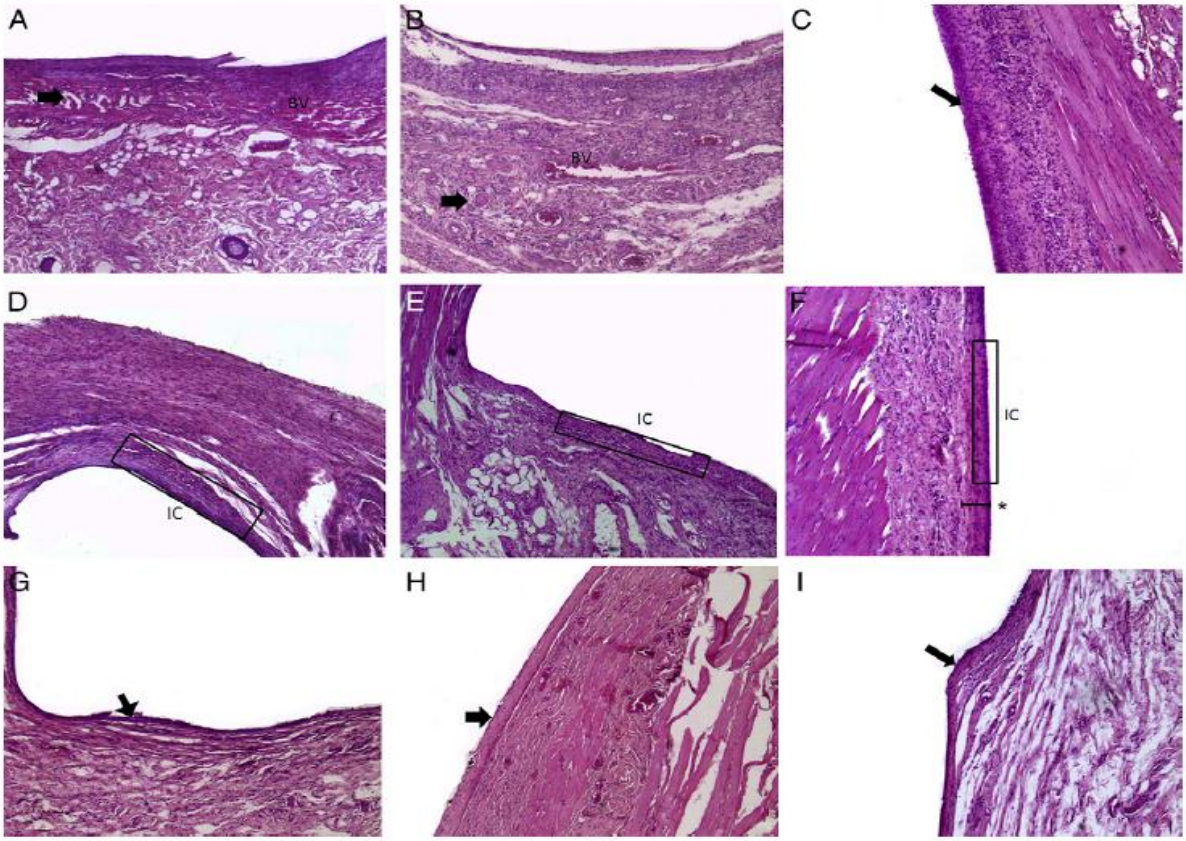


Figure 1. (*A*) GMTA 7 days: moderate inflammatory infiltrate, with presence of congested blood vessels (BV) indicative of edema formation (*arrow*). (*B*) EB 7 days: inflammatory infiltrate similar to that of GMTA, blood vessel neoformation (BV) without congestion and inflammatory giant cells at the periphery of area of analysis (*arrow*). (*C*) CG 7days: inflammatory infiltrate of moderate amplitude (*arrow*). (*D–F*) 21 days: delimitation of area of analysis (inflammatory capsule [IC]) for GMTA, EB, and CG, respectively. (*F*) Inflammatory capsule amplitude (*asterisk*). (*G–I*) 42 days: reduction in inflammatory process (*arrow*) in groups GMTA, EB, and CG, respectively (original magnification, 50×; hematoxylin-eosin).

activity by mononuclear phagocytes and inflammatory giant cells. There was also a reduction in the number of congested blood vessels in GMTA, characterizing a reduction in edema formation at the periphery of the area of analysis. No foci of mineralization or necrosis were observed adjacent to the area of analysis in any of the groups (Fig. 1*D–F*).

Period of 42 Days

After 42 days, EB and GMTA presented discrete inflammatory infiltrate, with the presence of a small number of mononuclear cells. No inflammatory giant cells were observed for EB other than a discrete quantity of mononuclear phagocytes. There was also evidence of discrete/absence of fibroangioblastic proliferation. For GMTA a discrete quantity of inflammatory giant cells and mononuclear phagocytes was observed in addition to discrete fibroangioblastic proliferation, without congested blood vessels.

In the control analysis (CG) no histopathologic events characteristic of inflammation were observed. The general rate of inflammation for GMTA in this period was 1 (discrete), characteristic of a tenuous chronic inflammatory process because of the presence of some inflammatory giant cells, without compromising the biological compatibility of the material (Fig. 1*G*), whereas for EB and CG the rate was 0 (absent), proving the biological compatibility of EB (Fig. 1*H* and *I*).

Table 2 presents the mean values of inflammatory capsule thickness in the different time intervals of analysis.

During the course of the periods of analysis, the decreasing amplitude of inflammatory capsule formation was verified. The capsule formed in EB in the period of 7 days was slightly smaller than that in GMTA, without statistically significant difference ($P > .05$) between the groups and statistically different from CG ($P <$

TABLE 2. Mean Thickness (μm) of Inflammatory Capsule at Interface with the Tested Cements (EB and GMTA) and CG after Periods of 7, 21, and 42 Days

	Groups		
Period (days)	EB	GMTA	CG
7	121.22^{a}	134.66^{a}	90.83^{b}
21	63.02^{ab}	81.75^{a}	56.29^{b}
42	41.74^{ab}	57.36^{a}	26.14^{b}

Different superscript letters in rows indicate statistically significant difference ($P < .05$).

.05). In the final period of analysis (42 days), all the groups presented decrease in amplitude of the inflammatory capsule; however, GMTA presented the largest capsule dimension, differing statistically from CG ($P < .05$), which presented the smallest capsule thickness.

Discussion

One of the main characteristics of endodontic cements must be biocompatibility (26). Subcutaneous implants in rats have frequently been used to evaluate the biological compatibility of various dental materials (27), because they are capable of determining with precision the type and extension of the local reaction caused by these materials (28, 29).

The aim of this study was to evaluate the tissue reaction caused by a new calcium aluminate cement. According to the results obtained, the null hypothesis tested must be rejected, because the use of EB produced less tissue reaction than MTA at levels similar to those of CG after 42 days, proving its biocompatibility when tested in rat subcutaneous tissue.

Hydrophilic setting cements depend entirely on the physical-chemical interaction of the cement with the medium, a factor associated with solubility and disintegration of the material (30). It is known that MTA, because of its long setting time (12), becomes highly unstable when wet before it has completely hardened (31), which is a circumstance found in the oral medium in which MTA is routinely used (14). This situation promotes greater solubility and disintegration of the cement and, consequently, greater leaching of the components present in the material (32), among them, arsenic (26). Studies have reported that this component is leached out from MTA (26, 33); however, according to Matsunaga et al (34), the quantity of arsenic released is below the safe limits proposed by ISO standard 9917-1 (35) and does not compromise the biocompatibility of MTA.

Calcium aluminate–based cements such as EB are generally composed of 3 main stoichiometric phases responsible for the hydrophilic setting process of the material: CA phase ($CaO.Al_2O_3$), comprising around 40%–70% of the product; CA_2 ($CaO.2Al_2O_3$) phase, which is ranked second in proportion (>25%); and $C_{12}A_7$ ($12CaO.7Al_2O_3$) phase, consisting of around 10% (15). Irrespective of the composition of the calcium aluminate–based cement, the setting of the material begins with the reaction between the cement and water, which results in a dissolution of calcium ions (Ca^{2+}) and tetrahydroxy-aluminate ($Al(OH)_4^-$). This process continues until the solution attains a sufficient level of saturation to promote its precipitation, followed by the growth of the crystals present in the phases known as calcium aluminate hydrates (15). The hydrated phases precipitated form strong bonds between the particles that compose the cement, characterizing its setting and giving the material mechanical strength and biological tolerance with regard to living tissues because of the balance allowed between phases rich in Al_2O_3 and $CaCO_3$ (15, 19, 23). This balance allows control over the cement setting time, minimizing the incorporation of additives into its original formula (15, 19). The shorter setting time, in turn, guarantees better conditions for clinical application of the cement, in addition to diminishing its solubility and disintegration in the oral medium (19, 36).

The results of the present study demonstrated absence of inflammatory reaction for EB on conclusion of the 42 days of analysis. In this same period, discrete inflammatory reaction was observed for GMTA, which means persistence of a chronic inflammatory process. Nevertheless, in accordance with ISO standard 7405 (25), a moderate inflammatory reaction 2 weeks after implant placement, with a trend toward decrease after 12 weeks, is considered acceptable, as seen with the results observed in GMTA.

Materials in intimate contact with living tissues become irritants; however, more important than the irritant potential of these materials is the duration of this effect on tissues (37). Yaltirik et al (38) demonstrated a chronic inflammatory process in samples that contained MTA 60 days after subcutaneous implantation of the material. The amount of cells present in the inflammatory infiltrate (polymorphous and mononuclear) had reduced significantly in comparison with the initial periods of analysis; however, there was still presence of macrophages and inflammatory giant cells phagocyting MTA particles dispersed in the connective tissue, a situation similar to that found in the present study, characterizing the permanence of the inflammatory process.

On the other hand, several other studies have demonstrated the excellent biological properties of both commercial forms of MTA, with conflicting results (1, 8, 37, 38). Shahi et al (37) reported in their study that after 3 days of subcutaneous implantation, White MTA was more biocompatible than GMTA. However, after 7 days, GMTA was more biocompatible, and after 21 days, there were no significant differences between the cements.

The biocompatibility of MTA is related to its capacity of releasing calcium ions and, consequently, to the alkaline pH produced by the material (30, 39). When exposed to a humid medium, MTA released calcium silicate and calcium oxide (12). The calcium oxide released produces calcium hydroxide after reacting with the tissue fluids, which in turn release calcium ions. The excess of calcium ions becomes irritant to tissues, resulting in a persistent inflammatory process (12, 37, 38). In spite of the decrease in the inflammatory process observed in GMTA over the course of time, the persistence of tissue irritation at the end of 42 days indicates that the gradual release of calcium ions could be the factor responsible for continual irritation caused by the material, although with less intensity (37).

Although this calcium ion release promoted by MTA contributes to making the medium inhospitable to bacterial growth (40), its high concentration after hydration might contribute to fibrosis of the adjacent tissues (41). However, this event was not observed for GMTA in this study, because only discrete fibroangioblastic proliferation was observed on conclusion of 42 days of analysis.

In the same manner in which it occurs with MTA, calcium aluminate–based cements are capable of raising the pH of the medium, making it alkaline (42). Alkalization of the medium occurs through dissociation of calcium ions and hydroxyl ions when the material comes into contact with water. However, in the process of synthesis of Endo-Binder, phases with a low Ca content are privileged, causing the cement to release a smaller quantity of calcium ions, making it less irritant and cytotoxic without compromising its antimicrobiological capacity (19, 43). This fact might have been fundamental in the good biological response observed for EB on conclusion of the 42 days of analysis, a situation not found for GMTA.

Overall, an inflammatory reaction with chronic development was observed in the different groups during the course of the period of analysis, with a reactionary capsule of decreasing amplitude, richly vascularized and cellularized during the initial period of analysis, presenting progressive collagen formation in the periods that followed, and inflammatory infiltrate with predominance of mononuclear cells (1, 24, 37, 38). In some samples, the presence of mononuclear phagocytes and inflammatory giant cells, although reduced in number, caused an active reactionary process, which at all times showed less expression for EB.

Thus, it was concluded that EB presented less tissue reaction than MTA and was biocompatible when tested in rat subcutaneous tissue. Nevertheless, in spite of the good results obtained for EB, it is valid to emphasize that studies related to other biological properties of this

new cement, such as reparative capacity, must be conducted before its validation as an endodontic treatment option.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part II: leakage and biocompatibility investigations. J Endod 2010;36:190–202.
2. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. J Endod 1999;25:197–205.
3. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. J Endod 2004;30:80–3.
4. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. J Endod 2003;29:646–50.
5. Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. J Endod 2008;34:1–6.
6. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. Dent Traumatol 2001;17:163–6.
7. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. J Endod 2010;36:1042–7.
8. Min KS, Park HJ, Lee SK, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. J Endod 2008;34:666–70.
9. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. J Endod 2008;34:970–4.
10. Dammaschke T, Gerth HUV, Zuchner H, Schafer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. Dent Mater 2005;21:731–8.
11. Ozdemir HO, Ozçelik B, Karabucak B, Cehreli ZC. Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects. Dent Traumatol 2008;24:70–3.
12. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 1995;21:349–53.
13. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. J Endod 2007;33:1231–4.
14. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. J Endod 2003;29:814–7.
15. Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. Int Endod J 2010;43:1069–76.
16. Jacobovitz M, de Lima RKP. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. Int Endod J 2008;41:905–12.
17. Jacobovitz M, de Lima RKP. The use of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on apexification of a replanted tooth: a case report. Dent Traumatol 2009;25:e32–6.
18. Porter ML, Bertó A, Primus CM, Watanabe I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. J Endod 2010;36:524–8.
19. Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rosseto HL, Jacobovitz M. A composition based on aluminate cement for application in endodontics and the obtained cement product. Patent registration INPI 0704502-6 (Portuguese), 2007.
20. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. Dent Mater 2001;17:512–9.
21. Aguilar FG, Garcia Ida F, Rossetto HL, Pardini LC, Pires-de-Souza Fde C. Radiopacity evaluation of calcium aluminate cement containing different radiopacifying agents. J Endod 2011;37:67–71.
22. International Standards Organization. Dental root canal sealing materials. BS EN ISO 6876-7.8, 2001.
23. Castro-Raucci LM, Oliveira IR, Teixeira IN, Rosa AL, Oliveira PT, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. Braz Dent J 2011;22:99–104.
24. Cunha SA, Rached FJ Jr, Alfredo E, León JE, Perez DE. Biocompatibility of sealers used in apical surgery: a histological study in rat subcutaneous tissue. Braz Dent J 2011;22:299–305.
25. International Standards Organization. Dentistry: evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. ISO 7405, 2008.
26. Duarte MAH, De Oliveira Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99:648–50.
27. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. Int Endod J 2003;36:281–7.
28. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. J Endod 2004;30:348–51.
29. Zafalon EJ, Versiani MA, de Souza CJ, Moura CC, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:e88–94.
30. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. J Endod 2005;31:97–100.
31. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. J Endod 2007;33:1231–4.
32. Bodanezi A, Carvalho N, Silva D, et al. Immediate and delayed solubility of mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Appl Oral Sci 2008;16:127–31.
33. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Endod 2010;36:1210–5.
34. Matsunaga T, Tsujimoto M, Kawashima T. Analysis of arsenic in gray and white mineral trioxide aggregates by using atomic absorption spectrometry. J Endod 2010;36:1988–90.
35. International Standards Organization. Water-based cements: part 1—powder/liquid acid-base cements. ISO 9917-1, 2007.
36. Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Extended setting shrinkage behavior of endodontic sealers. J Endod 2008;34:90–3.
37. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. J Endod 2006;32:776–80.
38. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod 2004;30:95–9.
39. Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:e35–8.
40. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J 2000;11:3–9.
41. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. J Endod 2008;34:715–7.
42. Santos AD, Moraes JC, Araújo EB, Yukimitu K, Valério Filho WV. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. Int Endod J 2005;38:443–7.
43. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:140–4.

- **Análise quantitativa de 7 dias**

1. **Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados.**

Tabela 8 - Valores encontrados para células polimorfonucleares e mononucleares em 7 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	37,0	39,0	14,0
	2	29,0	31,0	17,0
	3	33,0	34,0	12,0
Média		**33,0**	**34,6**	**14,3**
	1	32,0	34,0	11,0
	2	23,0	22,0	11,0
	3	30,0	37,0	17,0
Média		**28,3**	**31,0**	**13,0**
	1	25,0	32,0	12,0
	2	31,0	30,0	12,0
	3	31,0	31,0	16,0
Média		**29,0**	**31,0**	**13,3**
	1	31,0	36,0	10,0
	2	27,0	34,0	11,0
	3	32,0	31,0	14,0
Média		**30,0**	**33,7**	**11,7**
	1	24,0	34,0	12,0
	2	32,0	32,0	11,0
	3	32,0	37,0	16,0
Média		**29,3**	**34,3**	**13,0**
Média Final		**29,9**	**32,9**	**13,6**

Tabela 9 - Valores encontrados para fibroblastos em 7 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	24,0	31,0	11,0
	2	21,0	26,0	14,0
	3	20,0	28,0	15,0
Média		**21,7**	**28,3**	**13,3**
	1	23,0	30,0	12,0
	2	28,0	26,0	11,0
	3	23,0	29,0	12,0
Média		**24,7**	**28,3**	**11,7**
	1	26,0	26,0	12,0
	2	24,0	32,0	15,0
	3	21,0	25,0	11,0
Média		**23,7**	**27,7**	**12,7**
	1	22,0	21,0	11,0
	2	25,0	26,0	14,0
	3	24,0	29,0	15,0
Média		**23,7**	**25,3**	**13,3**
	1	24,0	23,0	12,0
	2	24,0	26,0	11,0
	3	27,0	31,0	12,0
Média		**25,0**	**26,7**	**11,7**
Média Final		**23,7**	**27,3**	**12,5**

Tabela 10 - Valores encontrados para vasos sanguíneos em 7 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	2,0	5,0	0,0
	2	1,0	2,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0
Média		**1,3**	**2,7**	**0,7**
	1	2,0	4,0	1,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	2,0	1,0	0,0
Média		**1,7**	**2,0**	**0,3**
	1	1,0	4,0	0,0
	2	1,0	2,0	0,0
	3	2,0	3,0	1,0
Média		**1,3**	**3,0**	**0,3**
	1	1,0	3,0	1,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	2,0	1,0	0,0
Média		**1,3**	**1,7**	**0,3**
	1	1,0	4,0	0,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	2,0	2,0	1,0
Média		**1,3**	**1,3**	**1,3**
Média Final		**1,4**	**2,1**	**0,6**

Tabela 11 - Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 7 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	1,0	2,0	0,0
	2	1,0	2,0	1,0
	3	1,0	1,0	0,0
Média		**1,0**	**1,7**	**0,3**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0
	3	2,0	2,0	2,0
Média		**1,3**	**1,3**	**1,3**
	1	1,0	2	0
	2	2,0	1	0
	3	1,0	2	1
Média		**1,3**	**1,7**	**0,3**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0
Média		**1,0**	**1,0**	**1,0**
	1	1,0	2	0
	2	1,0	1	0
	3	2,0	2	1
Média		**1,3**	**1,7**	**0,3**
Média Final		**1,2**	**1,5**	**0,7**

Tabela 12 - Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 7 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	0,0	2,0	0,0
Média		**0,7**	**1,3**	**0,0**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	1,0	1,0
Média		**0,7**	**1,0**	**0,7**
	1	1,0	0,0	1,0
	2	1,0	2,0	1,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**1,0**	**0,7**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	2,0	1,0
	3	0,0	2,0	0,0
Média		**0,7**	**1,7**	**0,7**
	1	1,0	0,0	1,0
	2	1,0	2,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0
Média		**1,0**	**1,0**	**1,0**
Média Final		**0,7**	**1,2**	**0,6**

Tabela 13 - Valores encontrados para espessura da cápsula fibrosa (µm) em 7 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	139,85	170,59	96,91
	2	124,01	139,55	85,22
	3	119,64	179,11	102,86
Média		**127,80**	**163,10**	**95,00**
	1	105,43	125,77	76,40
	2	123,87	147,21	74,24
	3	115,62	140,52	96,72
Média		**114,97**	**137,83**	**82,45**
	1	103,58	120,14	108,86
	2	104,45	126,83	96,22
	3	131,30	130,48	87,97
Média		**113,11**	**125,81**	**97,68**
	1	108,86	126,28	90,73
	2	125,09	124,51	75,53
	3	157,57	130,45	95,65
Média		**130,50**	**127,08**	**87,30**
	1	115,07	125,80	97,40
	2	115,56	119,59	82,21
	3	128,52	113,07	95,48
Média		**119,71**	**119,50**	**91,70**
Média Final		**121,21**	**134,66**	**90,82**

Tabela 14 - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 7 dias.

Eventos Histopatológicos				
		EBOB	MTA	Controle
Infiltrado inflamatório	Polimorfonucleares e mononucleares	29,9	32,9	13,6
Celularidade/Vascularização	Fibroblastos	23,7	27,3	12,5
	Vasos sanguíneos	1,4	2,1	0,6
Atividade macrofágica	Fagócito mononuclear (macrófago)	1,2	1,5	0,7
	Células Gigantes Inflamatórias	0,7	1,2	0,6
	Espessura da cápsula fibrosa	121,21	134,66	90,82
	Índice Geral de Inflamação (IGI)	2	2	1

IGI escore - 0 ausente; 1 discreto; 2 moderado; 3 severo.

- **Análise quantitativa de 21 dias.**

1. **Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados.**

Tabela 15 - Valores encontrados para células polimorfonucleares e mononucleares em 21 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	20,0	31,0	7,0
	2	27,0	32,0	10,0
	3	27,0	26,0	11,0
Média		**24,7**	**29,7**	**9,3**
	1	26,0	27,0	11,0
	2	23,0	26,0	10,0
	3	26,0	24,0	7,0
Média		**25,0**	**25,7**	**9,3**
	1	29,0	24,0	15,0
	2	27,0	32,0	12,0
	3	24,0	27,0	6,0
Média		**26,7**	**27,7**	**11,0**
	1	26,0	32,0	12,0
	2	26,0	28,0	17,0
	3	31,0	24,0	7,0
Média		**27,7**	**28,0**	**12,0**
	1	31,0	34,0	12,0
	2	28,0	32,0	7,0
	3	25,0	29,0	10,0
Média		**28,0**	**31,7**	**9,7**
Média Final		**26,4**	**28,5**	**10,3**

Tabela 16 - Valores encontrados para fibroblastos em 21 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	14,0	14,0	4,0
	2	11,0	12,0	4,0
	3	10,0	13,0	5,0
Média		**11,7**	**13,0**	**4,3**
	1	14,0	14,0	14,0
	2	12,0	12,0	12,0
	3	11,0	11,0	11,0
Média		**12,3**	**12,3**	**12,3**
	1	15,0	13,0	4,0
	2	12,0	12,0	3,0
	3	12,0	13,0	2,0
Média		**13,0**	**12,7**	**3,0**
	1	13,0	14,0	3,0
	2	12,0	14,0	4,0
	3	10,0	13,0	3,0
Média		**11,7**	**13,7**	**3,3**
	1	15,0	14,0	4,0
	2	10,0	13,0	3,0
	3	12,0	13,0	3,0
Média		**12,3**	**13,3**	**3,3**
Média Final		**12,2**	**13,0**	**5,3**

Tabela 17 - Valores encontrados para vasos sanguíneos em 21 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	2,0	0,0
	3	1,0	2,0	0,0
Média		**1,0**	**1,7**	**0,0**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	2,0	0,0
	3	1,0	2,0	0,0
Média		**1,0**	**1,7**	**0,3**
	1	1,0	2,0	1,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	2,0	0,0
Média		**0,7**	**1,7**	**0,3**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	2,0	1,0
	3	1,0	2,0	0,0
Média		**1,0**	**1,7**	**0,7**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0
	3	2,0	2,0	2,0
Média		**1,3**	**1,3**	**1,3**
Média Final		**1,0**	**1,6**	**0,5**

Tabela 18 - Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 21 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	1,0	2,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0
	3	1,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**1,0**	**0,0**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	2,0	0,0
Média		**0,7**	**1,3**	**0,3**
	1	0,0	2,0	1,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	2,0	0,0
Média		**0,3**	**1,7**	**0,3**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0
	3	0,0	0,0	0,0
Média		**0,7**	**0,7**	**0,7**
	1	1,0	2,0	1,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	1,0	2,0	1,0
Média		**1,0**	**1,7**	**0,7**
Média Final		**0,7**	**1,3**	**0,4**

Tabela 19 - Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 21 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	0,0	1,0	0,0
	2	0,0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0	0,0
Média		**0,3**	**1,0**	**0,3**
	1	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	0,0	1,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**0,7**	**0,3**
	1	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	0,0	0,0	1,0
Média		**0,7**	**0,7**	**0,3**
	1	1,0	1,0	0,0
	2	2,0	1,0	1,0
	3	1,0	0,0	1,0
Média		**1,3**	**0,7**	**0,7**
	1	0,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	1,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**1,0**	**0,3**
Média Final		**0,7**	**0,8**	**0,4**

Tabela 20 - Valores encontrados para espessura da cápsula fibrosa (µm) em 21 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	53,33	66,67	41,92
	2	63,44	77,22	50,85
	3	45,80	82,66	55,74
Média		**54,19**	**75,52**	**49,50**
	1	51,55	66,43	44,69
	2	92,35	76,51	41,92
	3	79,55	74,48	50,86
Média		**74,48**	**72,47**	**45,82**
	1	44,88	77,42	50,90
	2	59,22	69,58	74,26
	3	56,75	69,16	50,19
Média		**53,62**	**72,05**	**58,45**
	1	66,19	80,42	78,43
	2	55,69	82,23	61,86
	3	82,81	101,03	61,31
Média		**68,23**	**87,89**	**67,20**
	1	71,72	105,43	65,98
	2	65,53	106,71	55,67
	3	56,51	90,25	59,83
Média		**64,59**	**100,80**	**60,49**
Média Final		**63,00**	**81,70**	**56,30**

Tabela 21 - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 21 dias.

Eventos Histopatológicos				
		EBOB	MTA	Controle
Infiltrado inflamatório	Polimorfonucleares e mononucleares	26,4	28,5	10,3
Celularidade/Vascularização	Fibroblastos	12,2	13,0	5,3
	Vasos sanguíneos	1,0	1,6	0,5
Atividade macrofágica	Fagócito mononuclear (macrófago)	0,7	1,3	0,4
	Células Gigantes Inflamatórias	0,7	0,8	0,4
	Espessura da cápsula fibrosa	63,0	81,70	56,30
	Índice Geral de Inflamação (IGI)	1	2	0

IGI escore - 0 ausente; 1 discreto; 2 moderado; 3 severo.

- **Análise quantitativa de 42 dias.**

1. **Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados.**

Tabela 22 - Valores encontrados para células polimorfonucleares e mononucleares em 42 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	12,0	14,0	7,0
	2	12,0	14,0	9,0
	3	12,0	11,0	9,0
Média		**12,0**	**13,0**	**8,3**
	1	11,0	11,0	11,0
	2	11,0	15,0	8,0
	3	14,0	14,0	7,0
Média		**12,0**	**13,3**	**8,7**
	1	14,0	17,0	7,0
	2	12,0	17,0	8,0
	3	15,0	15,0	9,0
Média		**13,7**	**16,3**	**8,0**
	1	13,0	15,0	11,0
	2	12,0	14,0	8,0
	3	13,0	14,0	8,0
Média		**12,7**	**14,3**	**9,0**
	1	15,0	17,0	9,0
	2	14,0	18,0	7,0
	3	14,0	14,0	9,0
Média		**14,3**	**16,3**	**8,3**
Média Final		**12,9**	**14,7**	**8,5**

Tabela 23 - Valores encontrados para fibroblastos em 42 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	8,0	9,0	3,0
	2	8,0	9,0	4,0
	3	9,0	9,0	3,0
Média		**8,3**	**9,0**	**3,3**
	1	8,0	7,0	3,0
	2	7,0	9,0	4,0
	3	7,0	8,0	3,0
Média		**7,3**	**8,0**	**3,3**
	1	8,0	7,0	3,0
	2	7,0	9,0	4,0
	3	7,0	9,0	2,0
Média		**7,3**	**8,3**	**3,0**
	1	7,0	7,0	4,0
	2	7,0	8,0	5,0
	3	5,0	10,0	4,0
Média		**6,3**	**8,3**	**4,3**
	1	7,0	6,0	4,0
	2	9,0	7,0	4,0
	3	7,0	7,0	3,0
Média		**7,7**	**6,7**	**3,7**
Média Final		**7,4**	**8,1**	**3,5**

Tabela 24 - Valores encontrados para vasos sanguíneos em 42 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	2,0	0,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**1,3**	**0,0**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**1,0**	**0,3**
	1	1,0	2,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	1,0	1,0
Média		**0,7**	**1,3**	**0,3**
	1	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	1,0	2,0	0,0
Média		**1,0**	**1,3**	**0,3**
	1	1,0	2,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**1,3**	**0,0**
Média Final		**0,7**	**1,3**	**0,2**

Tabela 25 - Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 42 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	1,0	0,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,3**	**0,7**	**0,0**
	1	1,0	1,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,3**	**1,0**	**0,0**
	1	0,0	1,0	1,0
	2	1,0	0,0	0,0
	3	0,0	2,0	0,0
Média		**0,3**	**1,0**	**0,3**
	1	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	1,0
	3	0,0	0,0	0,0
Média		**0,7**	**0,7**	**0,3**
	1	0,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	0,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,3**	**1,0**	**0,0**
Média Final		**0,4**	**0,9**	**0,1**

Tabela 26 - Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 42 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	0,0	1,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0
	3	0,0	0,0	0,0
Média		**0,0**	**0,3**	**0,0**
	1	0,0	1,0	0,0
	2	0,0	1,0	1,0
	3	1,0	0,0	0,0
Média		**0,3**	**0,7**	**0,3**
	1	1,0	0,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	0,0	1,0	0,0
Média		**0,3**	**0,7**	**0,0**
	1	0,0	1,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0
	3	0,0	0,0	0,0
Média		**0,0**	**0,7**	**0,0**
	1	1,0	0,0	0,0
	2	0,0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0	0,0
Média		**0,7**	**0,7**	**0,3**
Média Final		**0,3**	**0,6**	**0,1**

Tabela 27 - Valores encontrados para espessura da cápsula fibrosa (µm) em 42 dias.

Rato	Lâmina	EBOB	MTA	Controle
	1	38,64	49,87	16,72
	2	45,49	51,07	24,09
	3	35,38	41,75	26,88
Média		**39,84**	**47,56**	**22,56**
	1	39,87	39,18	26,81
	2	41,51	48,17	24,83
	3	44,68	44,41	18,20
Média		**42,02**	**43,92**	**23,28**
	1	49,72	65,53	16,62
	2	42,51	66,84	16,85
	3	41,26	80,42	37,63
Média		**44,50**	**70,93**	**23,70**
	1	37,11	76,99	35,98
	2	52,10	70,86	39,33
	3	35,84	58,06	47,11
Média		**41,68**	**68,64**	**40,81**
	1	49,66	51,71	21,53
	2	36,53	58,42	20,12
	3	35,86	57,06	19,35
Média		**40,68**	**55,73**	**20,33**
Média Final		**41,70**	**57,40**	**26,10**

Tabela 28 - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 42 dias.

Eventos Histopatológicos				
		EBOB	MTA	Controle
Infiltrado inflamatório	Polimorfonucleares e mononucleares	12,9	14,7	8,5
Celularidade/Vascularização	Fibroblastos	7,4	8,1	3,5
	Vasos sanguíneos	0,7	1,3	0,2
Atividade macrofágica	Fagócito mononuclear (macrófago)	0,4	0,9	0,1
	Células Gigantes Inflamatórias	0,3	0,6	0,1
	Espessura da cápsula fibrosa	41,70	57,40	26,10
	Índice Geral de Inflamação (IGI)	0	1	0

IGI escore - 0 ausente; 1 discreto; 2 moderado; 3 severo.

9. Anexo

International Endodontic Journal - Account Created in Scholar One Manuscripts

DE: iejeditor@cardiff.ac.uk

PARA: fabianogamero@yahoo.com.br

Sexta-feira, 27 de Janeiro de 2012 17:11
27-Jan-2012

Dear Aguilar

A manuscript titled Staining susceptibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder) in teeth: a 1-year in vitro study (IEJ-12-00050) has been submitted by to the International Endodontic Journal.

Thank you for your choosing to submit your article to the International Endodontic Journal

Kind regards

Sue Bryant
International Endodontic Journal Editorial Office
iejeditor@cardiff.ac.uk