

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSAMENTO DE MATERIAIS E
CATÁLISE

Renata Martins Parreira

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS PRATA E ÓXIDO DE TITÂNIO NAS
PROPRIEDADES DO BIOMATERIAL A BASE DE ALUMINATO DE CÁLCIO**

São José dos Campos
2013

Renata Martins Parreira

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS PRATA E ÓXIDO DE TITÂNIO NAS
PROPRIEDADES DO BIOMATERIAL A BASE DE ALUMINATO DE CÁLCIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional em Processamento de Materiais e Catálise, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de mestre em Processamento de Materiais e Catálise.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Liu Yao Cho

São José dos Campos
2013

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

P273a

Parreira, Renata Martins

Avaliação da influência dos aditivos prata e óxido de titânio nas propriedades do biomaterial a base de aluminato de cálcio / Renata Martins Parreira; Orientadora: Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira. – São José dos Campos, 2013.

66 p., 1 disco laser: Color

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais e Catálise..

Inclui referências

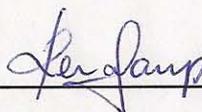
1. Processamento de materiais e catálise. 2. Aluminato de Cálcio. 3. Biocompatibilidade. 4. Materiais biomédicos. I. Oliveira, Ivone Regina de, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Programa de Pós-Graduação Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais e Catálise. III. Título.

CDU: 541.128

Eu, Renata Martins Parreira, autora da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

São José dos Campos, 28 de agosto de 2013



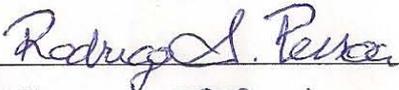
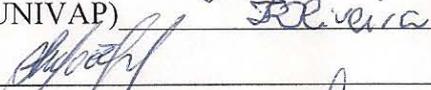
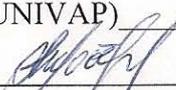
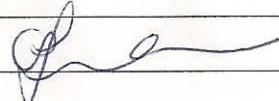
Autor da Obra

Data da defesa: 20 de agosto de 2013.

RENATA MARTINS PARREIRA

“AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS PRATA E ÓXIDO DE TITÂNIO NAS PROPRIEDADES DO BIOMATERIAL A BASE DE ALUMINATO DE CÁLCIO”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processamento de Materiais e Catálise, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais e Catálise, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **RODRIGO SÁVIO PESSOA** (UNIVAP) 
Prof.^a. Dra. **IVONE REGINA DE OLIVEIRA** (UNIVAP) 
Prof. Dr. **LIU YAO CHO** (UNIVAP) 
Prof. Dr. **CYNTHIA REGINA FERRARI GONÇALVES** (USP) 

Prof.^a. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa
Diretor do IP&D – UniVap
São José dos Campos, 20 de agosto de 2013.

Dedicatória

A minha família

Em memória do meu pai Getulio, que estará sempre vivo dentro de mim me dando força, minha querida mãe Albertina que é exemplo de simplicidade e humildade que sempre se esforçou muito por mim, se hoje estou aqui devo a você. Minha Irmã Flavia, meu cunhado João, meu sobrinho Lorenzo que sempre estão ao meu lado me apoiando em todas as minhas escolhas. Ao meu noivo Andre que com seu amor transformou minhas dificuldades em coisas simples.

Amo Vocês

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre presente em minha vida.

A Dra. Ivone Regina de Oliveira pela oportunidade de aprendizado durante esses dois anos, por ser um exemplo de profissional que com sua postura rigorosa me ensinou o verdadeiro significado de uma pesquisa. Muito obrigada pela confiança e apoio. A competência com a qual me orientou contribui muito para o meu amadurecimento profissional. Obrigada.

Ao Professor. Dr. Liu Yao Cho por colaborar com a realização deste trabalho.

Ao departamento de microbiologia da Faculdade de Odontologia - UNESP em especial a Professora. Dra. Luciane e Jonatas Rafael por toda ensinamento e dedicação para realização dos testes.

Ao Professor. Dr. Leandro José Raniero por ter cedido a nano partícula de Ag.

As minhas companheiras de laboratório: Talita e Daniele pela ajuda na realização deste trabalho, por todo carinho, atenção e paciência. Meu muito obrigado, e como fruto deste trabalho estou levando duas amigas maravilhosas.

Aos professores do programa de mestrado profissional em Materiais e Catálise.

Aos meus colegas de turma.

A todos os funcionários da Universidade do Vale do Paraíba, em especial aos funcionários do IP&D.

A Priscila Leite pelos ensaios de MEV.

A Professora. Dr. Andrea Santos Liu pela amizade e apoio, se hoje estou aqui devo a você por ter sido a maior incentivadora.

A Valdevino e Vera, por me acolher em sua casa com todo amor e carinho e apoio fraternal facilitando para que eu pudesse realizar esta conquista. Meu eterno agradecimento.

A Sanara, Livia e Allan pela amizade e carinho que vocês me receberam.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando.

A minha família maravilhosa por estar sempre me guiando e me ajudando pra realização dos meus sonhos ao qual dedico esta minha conquista.

Após a realização deste trabalho pude perceber que muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista meu eterno obrigado a todos.

“As raízes do estudo são amargas, mas seus frutos são doces”

Aristóteles

AValiação DA INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS PRATA E ÓXIDO DE TITÂNIO NAS PROPRIEDADES DO BIOMATERIAL A BASE DE ALUMINATO DE CÁLCIO

RESUMO

Um biomaterial a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) tem sido estudado visando preservar as propriedades positivas e aplicações clínicas dos materiais correntes nas áreas de endodontia e ortopedia, permitindo que suas aplicações possam ser estendidas, superando as desvantagens apresentadas por esses materiais. É reconhecido que o sucesso de um biomaterial depende, além das suas propriedades físico-químicas, da sua capacidade de evitar contaminação durante a fase de manipulação assim como de inibir o crescimento de microrganismos. A infecção por bactérias começa com a adesão seguida da colonização das mesmas. Por isso, é importante inibir a adesão de bactérias na superfície do material por meio da incorporação de aditivos. Além disso, as propriedades de radiopacidade e biocompatibilidade mostram-se imprescindíveis. A radiopacidade permite que o material seja distinguido em radiografias de estruturas anatômicas adjacentes tais como osso e dentes, possibilitando investigar a qualidade do tratamento, bem como o reparo tecidual pós-tratamento. A biocompatibilidade do material pode ser aumentada pela presença de uma fase bioativa a qual promove uma ligação estável com os tecidos vivos. A hidroxiapatita, por ser uma fase bioativa, vem sendo utilizada para o recobrimento de materiais visando melhorar a sua compatibilidade com sistemas biológicos. Neste trabalho, foi avaliada a influência dos aditivos de prata e óxido de titânio na capacidade bactericida, radiopacidade e biocompatibilidade de material a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC). A capacidade bactericida foi avaliada frente a diferentes microrganismos por meio de testes *in vitro* de difusão em Agar. Baixos teores de prata com tamanho médio de partículas de 700 nm proporcionaram efeito bactericida ao cimento de aluminato de cálcio principalmente contra o microrganismo *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, efeito positivo contra *Escherichia coli* apenas foi verificado quando usado prata com menor tamanho de partículas (40 nm). A radiopacidade foi avaliada por meio de medidas de densidade óptica das amostras de CAC puras ou combinadas ao aditivo óxido de zinco. A adição de prata ao cimento de aluminato de cálcio proporcionou aumento da sua radiopacidade. Além disso, a prata quando misturada ao aditivo óxido de zinco com um teor significativamente reduzido proporcionou radiopacidade adequada ao material (superior a 3 mm Al). Por fim, a biocompatibilidade do CAC foi avaliada por meio dos métodos biomimético e eletroquímico. A caracterização da camada depositada foi realizada por meio das técnicas de MEV, EDS e DRX. Tanto na presença de prata quanto de óxido de titânio o material mostrou-se bioativo, independente do teor avaliado, quando tratado com SBF. Por meio do método eletroquímico, fases de fosfato ocorreram principalmente na presença de prata.

Palavras-chave: aluminato de cálcio, capacidade bactericida, radiopacidade, biocompatibilidade.

Evaluation of silver and titanium oxide additives on the properties of a biomaterial based on calcium aluminate

Abstract

A biomaterial based on the calcium aluminate cement was studied in order to preserve the positive properties of the material and clinical applications in endodontics and orthopaedics, as well as allow its application to be extended, overcoming the disadvantages presented by these materials. In addition to its physicochemical properties, the success of a material depends on its ability to prevent contamination during handling and inhibit the growth of microorganisms. The bacterial infection starts with adherence of the bacteria followed by its colonization. Therefore, it is important to inhibit bacterial adherence on the surface of the material by means of additives. In addition, the properties of radiopacity and biocompatibility are shown to be essential. The radiopacity allows the material to be distinguished on radiographs from adjacent anatomical structures such as bone and teeth, which enable the investigation of the quality of treatment, as well as the post-treatment tissue repair. The biocompatibility of the material can be enhanced by the presence of a bioactive phase, which promotes a stable bond with the living tissues. Hydroxyapatite, as a bioactive phase, has been used for coating materials to improve its compatibility with biological systems. This work evaluated the influence of silver and titanium oxide additives on bacterial capacity, radiopacity, and biocompatibility of biomaterial based on calcium aluminate (CAC). The bactericidal capacity was evaluated from different microorganisms by means of in vitro diffusion test in Agar. Low levels of silver with average particles size of 700 nm provided bactericidal effect to the calcium aluminate cement mainly against the *Staphylococcus aureus* microorganism. On the other hand, a positive effect against *Echerichia coli* was proved only when using silver with smaller particles size (40 nm). Radiopacity was evaluated by means of measurements of optical density from CAC, when pure or size oxide was added. Silver added to aluminate calcium cement increased its radiopacity. However, silver mixed with zinc oxide additive with a significantly reduced amount provided the appropriate radiopacity (over 3 nm Al). Finally, the CAC biocompatibility was evaluated by means of biomimetic and electrochemical methods. The characterization of the deposited layer was performed by the MEV, EDS, and DRX techniques. Both in the presence of silver and titanium oxide, the material showed to be bioactive, no matter what amount was evaluated, when treated with SBF. By means of electrochemical method, phosphate phases occurred mainly in the presence of silver.

Key-words: calcium aluminate, bacterial capacity, radiopacity, biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE LE CHATELIER PARA A REAÇÃO DE HIDRATAÇÃO DO CAC.....	25
FIGURA 2 - ESQUEMA UTILIZADO PARA DEPOSIÇÃO DE HA	35
FIGURA 3 - PASTILHAS DE CAC PURAS OU CONTENDO DIFERENTES TEORES DE AG E TIO ₂ (%-P). A) CAC-AG (1%), B) CAC-AG (2%), C) CAC-AG (4%), D) CAC-AG (6%), E) CAC AG 40 NM) F) CAC-TIO ₂ (1%), G) CAC-TIO ₂ (2%), H) CAC-TIO ₂ (4%), I) CAC-TIO ₂ (6%), J) CAC.	38
FIGURA 4 - FOTOS DAS PLACAS DE (A) ÁGAR MUELLER HINTON (HIMEDIA) OU (B) ÁGAR SABOURAUD-DEXTROSE (HIMEDIA), PARA C. ALBICANS; CONTENDO AS PASTILHAS DE CIMENTO SEM AG (S) E COM DIFERENTES TEORES DE PRATA (1, 2, 4 E 6%-P).	39
FIGURA 5 - FOTOS DAS PLACAS DE ÁGAR MUELLER HINTON E PASTILHAS DE TiO ₂ COM DIFERENTES TEORES (1, 2, 4 E 6%-P) NA PRESENÇA DE LUZ NEGRA.	40
FIGURA 6 - EXEMPLO DE RADIOGRAFIA UTILIZADA PARA AS MEDIDAS DE DENSIDADE ÓPTICA. A) CAC-TIO ₂ (1%), C) CAC-TIO ₂ (2%), E) CAC-TIO ₂ (4%), G) CAC-TIO ₂ (6%), B) CAC-AG (1%), D) CAC-AG (2%), F) CAC-AG (4%) E H) CAC-AG (6%).....	41
FIGURA 7 - FOTODENSITÔMETRO UTILIZADO PARA MEDIR AS DENSIDADES ÓPTICAS DAS RADIOGRAFIAS.	41
FIGURA 8 - PASTILHAS DE CAC PURAS OU CONTENDO AG E TIO ₂ (%-P). A) CAC B) CAC-AG C) CAC-TIO ₂	42
FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO DO APARATO USADO NO MÉTODO ELETROQUÍMICO.....	45
FIGURA 10 - FOTOS DAS PLACAS DE CULTURA DE MICRORGANISMOS APÓS CONTATO DE 24 HORAS COM AS PASTILHAS DE CIMENTO SEM AG (S) E COM DIFERENTES TEORES DE PRATA (1, 2, 4 E 6%-P), COM TAMANHO DE PARTÍCULAS DE 700 NM. DESTAQUE PARA OS HALOS DE INIBIÇÃO VERIFICADOS PARA OS MICRORGANISMOS S. AUREUS E P. AERUGINOSA.	48
FIGURA 11 - DENSIDADES ÓPTICAS DA ESCALA DE ALUMÍNIO MEDIDAS A PARTIR DE QUATRO RADIOGRAFIAS.....	49
FIGURA 12 - VALORES MÉDIOS DE RADIOPAVIDADE EXPRESSOS EM RELAÇÃO À ESPESSURA DA ESCADA DE ALUMÍNIO (MM AL) PARA CAC CONTENDO AG 700 NM (1, 2, 4 E 6%-P), AG 40 NM E TIO ₂ (1, 2, 4 E 6%-P) COMPARADO AO ADITIVO ZNO E AO CAC SEM ADITIVO.....	50
FIGURA 13 - VALORES MÉDIOS DE RADIOPAVIDADE EXPRESSOS EM RELAÇÃO À ESPESSURA DA ESCADA DE ALUMÍNIO (MM AL) PARA CAC CONTENDO A MISTURA ZNO+AG 700 NM NOS TEORES DE 1 E 6%-P COMPARADOS AOS MATERIAIS COMERCIAIS MTA (BRANCO E CINZA)...	51
FIGURA 14 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P DE AG OU TIO ₂ SEM TRATAMENTO	52
FIGURA 15 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROS EDS DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P AG	

APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO DURANTE OS TEMPOS DE 1, 3, 7 E 15 DIAS.	53
FIGURA 16 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROS EDS DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P TIO ₂ APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO DURANTE OS TEMPOS DE 1, 3, 7 E 15 DIAS	54
FIGURA 17 - PH EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA ÁGUA E SOLUÇÃO SBF RIGO 1,5; EM CONTATO COM AMOSTRAS ENDURECIDAS DE MTÁ OU CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO CONTENDO 1%-P DE AG E TIO ₂	58
FIGURA 18 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTRO EDS DA SUPERFÍCIE DE MTA APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO SBF PREPARADAS DE ACORDO COM RIGO.....	58
FIGURA 19 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P AG APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO PARA OS TEMPOS DE (A) 1, (B) 3, (C) 7 E (D) 15 DIAS.....	60
FIGURA 20 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P TIO ₂ APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO PARA OS TEMPOS DE (A) 1, (B) 3, (C) 7 E (D) 15 DIAS.....	60
FIGURA 21 - PH EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA SOLUÇÃO SBF RIGO 1,5; EM CONTATO COM AMOSTRAS ENDURECIDAS DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO CONTENDO DIFERENTES TEORES DE AG OU TIO ₂	62
FIGURA 22 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE AG APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO DURANTE 7 DIAS PARA OS TEORES DE (A) 1, (B) 2, (C) 4 E (D) 6%-P.	63
FIGURA 23 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE TIO ₂ APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO DURANTE 7 DIAS PARA OS TEORES DE (A) 1, (B) 2, (C) 4 E (D) 6%-P.	64
FIGURA 24 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DE VARREDURA DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P AG OU TIO ₂ APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA OS TEMPOS DE 5 E 10 MINUTOS	65
FIGURA 25 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE AG APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO DURANTE 5 MINUTOS PARA OS TEORES DE (A) 1, (B) 2, (C) 4 E (D) 6%-P.....	67
FIGURA 26 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE TIO ₂ APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO DURANTE 5 MINUTOS PARA OS TEORES DE (A) 1, (B) 2, (C) 4 E (D) 6%-P.....	68
FIGURA 27 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE TIO ₂ SEM TRATAMENTO NOS TEORES DE (A) 1 E (B) 6%-P.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - APLICAÇÕES CLÍNICAS DAS BIOCERÂMICAS.	19
TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE O TIPO DE MATERIAL DO IMPLANTE E A RESPOSTA DO TECIDO.....	20
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DAS BIOCERÂMICAS.	21
TABELA 4 - TIPOS DE COMPOSTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO.	33
TABELA 5 - FOSFATOS DE CÁLCIO PRESENTE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS..	34
TABELA 6 - PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE MICRORGANISMO CONTENDO 10^5 CÉLULAS/ML OU 10^8 CÉLULAS/ML (P. AERUGINOSA).	39
TABELA 7 - REAGENTES USADOS NA PREPARAÇÃO DE UM LITRO DE SOLUÇÃO DE FLUIDO CORPORAL SIMULADO DE ACORDO COM RIGO...	43
TABELA 8 - VALORES MÉDIOS E DESVIO-PADRÃO (MM) DOS HALOS DE INIBIÇÃO FORMADOS EM PLACA DE CULTURA DE MICRORGANISMOS APÓS CONTATO DE 24 HORAS COM AS AMOSTRAS.	47
TABELA 9: RESULTADOS MÉDIOS DE MICROANÁLISE DE RAIOS X (EDS) PARA AS AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P DE AG OU TIO ₂ POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO DURANTE DIFERENTES TEMPOS.	56
TABELA 10: RESULTADOS MÉDIOS DE MICROANÁLISE DE RAIOS X (EDS) PARA AS AMOSTRAS DE CAC NA PRESENÇA DE DIFERENTES TEORES DE AG OU TIO ₂ PREPARADAS POR MEIO DO MÉTODO BIOMIMÉTICO DURANTE 7 DIAS.	61
TABELA 11: RESULTADOS MÉDIOS DE MICROANÁLISE DE RAIOS X (EDS) PARA AS AMOSTRAS DE CAC PREPARADAS NA PRESENÇA DE 1%-P DE AG OU TIO ₂ POR MEIO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO DURANTE DIFERENTES TEMPOS	66
TABELA 12: RESULTADOS MÉDIOS DE MICROANÁLISE DE RAIOS X (EDS) PARA AS AMOSTRAS DE CAC NA PRESENÇA DE DIFERENTES TEORES DE AG OU TIO ₂ APÓS TRATAMENTO POR MEIO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO DURANTE 5 MINUTOS	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP = Fosfato de cálcio amorfo
Ca/P = Cálcio/fósforo
CLQ = Cerâmicas ligadas quimicamente
CMP = Metafosfato de cálcio
CPP = Pirofosfato de cálcio
CPPD = Pirofosfato de cálcio di-hidratado
DCPA = Mono-hidrogênio fosfato de cálcio
DO = Densidades ópticas
Ea = Energia de ativação
ECAC = Cimento endodôntico a base de cimento de aluminato de cálcio
EDS = Microanálise de raios X
HA = Hidroxiapatita
HCP Fosfato heptacálcico
ISSO = Organização Internacional para Padronização
MCPM = Fosfato monocálcico mono-hidratado
MEV = Microscopia eletrônica de varredura
MTA = Mineral trioxide aggregate
OCP = Fosfato octacálcio
pH = Potencial de hidrogênio
PMMA = Polimetilmetacrilato
SBF = Solução sintética simuladora do fluido corporal
TCP = Fosfato tricálcico
TDA = Teste de difusão em ágar
TDHP = Di-hidrogênio fosfato tetracálcico
TeCP = Fosfato tetracálcico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Biocerâmicas	19
3.2 Cimento de aluminato de cálcio e seu processo de hidratação	22
3.3 Capacidade bactericida.....	25
3.4 Radiopacidade.....	28
3.5 Biocompatibilidade	29
3.5.1 Método biomimético	29
3.5.2 Método eletroquímico.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Avaliação da capacidade bactericida de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂)	37
4.2 Avaliação da radiopacidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂).....	40
4.3 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂) por meio do método biomimético	42
4.4 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂) por meio do método eletroquímico.....	44
4.5 Técnicas de Caracterização	45
4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	45
4.5.2 Difração de Raios-X	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1- Avaliação da capacidade bactericida de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂)	47
5.2- Avaliação da radiopacidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂).....	49
5.3 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂) por meio do método biomimético	52
5.4 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO ₂) por meio do método eletroquímico.....	64
6 CONCLUSÕES.....	69
7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	70
8 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

A aplicação do cimento de aluminato de cálcio (CAC) na área da saúde iniciou-se no campo odontológico, onde em 1987, Hermansson desenvolveu um processo químico com o objetivo de criar um novo restaurador dental mais biocompatível do que a amalgama. No mesmo ano ele fundou a Doxa Certex AB, posteriormente Doxa AB, dando continuidade ao desenvolvimento do cimento aluminoso. A primeira patente foi depositada em 1990 como um material restaurador dental. Durante os anos 90 a Doxa AB finalizou a formulação do material em uma versão comercial do cimento aluminoso chamado de Doxadent[®], recebendo o selo CE no ano de 2000 e introduzido no mercado odontológico em outubro do mesmo ano [1].

O cimento de aluminato de cálcio comercial é composto principalmente pelas fases CA ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$) e CA_2 ($\text{CaO} \cdot 2\text{Al}_2\text{O}_3$) as quais são responsáveis pelo seu processo de endurecimento hidráulico [2]. A dissolução dessas fases em contato com a água promove a liberação dos íons Ca^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e OH^- , o que promove a saturação da solução, seguido pela precipitação de hidratos de aluminato de cálcio ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de alumínio [3].

Um cimento endodôntico a base de cimento de aluminato de cálcio (ECAC) também foi desenvolvido na Universidade Federal de São Carlos [4] visando preservar e ampliar as propriedades positivas e aplicações clínicas do material mais utilizado atualmente como um cimento reparador conhecido por MTA (mineral trioxide aggregate). O ECAC tem mostrado superar as limitações do MTA dentre as quais se destacam a baixa resistência mecânica [4], escurecimento do dente ao longo do tempo, pega lenta e alto custo [5,6].

O aluminato de cálcio também tem sido estudado como um cimento reparador em ortopedia [7]. O material de maior destaque nessas aplicações conhecido por PMMA (polimetilmetacrilato) também apresenta limitações como rápido endurecimento e elevada temperatura decorrente da reação de polimerização, exigindo grande cuidado durante a aplicação [8]. A alta velocidade de reação do polímero também pode ocasionar queda da resistência mecânica do material, associada à má homogeneização durante o preparo, bem como a incorporação de ar. Na fixação de próteses o cimento atua como homogeneizador e atenuador de altas tensões mecânicas, principalmente as de compressão. Falhas deste material

podem ocasionar o deslocamento de próteses conduzindo inevitavelmente a novas cirurgias [8,9].

Algumas características que indicam vantagens da aplicação do CAC nas áreas da endodontia e ortopedia são: a sua coloração branca, o desenvolvimento de pega hidráulica não necessitando de campo seco para sua aplicação, baixa temperatura durante a pega e um tempo de reação que pode ser controlado pela adição de aditivos específicos. Além disso, os estudos envolvendo o desenvolvimento da composição do CAC para endodontia tem resultado em melhor fluidez, melhores condições de trabalhabilidade, maior resistência mecânica e reduzida porosidade, quando comparado ao MTA [4,10]. Entretanto, poucos estudos têm sido encontrados na literatura sobre outras propriedades do material como a sua capacidade bactericida, radiopacidade e biocompatibilidade.

É reconhecido que o sucesso de um material biocompatível depende da sua capacidade de evitar contaminação durante a fase de manipulação assim como de inibir o crescimento de microrganismos. A infecção por bactéria começa com a adesão da bactéria seguido da colonização das mesmas. Por isso, é importante inibir a adesão de bactérias na superfície do material por meio da presença de aditivos. Novos modelos de biomateriais estão surgindo contendo a incorporação de nanopartículas em suas matrizes como prata e óxido de titânio. A prata tem sido descrita como oligodinâmico pela capacidade de exercer um efeito bactericida em concentrações mínimas. O óxido de titânio também tem recebido grande atenção por apresentar propriedades fotocatalíticas para decomposição de materiais orgânicos [11].

A radiopacidade é uma propriedade física chave para todos os biomateriais que permite que o mesmo seja distinguido em radiografias de estruturas anatômicas adjacentes tais como osso e dentes [12,13]. As variações na radiopacidade encontrada nos materiais comerciais esta relacionada ao tipo e quantidade de agente radiopacificador adicionado a cada material, como prata, zinco, estrôncio, silício, titânio, alumínio e bário [14].

Com relação à biocompatibilidade, mesmo com o relativo sucesso de alguns materiais sintéticos como titânio, alumina, zircônia, processos físicos e químicos vem sendo testados visando modificar a superfície desses materiais a fim de possibilitar a deposição de materiais similares ao osso como a hidroxiapatita (HA) e assim favorecer a osseointegração [15].

A HA é um fosfato de cálcio hidratado $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, presente em cerca de 95% da fase mineral de dentes e ossos humanos. O uso da HA em recobrimentos tornou-se comum, pois se trata de uma fase bioativa a qual promove uma ligação estável com os tecidos vivos melhorando a compatibilidade dos materiais sintéticos com sistemas biológicos [16].

Dentre os vários processos físicos e químicos utilizados para obtenção de recobrimento de HA destacam-se os métodos biomimético e eletroquímico, pois recobrem superfícies complexas, em condições ambientes [17].

O método biomimético consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética simuladora do fluido corporal (SBF) cuja composição iônica é semelhante ao plasma sanguíneo, em temperatura de 37°C. Entre as principais vantagens apresentadas por esse método pode-se destacar a possibilidade de controlar a espessura da camada, o tamanho de grão e a diversidade de formas cristalinas, além de permitir o recobrimento de materiais com geometria complexa sejam metálicos ou cerâmicos [18].

O método eletroquímico é semelhante à eletrólise convencional, baseado na redução catódica da água. É um processo não espontâneo onde existe a necessidade da utilização de uma fonte de corrente contínua para poder direcionar o fluxo de elétrons. O material a ser recoberto atua como cátodo e o eletrodo de platina atua como ânodo, sendo ambos colocados em uma solução rica em íons Ca^{2+} e $(PO_4)^{3-}$ [19]. Na região onde está o cátodo (ocorre um aumento local do pH) resultando em precipitações dos íons presentes na solução formando uma camada aderente de fosfatos de cálcio sobre a superfície do material. O pH da solução e a densidade da corrente empregada influenciam na quantidade e na composição da camada de fosfato de cálcio depositada. Neste método é usado um equipamento de baixo custo e mostra-se promissor na deposição de HA quando usado para recobrimento de materiais metálicos.

2 OBJETIVOS

Avaliar a influência dos aditivos prata (Ag) e óxido de titânio (TiO₂) no cimento de aluminato de cálcio (CAC). Este objetivo está vinculado aos objetivos específicos apresentados a seguir:

- Avaliar a capacidade bactericida do material, frente a diferentes microrganismos por meio de testes *in vitro* de difusão em Agar.
- Avaliar a radiopacidade do material quando puros ou combinados ao aditivo óxido de zinco, por meio de medidas de densidade óptica.
- Avaliar a biocompatibilidade do material, comparando-se a eficiência dos métodos biomimético e eletroquímico quanto à deposição de fases de fosfato de cálcio sobre a superfície do material.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocerâmicas

Há séculos pesquisadores vêm dedicando esforços para encontrar materiais com características adequadas para substituição e reconstrução dos tecidos ósseos no corpo humano. Nos últimos anos materiais sintéticos vem sendo utilizados como metais, cerâmicas, polímeros e compósitos [20]. As cerâmicas, em destaque neste estudo, são usadas para reparar ou reconstruir partes do corpo e são denominadas biocerâmicas [21]. Biocerâmicas são usadas geralmente para reparar o sistema esquelético, composto por ossos, juntas e dentes. Materiais cerâmicos comumente usados incluem zircônia, alumina, hidroxiapatita e biovidro [22-24]. A Tabela 1 resume algumas aplicações das biocerâmicas no organismo humano.

Tabela 1 - Aplicações clínicas das biocerâmicas.

Aplicação	Função	Biocerâmica
Ombro, cotovelo, pulso e quadril	Reconstruir juntas inflamadas ou fraturas	Alumina de alta densidade e biovidro como revestimento metálico
Placas de osso e dentes	Reparação de fraturas	Alumina, zircônia, carbono, fosfato de cálcio, porcelana e vidro bioativos
Membros artificiais permanentemente implantados em ossos e dentes	Substituições de extremidades defeituosas	Biovidro, Alumina, fosfato de cálcio
Fusão espinhal	Imobilização vertebral para proteção do fio espinhal	Biovidro
Âncora ortodôntica	Providenciar pilares de sustentação necessária para modificar deformidades	Al ₂ O ₃ revestida com biovidro

Fonte: Adaptado de Thamaraiselvi e Rajeswari [24].

As biocerâmicas apresentam vantagens quanto à utilização na área biomédica, devido a algumas características como estética, biocompatibilidade e resistência

química [25]. Este material vem se destacando devido ao seu elevado módulo de elasticidade, elevada resistência à fratura por compressão, inércia química e resistência ao desgaste [26].

Uma primeira classificação das biocerâmicas diz respeito à resposta interfacial provocada pelas interações biológicas entre o material de implante e o tecido receptor (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação entre o tipo de material do implante e a resposta do tecido.

Material	Tipo de resposta
Material tóxico	O tecido circunvizinho morre
Material não-tóxico e biologicamente inativo (quase inerte)	Um tecido fibroso de espessura variável forma-se ao redor do implante
Material não-tóxico e biologicamente ativo (bioativo)	Uma ligação forma-se na interface
Material não-tóxico e absorvível	É substituído pelo tecido circunvizinho

Um implante tóxico e que prejudica o tecido ao seu redor deve ser evitado. A reação biologicamente inerte, que causa o desenvolvimento de uma cápsula fibrosa é o tipo mais comum de resposta tecido-implante. Esta cápsula é uma resposta protetora que evita o contato do tecido com o implante [21]. A reação bioativa forma uma ligação através da interface entre implante e tecido. Esta ligação evita movimentos entre os dois materiais conectados e imita o tipo de interface formada quando tecidos naturais se auto-reparam. Para esse tipo de ligação ser formada os materiais implantados precisam apresentar algum grau de atividade química.

Inicialmente, a atenção era voltada para o desenvolvimento de materiais cerâmicos que provocassem uma mínima ou nenhuma reação do tecido, características típicas destes materiais em meios agressivos. Mas, o decorrer do tempo e o aumento do conhecimento na área dos materiais cerâmicos geraram proposta conceitualmente oposta: as biocerâmicas devem provocar reações de formação de tecido e, se possível, com a formação de uma ligação íntima entre a cerâmica e os tecidos.

As biocerâmicas podem ainda ser classificadas de acordo com o seu comportamento fisiológico e mecanismo de fixação provocada pela interação biológica do material com o tecido receptor em: não absorvível, reabsorvível ou

bioativa, podendo ser densa ou porosa de acordo com o comportamento fisiológico e o mecanismo de fixação do material no tecido ósseo (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação das biocerâmicas.

Biocerâmica	Interação com os tecidos	Exemplos
Não-absorvível Densa	Não tem interação química nem biológica	Alumina Zircônia Aluminato de cálcio
Não-absorvível Porosa	Crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e Hidroxiapatita porosos
Reabsorvíveis Densa ou Porosa	Material implante é degradado e substituído lentamente pelos tecidos	Fosfato tricálcico; Biovidros
Biotiva Densa ou Porosa	Ocorre uma forte ligação na interface tecido-implante	Biovidros, hidroxiapatita

Fonte: Adaptada de Hench [21].

Nas cerâmicas não absorvíveis e densas ocorre à formação de uma cápsula de tecido fibroso em volta do implante com a espessura variável não acontecendo a formação de ligação química e biológica entre o implante e o tecido. Esse tipo de ligação ocorre por ancoragem mecânica (fixação morfológica), já nas cerâmicas não absorvíveis e porosas ocorre o crescimento do tecido na região de superfície dos poros ou através do implante (fixação biológica).

As cerâmicas reabsorvíveis degradam-se quando implantadas no corpo, sendo esperado que a degradação do material ocorra na mesma velocidade em que o tecido se regenere sendo que grande parte deste material são variações dos fosfatos de cálcio. A cerâmica bioativa por sua vez é usada com o objetivo de provocar uma reação controlada na superfície do implante assim resultando em uma ligação química direta entre este e os tecidos vizinhos [21,27].

A alumina (Al_2O_3) possui como principal vantagem sobre os metais e polímeros, as baixas taxas de desgaste além de ter uma boa resistência a ambientes corrosivos, já a zircônia estabilizada na fase tetragonal é um material qualificado para implantes de sustentação com vantagem em relação à alumina devido as

maiores resistência à fratura e tenacidade. Os biovidros têm a capacidade de formar ligações químicas estáveis com o osso adjacente. A hidroxiapatita também é utilizada na área médica e odontológica como material de revestimento de implantes metálicos ou no preenchimento de cavidades ósseas.

Outros materiais utilizados como biocerâmicas são as chamadas cerâmicas ligadas quimicamente (CLQ) produzidas por reações químicas em baixas temperaturas, geralmente por combinação de um pó e um líquido [28]. Os fosfatos de cálcio, silicatos de cálcio e aluminatos de cálcio são exemplos de CLQ.

O aluminato de cálcio, em destaque neste estudo, apresenta duas características inerentes que o torna mais adequado frente aos outros para aplicações onde carga é requerida como dentes e tratamento de fraturas vertebral. Apresenta um alto consumo de água durante o endurecimento e reações de cura e endurecimento comparativamente rápido. Apresenta alta resistência mecânica, várias vezes superiores ao fosfato de cálcio. Também permite uma larga variação na consistência e formulação de composições para uma grande variedade de aplicações.

3.2 Cimento de aluminato de cálcio e seu processo de hidratação

O aluminato de cálcio, também denominado cimento de aluminato de cálcio (CAC) é um cimento hidráulico o qual forma uma pasta plástica quando misturado com água ou uma solução aquosa, e ao mesmo tempo resiste a esses líquidos. A pasta perde a sua plasticidade com o passar do tempo, sua resistência mecânica aumenta progressivamente, alcançando seu valor máximo depois de um período de tempo que pode ser de horas a dias.

Os cimentos comerciais são constituídos geralmente por três fases principais [2,30]: a fase estequiométrica, CA, que constitui cerca de 40 a 70 % do cimento obtido; a fase CA₂, que é a segunda em proporção (> 25%) e a fase C₁₂A₇, que constitui entre 1 e 10% dos cimentos comerciais [29]. Estas fases apresentam distintas propriedades no que se refere à reatividade em relação à água, já que, em geral, quanto maior a quantidade de CaO, maior a reatividade:

- A fase CA (CaO.Al₂O₃) tem uma temperatura de fusão relativamente alta (1600^oC), mas hidrata-se mais lentamente, quando comparada com a fase

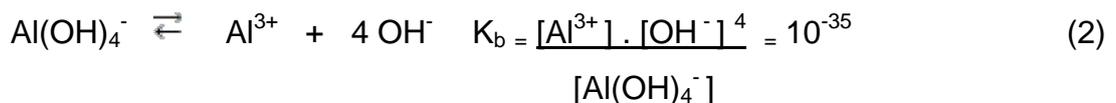
$C_{12}A_7$. Apesar disso apresenta um rápido endurecimento após ter início o processo de pega [30].

- A fase CA_2 ($CaO \cdot 2Al_2O_3$) é mais refratária que a fase CA, mas requer um longo tempo para se hidratar. A presença desta fase pode acelerar o processo de pega da fase CA, entretanto o efeito oposto não é observado [31].
- A fase $C_{12}A_7$ ($12CaO \cdot 7Al_2O_3$) se hidrata rapidamente e, por esse motivo, apesar de possuir uma temperatura de fusão relativamente baixa [30], pode ser utilizada com o intuito de controlar o tempo de pega de cimentos comerciais [30, 32].

Independentemente da proporção entre as fases cristalinas presentes no cimento, o processo de endurecimento (pega) inicia-se com a reação do cimento com a água formando íons cálcio (Ca^{2+}) e tetra-hidroxi aluminato ($Al(OH)_4^-$) em solução.



Os íons $Al(OH)_4^-$ comportam-se como uma base, sendo que, uma pequena parte deles se dissocia em íons Al^{3+} e OH^- . Este fenômeno é o responsável pelo aumento no pH do meio:



Este processo de dissolução ocorre até que a solução atinja um nível de saturação suficiente para promover uma precipitação massiva, seguida do crescimento dos cristais dos compostos conhecidos como hidratos de aluminato de cálcio. Este processo proporciona a formação de uma rede interconectada conferindo resistência mecânica ao corpo cerâmico. A velocidade de hidratação e de precipitação dos hidratos formados é fortemente dependente da composição cristalina do material de partida, bem como da estrutura dos produtos que se formam durante a precipitação. Este último aspecto é influenciado, principalmente, pelo teor de água disponível, pelo tempo de reação, pela temperatura, e pela relação entre as

concentrações dos íons Ca^{2+} e $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ que são geradas em solução durante o processo de dissolução das fases anidras [29,33].

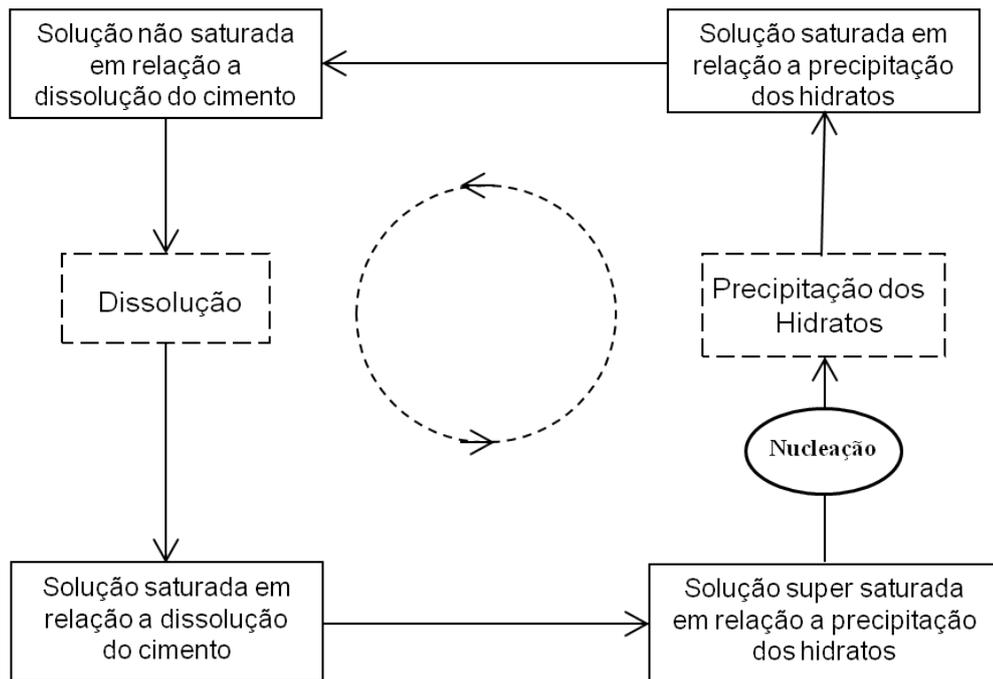
Apesar de favorecida, a precipitação dos hidratos envolve um processo lento de nucleação, durante o qual não ocorre precipitação. Este tempo de espera, necessário para que se atinjam condições ideais para a precipitação dos hidratos é conhecido como “período de indução”. Este estado de equilíbrio metaestável é mantido até que se vença a barreira de energia de ativação (E_a) para a formação dos primeiros núcleos de cristais dos hidratos, sendo que quanto maior E_a mais lenta é a cinética para um determinado processo.

A nucleação é um fenômeno dinâmico que pode ser descrito considerando que os íons Ca^{2+} e $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e as moléculas de água estão em constante movimento, chocando-se uns contra os outros com uma frequência que aumenta com a temperatura e com a concentração destas espécies. Desta forma, ligações entre estas espécies ocorrem aleatoriamente, sendo constantemente formadas e rompidas. Em algum momento um conjunto de espécies pode permanecer unido por um tempo maior que o médio, permitindo assim o aumento de seu tamanho por meio da ligação de outras espécies. Ao se atingir um determinado tamanho crítico verifica-se a formação de um núcleo estável.

A partir da formação dos primeiros núcleos estáveis, a velocidade de precipitação passa a não ser mais limitada por E_a , uma vez que, deste momento em diante, o processo deve ocorrer por meio do crescimento dos núcleos já formados. Desta maneira, estes núcleos crescem rapidamente retirando os íons de Ca^{2+} e $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ de solução, proporcionando a retomada da dissolução das partículas de cimento o que possibilita um contínuo crescimento dos grãos de hidratos e consequente precipitação.

Esse mecanismo pode ser esquematicamente representado através do ciclo de Le Chatelier, mostrado na Figura 1 [29]. Esse ciclo representa a contínua dissolução do cimento anidro e a precipitação dos hidratos formados que prossegue até que todas as partículas do cimento anidro, em contato com a água, sejam consumidas.

Figura 1 - Ciclo de Le Chatelier para a reação de hidratação do CAC



O hidrato CAH_{10} ($CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 10H_2O$) se forma no início da precipitação, sendo o produto majoritário quando a cura é realizada em baixas temperaturas (5-10 °C) e com teor suficiente de água. O hidrato C_2AH_8 ($2CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 8H_2O$) forma-se em temperaturas entre 22 e 35 °C. Já o C_3AH_6 ($3CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 6H_2O$) é o hidrato formado majoritariamente em temperaturas acima de 35 °C ou na presença de teores reduzidos de água [30]. Em relação a solubilidade em água os hidratos apresentam a seguinte ordem $CAH_{10} > C_2AH_8 > C_3AH_6$. Quanto menor a solubilidade do hidrato menor é o tempo de endurecimento do cimento.

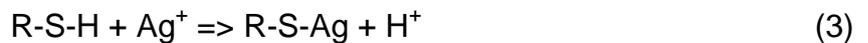
3.3 Capacidade bactericida

A capacidade bactericida é um grande atrativo para implantes médicos, sendo que a questão mais importante relacionada ao implante de dispositivos artificiais é a infecção por bactérias. A infecção por bactéria começa com a adesão da bactéria seguido da colonização das mesmas. Por isso, é importante inibir a adesão de bactérias na superfície do implante, produzindo implantes com funções antibactericidas [33].

Novos modelos de biomateriais estão surgindo contendo a incorporação de nanopartículas em suas matrizes. Recentemente estudos mostraram atividades antimicrobianas de materiais naturais e sintéticos como quitosana [34], nanopartículas de prata (Ag) [35] e nanotubos de carbono [36].

O íon prata atua fortemente para a destruição dos micróbios como as bactérias, fungos e vírus, e num sentido mais amplo, os protozoários e algas marinhas.

A prata tem sido descrita como oligodinâmico pela capacidade de exercer um efeito bactericida em concentrações mínimas [37]. O radical S-Ag afeta fortemente o crescimento bacteriano, mantendo sua ação constante e permanente:



Dentro de uma micro-visão da ação bactericida dos íons prata podem-se notar dois tipos de ações:

- a) Devido à liberação do íon prata na água ou no ar ambiente úmido, ocorre a ação catalítica deste íon destruindo a membrana plasmática das células das bactérias, pela diferença de potencial (eletropotência) entre a parte interna e externa das células;
- b) Outra ação do íon prata, no ambiente úmido (água ou ar), está em penetrar na membrana plasmática da célula bacteriana, destruindo seu citoplasma.

Nanopartículas de prata tem proporcionado ação sobre *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* [38,39] e certos vírus [40]. Como as nanopartículas de prata possuem uma grande área de superfície disponível para a interação bacteriana elas exibem um mais forte efeito antibacteriano comparado aos íons micrométricos [41].

A propriedade bactericida de um material pode ser avaliada *in vitro* por meio do teste de difusão em ágar (TDA), com os materiais colocados sobre a superfície do meio de cultura inoculado com microrganismos, após terem tomado presa. Após 48h são realizadas as medidas de halo de inibição de crescimento microbiano. A presença de halo indica a atividade antimicrobiana do material [42].

Rossato, Kersting e Volkmer estudaram o efeito da adição de prata na propriedade bactericida da hidroxiapatita utilizando o método de difusão em ágar,

demonstrando que a presença da prata aumentou a atividade antibactericida da hidroxiapatita, porém, são necessários maiores tempos de ensaio para verificar os tipos de bactéria contra as quais o material demonstra atividade [43].

Além da prata, o óxido de titânio (TiO_2) tem recebido grande atenção por apresentar propriedades fotocatalíticas para decomposição de materiais orgânicos. A atividade fotocatalítica do TiO_2 é fortemente dependente da estrutura do cristal e do tamanho da partícula [11]. O dióxido de titânio é um semicondutor que se apresenta em três formas alotrópicas, ou seja, rutilo (tetragonal), anatase (tetragonal) e bruquita (ortorrômbica). Segundo Rodriguez et al. o TiO_2 com predomínio na fase anatase é o material mais comumente usado na fotocatalise [44].

Esse material é utilizado para degradar a matéria orgânica. Essa propriedade de degradar a matéria orgânica, confere ao TiO_2 as propriedades autolimpante e bactericida.

A fotoatividade (atividade com a presença de luz natural ou artificial) de semicondutores nanométricos ou nanoestruturados tem sido muito estudada na literatura. Quando a luz é incidida no TiO_2 , este absorve fótons com energia igual ou superior ao “gap ótico”, resultando na promoção de um elétron da banda de valência a banda de condução, o que gera um par elétron-buraco (e^-/h^+) na banda de valência. Os buracos h^+ gerados são poderosos agentes oxidantes, facilitando na geração de radicais HO^\cdot , a partir de moléculas de água adsorvidas na superfície do semicondutor, os quais podem oxidar facilmente o contaminante orgânico [45,46]. Esse processo de fotodegradação de materiais orgânicos pode ser utilizado para esterilizar superfícies como aço inox ou vidro, ou seja, uma vez formado um recobrimento de TiO_2 na superfície desejada, na presença de luz, esta superfície torna-se bactericida [11].

Nogueira e Jardim comprovaram o poder bactericida do TiO_2 na inativação de microrganismos tais como *Lactobacillus acidophilus*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Escherichia Coli* [47].

Matsunaga et al. demonstraram que partículas de TiO_2 irradiadas destruíram bactérias como *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli* e leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*. Comprovaram ainda que a ação fotodestrutiva deste catalisador esta associada à redução dos níveis intracelulares da coenzima-A por foto-oxidação [48].

3.4 Radiopacidade

A radiopacidade é uma propriedade física desejável aos agentes cimentantes e importante propriedade para os materiais dentários, especialmente para os materiais obturadores ou retrobturadores. Os agentes cimentantes são materiais utilizados para cimentação e selamento de restaurações e próteses dentárias [49]. A radiopacidade possibilita a detecção de cáries, defeitos na restauração e gaps interfaciais [50]. A maioria dos materiais usados em endodontia contem agentes radiopacos visando uma melhor observação do preenchimento do canal após um procedimento radiográfico e para checar a evolução do tratamento com o tempo [14]. O material para preenchimento do canal deve apresentar radiopacidade para ser distinguido de estruturas anatômicas adjacentes tais como, osso e dente [12,13].

Beyer-Olsen e Ortavik, apresentaram um método para estabelecer um sistema padrão de mensuração da radiopacidade de vários cimentos endodônticos. As amostras são radiografadas ao lado de um aparato em degraus de alumínio, onde cada degrau apresenta uma espessura conhecida. As imagens obtidas são colocadas em um fotodensitômetro, e a densidade óptica de cada degrau é medida, correlacionando com as densidades dos cimentos, que devem ser medidas simultaneamente [51].

De acordo com o protocolo para radiopacidade de materiais dentários, publicado pela International Standards Organization (ISO 4049), estes materiais devem ser mais radiopacos do que a dentina. Os agentes cimentantes devem possuir radiopacidade igual ou superior à espessura em alumínio, para que se possa diferenciar os materiais da estrutura dental humana e até mesmo de cáries recorrentes, infiltrações marginais e falhas na cimentação [50]. O alumínio é o material de referência para comparação por possuir radiopacidade similar à da dentina [50].

As variações na radiopacidade encontrada nos materiais comerciais esta relacionada ao tipo e quantidade de agente radiopacificador adicionado a cada material, como prata, zinco, estrôncio, silício, titânio, alumínio e bário [12,13,14].

Apesar dos fabricantes dos materiais comerciais normalmente não disponibilizarem a quantidade de cada agente radiopacificador, pode-se inferir que a diferença significativa observada nos valores de radiopacidade entre os materiais, está relacionada ao número atômico de seus componentes. Quanto mais alto o

número atômico do elemento presente na composição do material, mais radiopaco ele se apresentará [13].

Em 1985, McLean e Gasser, incluíram partículas de prata ao pó do ionômero de vidro, desenvolvendo um material radiopaco, o qual facilita o acompanhamento radiográfico do preenchimento da cavidade com o material [52].

Outros aditivos usados na odontologia ou medicina como radiopaco incluem óxido de zinco como um selador de canal e sulfato de bário extensivamente aplicado na medicina [53]. Entretanto, de acordo com Vivan et al., sulfato de bário sozinho não é altamente radiopaco e não fornece radiopacidade adequada ao cimento de silicato de cálcio [14]. Óxidos de zinco e zircônio também são utilizados em materiais dentais para finalidades protéticas e implantes e não apresenta toxicidade [12].

Camilleri e Gandolfi , avaliaram a influência de agentes radiopacificadores (sulfato de bário, óxido de titânio, óxido de zinco, ouro em pó e liga de prata/estanho em pó) para proporcionar uma radiopacidade satisfatória ao cimento à base de silicato de cálcio [53]. A radiopacidade foi avaliada segunda a norma ISO 6876:2001 e diferentes teores (10, 15, 20, 25 e 30%) dos agentes radiopacificadores foram adicionados ao cimento. Os resultados mostraram que a liga de prata/estanho e o ouro em pó apresentaram uma radiopacidade maior que 3 mm Al (recomendado pela ISO 6876:2001) com menor concentração comparado aos demais aditivos [54].

3.5 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade de materiais pode ser aumentada por meio da deposição de fases de fosfato de cálcio sobre a sua superfície utilizando-se os métodos biomimético e eletroquímico.

3.5.1 Método biomimético

O método biomimético foi desenvolvido por Abe e colaboradores em 1990 [55]. Trata-se de uma nucleação heterogênea que permite recobrir substratos metálicos, poliméricos e cerâmicos. O método consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética simuladora do fluido corpóreo (simulated body fluid, SBF) cuja composição iônica é semelhante ao plasma sanguíneo, sendo uma solução

metaestável contendo íons de cálcio e fosfato supersaturados, a fim de reproduzir a formação de apatita em uma temperatura de 37°C [16].

Entre as principais vantagens apresentadas por esse método pode-se destacar a possibilidade de controlar a espessura da camada depositada e a diversidade de formas cristalinas, além de permitir o recobrimento de materiais com geometria complexa [17].

Klopcis e colaboradores mostraram que o método biomimético é eficiente e rápido para deposição de hidroxiapatita (HA) em cerâmicas inertes como amostras densas de alumina e zircônia [18]. A deposição de HA na superfície de um material resulta na formação de uma ligação entre o tecido e o material aumentando a sua biocompatibilidade [15].

A capacidade de um material dissociar íons cálcio que reagem com íons fosfato presente no fluido biológico resultando na formação de hidroxiapatita é definida como bioatividade. A determinação da bioatividade *in vitro* de um material é o primeiro passo na determinação se um material é ou não bioativo *in vivo*, isto é, quando implantado no corpo [56]. Um material bioativo é definido como aquele que promove uma resposta específica na interface do material o que resulta na formação de uma ligação entre o tecido e o material [57]. Estes materiais apresentam a capacidade de criar uma ligação química interfacial com o tecido vivo tão forte ou mais forte do que o osso [56].

O mecanismo geral de como um material específico se liga aos tecidos vivos varia com os materiais bioativos com, entretanto, uma completa similaridade entre todos eles. Uma camada de hidroxiapatita biologicamente ativa é formada na superfície quando o material é introduzido no corpo [56]. Desde que a parte mineral rígida de ossos e dentes consiste de nano cristais de HA, uma camada da mesma substância tem a capacidade de se ligar com ambos o material implantado e o osso.

A hidroxiapatita é o componente mineral dos tecidos duros como osso, dentina e esmalte. Existem várias apatitas sendo as mais comuns entre elas o grupo de fosfatos de cálcio cristalino. A fórmula estequiométrica geral $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ incluem fluorapatitas ($\text{X}=\text{F}$), cloroapatitas ($\text{X}=\text{Cl}$) e hidroxiapatitas ($\text{X}=\text{OH}$) [60]. Talvez a forma mais importante das apatitas de cálcio seja a carboapatita, geralmente referida como uma apatita biológica e é a fase apatita predominante em todos os tecidos duros humanos [59]. Carboapatitas é uma apatita substituída por CO_3 onde o CO_3 pode substituir os grupos OH ou PO_4 . Dependendo de onde os grupos CO_3

estão situados a apatita é classificada como tipo A ou B, resultando em diferentes alterações na estrutura cristalina e propriedades físicas como a solubilidade.

HA é a menos solúvel entre todos os fosfatos de cálcio com exceção da fluorapatita, em pH acima de 4,2. A consequência prática disso é que todos os outros compostos de fosfato de cálcio formados irão eventualmente se converter em HA desde que o pH seja suficientemente alto e a razão de concentração iônica seja adequada e que todos estejam em solução. A maior importância da HA nesta área de bioatividade é devido à equivalência biológica dos constituintes inorgânicos do osso. Uma camada de HA formada sobre o material é reconhecida pelo corpo como dele mesmo e não irá ser recoberto por uma camada fibrosa. A camada de cristais de apatita é então capaz de se ligar ao tecido duro.

Desde que o tecido vivo se liga com o material, nenhum problema ocorre de encapsulamento e o efeito de ancoramento torna-se forte. Isso sugere que o tempo de sobrevivência do implante deve ser prolongado. Muitos dispositivos médicos funcionam puramente com retenção mecânica e isso é considerado a razão para a falha e o encurtamento da duração de vida de muitos implantes. Os problemas aumentam especialmente se uma camada fibrosa é criada entre o implante e o tecido, permitindo micro movimentos da interface fibrosa flexível e causando afrouxamento do implante. Entretanto, se uma forte, não flexível e uniforme ligação química interfacial forem criadas entre o tecido e o implante este problema pode ser evitado em muitos casos. A taxa de falha irá diminuir e a duração de vida esperada irá aumentar.

Como visto, o CAC anidro quando em meio aquoso irá dissociar gerando íons Ca^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e OH^- aumentando o pH ao redor do material. O CAC endurecido em um ambiente úmido e acima 35°C será formado pelos produtos aluminato de cálcio hexahidratado C_3AH_6 e $\text{Al}(\text{OH})_3$:



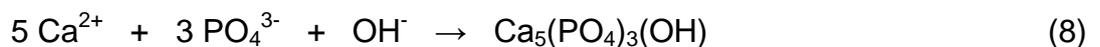
O teor de fosfato em fluidos corpóreos esta presente como componentes em equilíbrio no sistema H_3PO_4 , significando que em pH neutro, o HPO_4^{2-} é o íon dominante. A solubilidade dos íons cálcio esta abaixo 10^{-5} em pH de aproximadamente 8,5 sugerindo que a apatita pode precipitar até mesmo em fluidos onde a concentração de fosfato é muito baixa a medida que ocorra aumento da

concentração de íons cálcio e do pH. Embora SBF seja supersaturado com relação a apatita, precipitação não ocorre sem estímulo químico devido a alta energia necessária para formar núcleos críticos [60].

Dessa forma, quando o CAC hidratado é exposto a solução SBF fornece ambos íons Ca^{2+} solubilizados a partir dos hidratos e aumento do pH, favorecendo a precipitação de hidroxiapatita.



Esta reação pode ser vista como um mecanismo de defesa onde o corpo neutraliza o pH básico por meio da produção de HA. A introdução de CAC hidratado em tal sistema irá então promover a seguinte cadeia de reações:



As reações acima implicam que o CAC hidratado em fluidos corpóreos promove a precipitação de apatita. Pode também ser facilmente sugerido que baseado na solubilidade e pH, aluminato de cálcio hexahidratado (C_3AH_6) podem se converter em $\text{Al}(\text{OH})_3$ e apatita quando em contato com fluido corpóreo de acordo com a reação:



Outra importante reação que ocorre em consideração neste contexto é a precipitação de carbonato de cálcio. CO_2 é parcialmente dissolvido como um gás em fluidos corpóreos, mas está também presente como íons HCO_3^- . Se um maior pH for localmente introduzido por exemplo na superfície do CAC hidratado, íons CO_3^{2-} são produzidos e CaCO_3 pode precipitar.

O conjunto de possíveis reações apresentadas acima sugere que quando CAC é introduzido em um sistema contendo fluidos corpóreos, como saliva e sangue,

uma zona interfacial contendo uma mistura de produtos precipitados será criada muito próxima ao ambiente biológico.

Além da hidroxiapatita, outros fosfatos podem precipitar a partir da solução SBF os quais podem ser classificados através da sua razão entre os elementos cálcio/fósforo (Ca/P) que apresenta em sua fórmula química, podendo variar de 0,5 a 2,0 de acordo com a Tabela 4. A fase de fosfato formada vai depender das condições do meio, tais como: temperatura, pH, concentração de íons e razão molar Ca/P.

Tabela 4 - Tipos de compostos de fosfato de cálcio.

Fosfatos de Cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$	1,5
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCPA)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: Adaptado de LI Panjian et al. [61].

Tais fosfatos de cálcio estão presentes no sistema biológico durante as diferentes etapas do desenvolvimento ósseo, como por exemplo, o fosfato octacálcico [$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$], a monetita (CaHPO_4), a brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de cálcio amorfo, uma substância com composição mal definida, que provavelmente apresenta uma fórmula que se aproxima do fosfato de cálcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] e pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) como apresentado na Tabela 5 [62].

A monetita (CaHPO_4) é uma das fases precursoras da formação de HA. É comumente usada como material substituto ósseo reabsorvível por apresentar boa

biocompatibilidade e bioatividade, entretanto existem algumas limitações no seu uso devido a sua baixa resistência mecânica [63].

Tabela 5 - Fosfatos de cálcio presente em sistemas biológicos.

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ocorrência
Apatita	$(Ca,M)_{10}(PO_4,Y)_6Z_2$	Esmalte, dentina, osso, cálculo dental, rochas, cálculo urinário, calcificações em tecido mole
Fosfato Octacálcico - OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	Cálculo dental e urinário
Brushita, fosfato de cálcio di-hidratado, DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Cálculo dental, condrocalcinose, crystalluria, ossos decompostos
Fosfato tricálcio - TCP	$Ca_3(PO_4)_2$	Cálculo dental e urinário, pedras salivárias, cáries em dentina, cartilagem artrítica, calcificações em tecido mole
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	Pseudo depósitos em fluidos sinoviais

Fonte: Adaptada de Le Geros [63].

3.5.2 Método eletroquímico

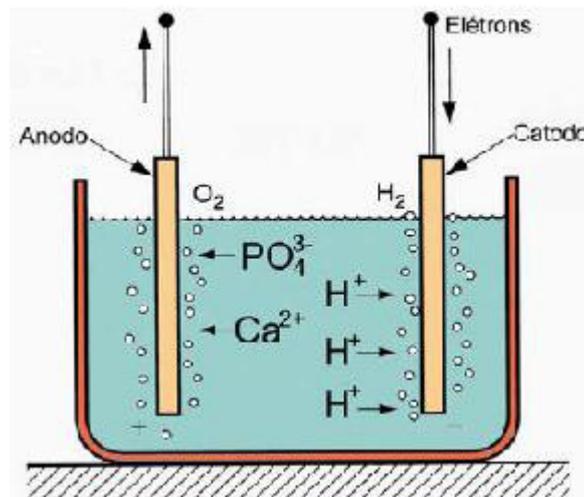
Recobrimentos de materiais por fases de fosfato de cálcio também podem ser obtidos pelo método eletroquímico. O recobrimento de materiais visa melhorar a compatibilidade destes materiais com sistemas biológicos, mas também adequar as suas propriedades mecânicas a do tecido hospedeiro [64]. Por meio do método eletroquímico pode-se obter revestimento de próteses metálicas a serem utilizadas em implantes ósseos, com o objetivo de melhorar a adesão destes implantes ao osso.

O método eletroquímico é semelhante à eletrólise convencional, baseado na redução catódica da água. Por ser um processo não espontâneo, existe a necessidade da utilização de uma fonte de corrente contínua para poder direcionar o fluxo de elétrons.

O material a ser recoberto (substrato) atua como cátodo e o eletrodo de platina atua como ânodo, sendo ambos colocados em uma solução rica em íons Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$, como representado na Figura 2. Na região onde está o cátodo (ocorre um aumento local do pH) resultando em precipitações dos íons presentes na solução formando uma camada aderente de fosfatos de cálcio sobre a superfície do material. A formação de bolhas de hidrogênio ao redor do anodo faz com que aumente a porosidade da camada depositada [65]. O pH da solução e a densidade da corrente empregada influenciam na quantidade e na composição da camada de fosfato de cálcio depositada.

No processo de deposição de HA, por essa não ser condutora ocorre um aumento de resistência do sistema acarretando um limite de espessura do material a ser depositado. Durante o processo de deposição ocorre o consumo de energia para que se formem os núcleos de crescimento dos cristais do material a ser depositado. Após iniciado o processo de recobrimento do catodo, a corrente diminui gradualmente [66].

Figura 2 - Esquema utilizado para deposição de HA



Fonte: Melo [19].

No método eletroquímico é usado um Potenciostato/Galvanotasto (equipamento de baixo custo), que pode ser usado para revestimento de superfícies irregulares. Tem sido empregado principalmente para o recobrimento de substratos

metálicos uma vez que para que ocorra a eletrodeposição é necessário que o substrato seja condutor.

Dentre os substratos metálicos, o titânio vem se destacando para aplicações in vivo sendo utilizado tanto para aplicação de implantes ortopédicos como dentários [67]. Modificações da superfície desses implantes metálicos podem contribuir para melhoria da sua biocompatibilidade, por meio do recobrimento com uma camada de cerâmicas bioativa de fosfatos de cálcio. MacDonald et al e Yang et al, estudaram o tratamento da superfície do titânio obtendo-se um filme poroso de apatita [68,69]. Park et al, estudaram o recobrimento de fosfatos de cálcio na superfície de titânio pelo método eletrolítico utilizando-se uma solução eletrolítica que simula o fluido corporal (SBF) [70]. A temperatura de deposição utilizada foi de 60 °C durante uma hora com potencial catódico de 1,5, 2 e 2,5 V. Posteriormente os substratos foram mantidos durante cinco dias em contato com SBF em 36,5 °C para serem convertidos em apatitas. Quando utilizado potencial catódico de 1,5 V foram obtidos cristais de apatitas densos. Com potencial de 2 V a camada depositada mostrou-se bem similar a apatita presente nos ossos. Já em potencial catódico de 2,5 V o recobrimento constituiu-se de apatitas com menor cristalinidade com razão Ca/P maior que 1,67.

O método eletroquímico também pode ser aplicado a substratos cerâmicos como CAC. No entanto, há a necessidade da adição de um material condutor por apresentar baixa condutividade elétrica.

Neste trabalho os aditivos incorporados ao CAC foram prata e óxido de titânio. A prata se destaca pela alta condutividade e biocompatibilidade mas apresenta alto custo, cerca de R\$ 5.000,00/Kg. O óxido de titânio é quimicamente e biologicamente inerte, apresenta baixa condutividade mas por outro lado, apresenta um menor custo (R\$ 280,00/Kg). Ambos se destacam na literatura como materiais não tóxicos e que apresentam propriedades bactericida e de radiopacidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

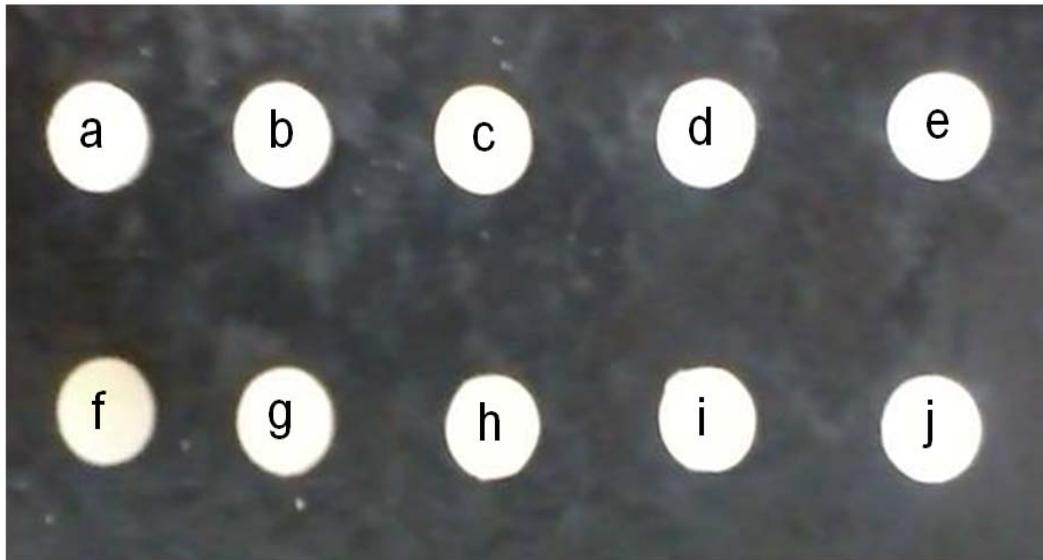
O material usado neste trabalho foi o cimento de aluminato de cálcio (CAC) comercial (Kerneos) contendo os seguintes aditivos: (i) dispersante poliglicol (Bayer, 0,6%-p), (ii) plastificante (Labsynth, 2,8%-p) e (iii) pós-metálicos (prata e óxido de titânio na forma anatase, MH Nano) com teores de 1, 2, 4 e 6%-p.

Após a homogeneização das diferentes composições usando moinho de bolas durante 1 hora, amostras foram preparadas em duplicada a partir das diferentes composições e avaliadas quanto à capacidade bactericida, radiopacidade e biocompatibilidade por meio dos métodos biomimético e eletroquímico.

4.1 Avaliação da capacidade bactericida de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO₂)

Para avaliação quanto a capacidade bactericida foram usadas amostras (10 mm de diâmetro por 2 mm de espessura) preparadas a partir de suspensões de CAC contendo 82%-p de sólidos como apresentada na Figura 3. Pastilhas de CAC foram preparadas quando puras ou contendo diferentes teores de Ag e TiO₂ (1, 2, 4 e 6%-p). A prata avaliada apresentou tamanhos médios de partículas da ordem de 700 nm e teve a sua atuação comparada a prata contendo partículas da ordem de 40 nm. Imediatamente após a moldagem, as amostras foram desmoldadas e esterilizadas utilizando uma câmara de fluxo (BioFlux II) com radiação ultravioleta durante 20 minutos antes de serem colocadas em contato com os microrganismos.

Figura 3 - Pastilhas de CAC puras ou contendo diferentes teores de Ag e TiO₂ (%-p). a) CAC-Ag (1%), b) CAC-Ag (2%), c) CAC-Ag (4%), d) CAC-Ag (6%), e) CAC Ag 40 nm f) CAC-TiO₂ (1%), g) CAC-TiO₂ (2%), h) CAC-TiO₂ (4%), i) CAC-TiO₂ (6%), j) CAC.



As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI - Himedia, Mumbai, Índia) e *C. albicans* em Sabouraud-dextrose (Himedia), por 24 h a 37°C, com condições de microaerofilia (5% de CO₂) para *S. mutans*. Após incubação, o inóculo foi padronizado em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e sua turbidez ajustada em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil), para densidade óptica (DO) adequada a cada microrganismo (Tabela 6), com desvio-padrão de 0,020, para obtenção de suspensão com 10⁶ células/ml. Para *P. aeruginosa* obteve-se uma suspensão de 10⁸ células/ml, seguindo de duas diluições decimais para obtenção de uma concentração final de 10⁶ células/ml. Em seguida, uma alíquota de 100µl da suspensão padronizada de cada microrganismo foi semeada em ágar Mueller Hinton (Himedia) ou ágar Sabouraud-dextrose (Himedia), para *C. albicans*. Após 5 minutos, foram aplicadas sobre o inóculo as diferentes amostras, como apresentado na Figura 4. A preparação das pastilhas de TiO₂ ocorreu na presença de luz negra devido ao aditivo apresentar fotoatividade (atividade com a presença de luz natural ou artificial), como apresentado na Figura 5. Imediatamente após, as placas foram levadas para incubação a 37°C por 24 h, com 5% de CO₂ para *S. mutans*. O experimento foi realizado em triplicata. Por fim, o diâmetro total (mm) dos halos de inibição de crescimento foi mensurado.

Tabela 6 - Preparação das suspensões de microrganismo contendo 10^6 células/ml ou 10^8 células/ml (*P. aeruginosa*).

Microrganismo	Procedência	Turbidez da cultura em caldo	
		Densidade óptica	λ (nm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	0,374	490
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	0,090	630
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	0,324	590
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804	0,284	530
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 35688	0,620	398
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 4083	0,298	760

Figura 4 - Fotos das placas de (a) ágar Mueller Hinton (Himedia) ou (b) ágar Sabouraud-dextrose (Himedia), para *C. albicans*; contendo as pastilhas de cimento sem Ag (S) e com diferentes teores de prata (1, 2, 4 e 6%-p).

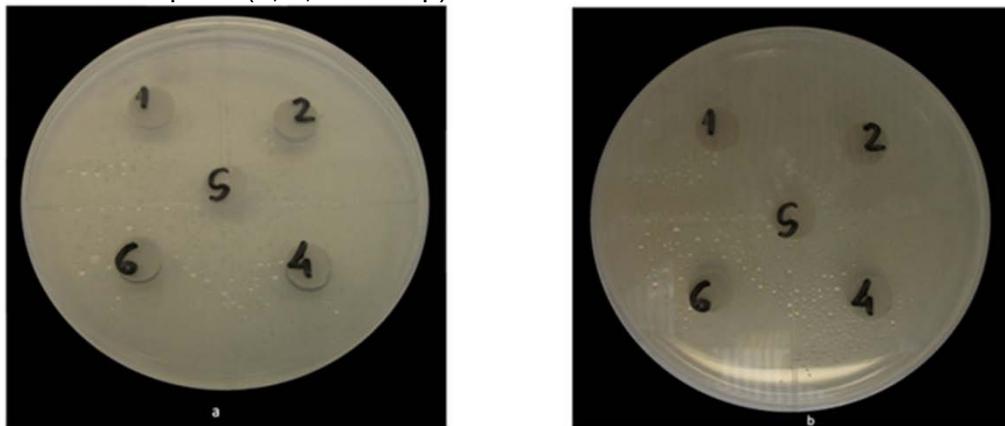


Figura 5 - Fotos das placas de ágar Mueller Hinton e pastilhas de TiO_2 com diferentes teores (1, 2, 4 e 6%-p) na presença de luz negra.



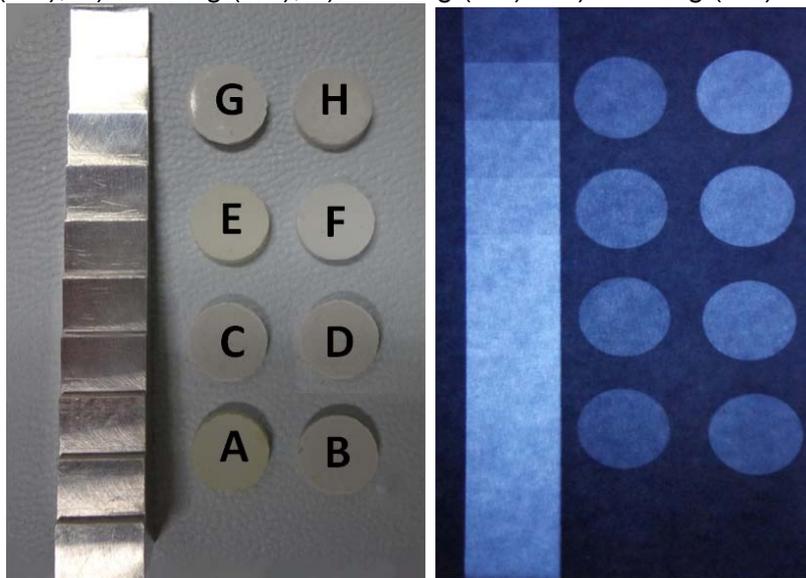
Fonte: Acervo do autor

4.2 Avaliação da radiopacidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO_2)

Para avaliação quanto a radiopacidade também foram usadas amostras (10 mm de diâmetro por 2 mm de espessura) preparadas a partir de suspensões de CAC contendo 82%-p de sólidos como apresentado na Figura 3. Pastilhas de CAC foram preparadas contendo diferentes teores de Ag e TiO_2 (1, 2, 4 e 6%-p). A prata avaliada apresentou tamanhos médios de partículas da ordem de 700 nm e teve a sua atuação comparada a prata contendo partículas da ordem de 40 nm. O CAC contendo o aditivo radiopaco ZnO bem como os materiais comerciais (MTA branco e cinza) foram usados como controle. Após a moldagem, as amostras foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas em ambiente saturado. Após este tempo, as amostras foram desmoldadas e mantidas a 37°C durante um dia sendo, em seguida, colocadas sobre um filme oclusal grupo E (Kodak; Insight). Ainda sobre esse mesmo filme, colocou-se uma escada de alumínio 99 % (liga 1100), cuja espessura varia de 1 a 10 mm, aumentando em incrementos uniformes de 1 mm por degrau com o objetivo de permitir a comparação entre os degraus da escada e as respectivas amostras. Para analisar a radiopacidade das amostras utilizou-se o aparelho de Raios X (Procion, ION 70X) que foi regulado para emitir radiação com 70 KVp e 8 mA. À distância foco-objeto, que o separa das amostras a serem radiografadas, foi de 20 cm, sendo o tempo de exposição de 0,25 segundos. Depois de radiografados,

os filmes foram revelados em uma sala escura seguindo recomendações do fabricante. Com a obtenção das radiografias (Figura 6) procedeu-se então a leitura das densidades ópticas (D.O) das amostras e de cada degrau da escada de alumínio, com a ajuda de um fotodensitômetro (MRA; Indústria de Equipamentos Eletrônicos Ltda) apresentado na Figura 7.

Figura 6 - Exemplo de radiografia utilizada para as medidas de densidade óptica. A) CAC-TiO₂ (1%), C) CAC-TiO₂ (2%), E) CAC-TiO₂ (4%), G) CAC-TiO₂ (6%), B) CAC-Ag (1%), D) CAC-Ag (2%), F) CAC-Ag (4%) e H) CAC-Ag (6%).



Fonte: Acervo do autor

Figura 7 - Fotodensitômetro utilizado para medir as densidades ópticas das radiografias.

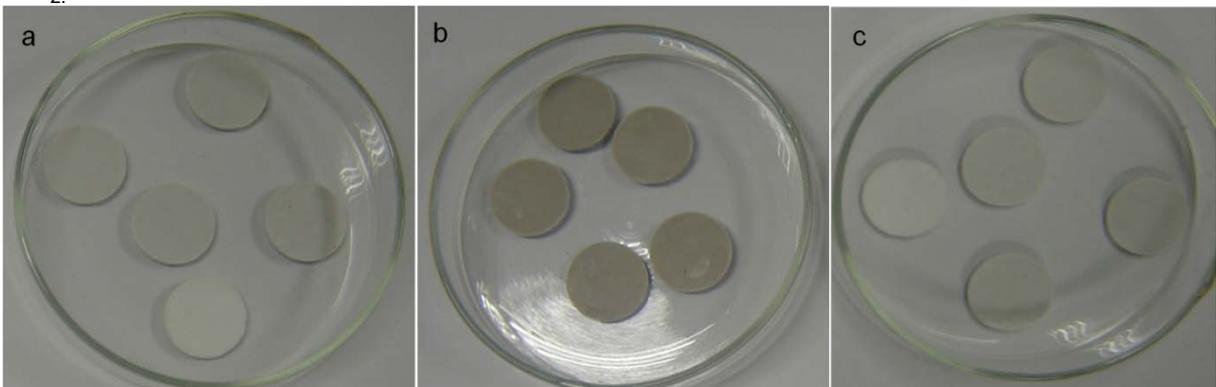


Fonte: Acervo do autor

4.3 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO₂) por meio do método biomimético

Para avaliação quanto a biocompatibilidade do CAC por meio do método biomimético foram usadas amostras (20 mm de diâmetro por 4 mm de espessura) preparadas a partir de suspensões de CAC contendo 77%-p de sólidos. Pastilhas de CAC foram preparadas contendo diferentes teores de Ag e TiO₂ como apresentado na Figura 8. Após a moldagem, as amostras foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas em ambiente saturado. Após este tempo, as amostras foram desmoldadas e mantidas a 37°C em ambiente saturado durante sete dias. Após esse período, algumas amostras foram usadas para avaliação quanto ao pH enquanto outras foram esterilizadas utilizando uma câmara de fluxo (BioFlux II) com radiação ultravioleta durante 10 horas e usadas para avaliação quanto a biocompatibilidade (bioatividade).

Figura 8 - Pastilhas de CAC puras ou contendo Ag e TiO₂ (%-p). a) CAC b) CAC-Ag c) CAC-TiO₂.



Fonte: Acervo do autor

Os ensaios consistiram em medidas de pH em 50 ml água ou de solução simuladora de fluido corporal (SBF) em contato com as amostras de CAC+aditivos, em função do tempo usando um equipamento medidor de pH com sensor de temperatura individual (MA 522/E, Marconi).

A preparação da solução SBF seguiu procedimento descrito na literatura por Rigo, como apresentado na Tabela 7 [71]. A solução foi preparada utilizando-se uma quantidade dos reagentes em uma proporção 1,5 vezes superior (SBF 1,5) a concentração de íons (mM) inorgânicos presentes no plasma humano a fim de acelerar a formação de apatita.

Tabela 7 - Reagentes usados na preparação de um litro de solução de fluido corporal simulado de acordo com Rigo.

Reagente	SBF 1,5 Rigo
Água	400 mL
NaCl	11,992 g
NaHCO ₃	0,529 g
KCl	0,335 g
K ₂ HPO ₄	0,261 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,458 g
HCl 0.1M	15 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,551 g
Na ₂ SO ₄	0,107 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ 0.05M	Teor necessário para ajuste pH= 7,25
HCl 0.1M	Teor necessário para ajuste pH= 7,25

Os ensaios de biocompatibilidade (bioatividade) foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa as amostras contendo 1%-p de aditivo foram colocadas em contato com a solução de fluido corporal simulado mantendo-se uma razão área superficial/volume de $0,1 \text{ cm}^{-1}$, durante diferentes períodos (1, 3, 7 e 15 dias) sob agitação a 37°C usando um shaker MA420 (Marconi). Na segunda etapa as amostras contendo diferentes teores de aditivo (1, 2, 4 e 6%-p) foram colocadas em contato com a solução de fluido corporal simulado durante 7 dias. Após cada período, as amostras foram levemente lavadas com água para remover a solução e posteriormente secas à temperatura ambiente.

As superfícies das amostras antes e após tratamento por meio do método biomimético foram caracterizadas usando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV, EVO MA10 Zeiss) e microanálise de raios X (EDS) a fim de avaliar a interação do material com a solução SBF. Para a obtenção das imagens as

amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro. As amostras também foram analisadas por difração de raios X em um difratômetro, modelo XRD-6000 da Shimadzu e radiação Cu-K α ($\lambda = 1,54439 \text{ \AA}$) para a identificação das fases formadas. As análises foram realizadas para 2θ variando de 10 a 70° com passo de $0,01^\circ$ com duração de 5 horas.

4.4 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO₂) por meio do método eletroquímico

Para avaliação quanto a biocompatibilidade por meio do método eletroquímico também foram usadas amostras (20 mm de diâmetro por 4 mm de espessura) preparadas a partir de suspensões de CAC contendo 77%-p de sólidos. Pastilhas de CAC foram preparadas contendo diferentes teores de Ag e TiO₂. Após a moldagem, as amostras foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas em ambiente saturado. Após este tempo, as amostras foram desmoldadas e mantidas a 37°C em ambiente saturado durante sete dias e posteriormente secas a temperatura ambiente.

No método eletroquímico de corrente controlada foi usada uma célula eletrolítica composta por um eletrodo de trabalho que atua como catodo (amostra), um eletrodo auxiliar como ânodo (fio de platina) e uma fonte de tensão e corrente (modelo FR-303), como apresentado na Figura 9. A célula eletrolítica foi imersa em uma solução eletrolítica utilizada para deposição de filmes de apatita a qual foi preparada dissolvendo-se 3,1g Ca(H₂PO₄)₂.H₂O e 14,00g de NaNO₃ em 100 mL de água destilada. As condições experimentais usadas para Ag (1%-p) foram corrente de 95 e 150 mA/cm². Já para TiO₂ (1%-p) foram 82 e 130 mA/cm² durante 5 e 10 minutos, respectivamente. A temperatura foi mantida constante em 50°C . Os aditivos Ag e TiO₂ também foram testados nos teores de 2, 4 e 6%-p para as seguintes condições: corrente de 150 mA/cm² e tempo de 5 minutos.

Figura 9 - Ilustração do aparato usado no método eletroquímico.



Fonte: Acervo do autor

As superfícies das amostras antes e após tratamento por meio do método eletroquímico também foram caracterizadas usando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, microanálise de raios X e difração de raios X, como descrito anteriormente.

4.5 Técnicas de Caracterização

4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Aspectos microestruturais das amostras sem e com o recobrimento foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio de marca Zeiss modelo EVO-MA40, com espectroscopia de energia dispersiva (EDS), onde as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro.

4.5.2 Difração de Raios-X

Análises das fases mineralógicas das amostras antes e após tratamento foram realizadas através da difração de raios-X, com um difratômetro Shimadzu, modelo XRD 6000, equipado com um monocromador de grafite e um anodo rotativo

de cobre, operando a 40 KV e 40ma. A análise foi realizada em uma faixa de θ de 10 a 70°, com passo de 0,01° por 5 horas. As análises foram feitas com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,54439 \text{ \AA}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Avaliação da capacidade bactericida de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO₂)

Os resultados das medidas de halo de inibição de crescimento bacteriano para amostras de CAC contendo diferentes teores de Ag com tamanho de partículas de 700 nm são apresentados na Tabela 8 e Figura 10. O material proporcionou efeito bactericida somente para os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com os menores teores testados (1 e 2 %-p).

Por outro lado, nenhum halo de inibição foi verificado para amostras de CAC contendo diferentes teores de TiO₂. Diante do resultado positivo dos íons prata, experimentos em Agar foram repetidos usando prata com tamanho de partículas de 40 nm usando uma solução de prata 10⁻⁶ M. Os resultados das medidas de halo de inibição de crescimento bacteriano são apresentados na Tabela 8. O material proporcionou efeito bactericida para os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 8 - Valores médios e desvio-padrão (mm) dos halos de inibição formados em placa de cultura de microrganismos após contato de 24 horas com as amostras.

Microrganismos	1%-p Ag (700nm)	Ag (40nm)	2%-p Ag (700nm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,33 ± 1,15	13,00 ± 0,02	13,33 ± 1,53
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,33 ± 5,77	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	11,26 ± 0,66	-

Figura 10 - Fotos das placas de cultura de microrganismos após contato de 24 horas com as pastilhas de cimento sem Ag (S) e com diferentes teores de prata (1, 2, 4 e 6%-p), com tamanho de partículas de 700 nm. Destaque para os halos de inibição verificados para os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*.



Fonte: Acervo do autor

Nanopartículas de prata penetram no interior celular causando danos pela interação com átomos de enxofre e fósforo presente em ligantes de proteínas e no DNA [35]. A atividade bactericida da prata tem se mostrado inversamente proporcional ao seu tamanho, sendo mais efetiva para partículas menores que 100 nm. Kishen et al, explica esse fato tanto pela maior área de superfície como pela carga elétrica que as partículas apresentam o que favorece a ligação com a parede celular das bactérias [72]. De acordo com Sondi *et al*, nanopartículas de prata menores que 100 nm possuem atividade antimicrobiana contra *E. coli* [73]. Neste trabalho, também foi verificado efeito positivo contra *E. coli* apenas quando usado prata de 40 nm, não sendo observado para a prata 700 nm.

Kim *et al*, também avaliou o efeito da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata contra *S. aureus*. Placas de ágar Muller Hinton contendo nanopartículas de prata com várias concentrações foram testadas. *S. aureus* também foram inibidas com uma concentração baixa de nanopartículas de prata, e que os efeitos inibitórios sobre o crescimento desse microrganismo foram leves [74].

Staphylococcus aureus é uma das espécies de *Staphylococcus* mais frequentemente encontradas na boca. Estes organismos são patogênicos oportunistas, e podem causar infecções nos seres humanos. Uma doença em outra

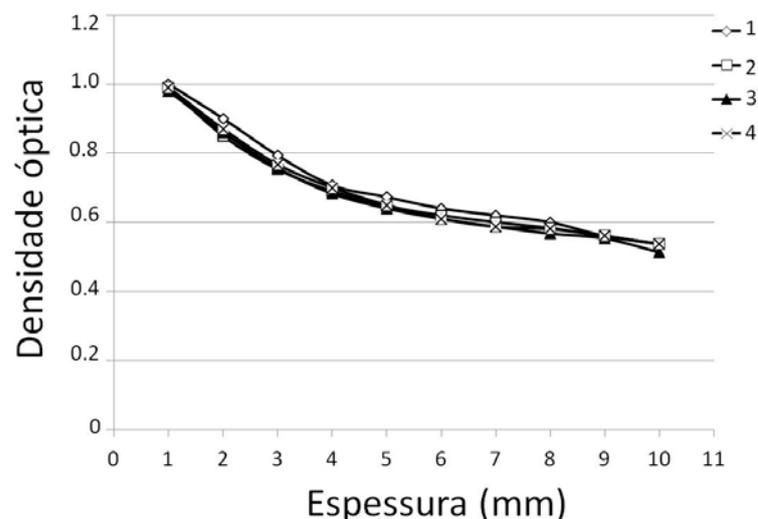
parte do corpo pode provocar uma redução da função imune, resultando numa infecção secundária de *Staphylococcus*.

Enquanto a maioria dos *E. coli* em forma de bastonete no organismo está localizada no intestino, uma pequena quantidade da bactéria está presente na boca. Tais bactérias que se encontram normalmente na boca transformam os restos de alguns alimentos em ácidos (lático, acético, butírico, propiônico) formados por um processo de fermentação, que atacam os tecidos mineralizados do dente.

5.2- Avaliação da radiopacidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO₂)

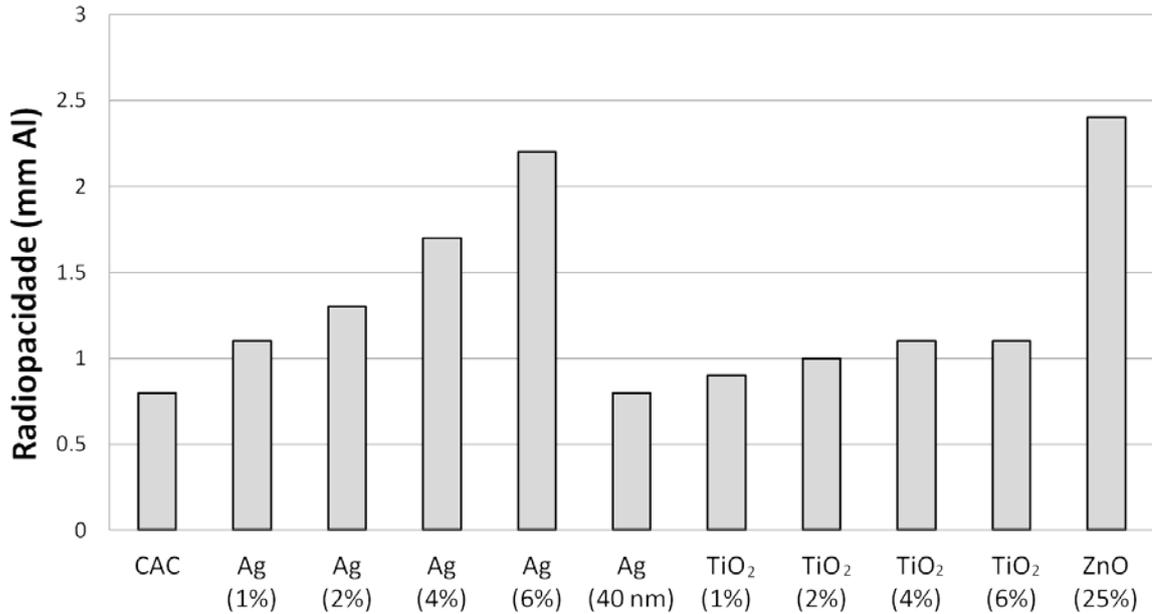
Os valores de densidades ópticas (DO) obtidos para cada degrau da escada de alumínio correspondentes aos ensaios realizados com diferentes radiografias são apresentados na Figura 11. As leituras apresentaram um comportamento muito similar indicando que o método possibilita resultados suficientemente reprodutíveis. Também pode ser observado decréscimo na DO com o aumento da espessura da escada de alumínio uma vez que a imagem torna-se progressivamente mais radiopaca.

Figura 11 - Densidades ópticas da escala de alumínio medidas a partir de quatro radiografias.



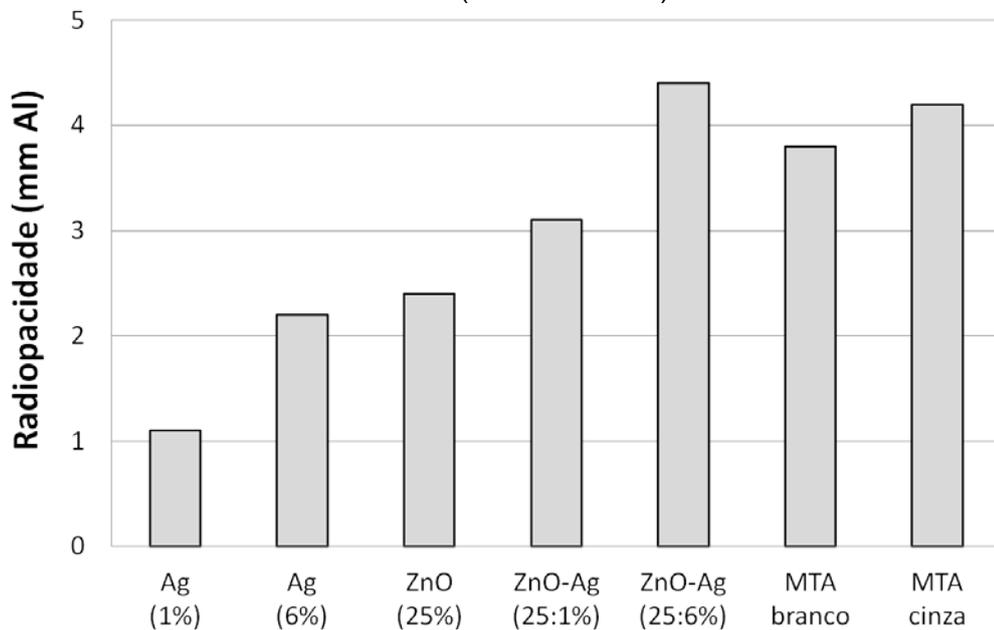
Os valores de DO obtidos para amostras de CAC contendo Ag e TiO₂ foram convertidos em valores de radiopacidade (expresso em mm de Al) usando as curvas de calibração apresentadas na Figura 11 e são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Valores médios de radiopacidade expressos em relação à espessura da escada de alumínio (mm Al) para CAC contendo Ag 700 nm (1, 2, 4 e 6%-p), Ag 40 nm e TiO₂ (1, 2, 4 e 6%-p) comparado ao aditivo ZnO e ao CAC sem aditivo.



Por meio dos resultados apresentados observa-se que o aditivo que proporcionou maior valor de radiopacidade (menor valor de densidade óptica) foi Ag (700 nm) com teor de 6%-p cujo valor foi próximo ao aditivo ZnO que vem sendo estudado como radiopaco [12,53]. Entretanto, estes estudos mostram que a adição de ZnO (25%-p) ao CAC não tem proporcionado radiopacidade adequado ao material, ficando abaixo dos valores obtidos em materiais usados comercialmente como MTA (branco ou cinza). Dessa forma, os materiais ZnO e Ag (700 nm) foram também avaliados quando misturados a fim de otimizar a radiopacidade do material. De fato, a mistura ZnO+Ag 700 nm (6%-p) proporcionou aumento da radiopacidade do CAC quando comparado a adição dos aditivos isoladamente, como apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Valores médios de radiopacidade expressos em relação à espessura da escada de alumínio (mm Al) para CAC contendo a mistura ZnO+Ag 700 nm nos teores de 1 e 6%-p comparados aos materiais comerciais MTA (branco e cinza).



Na presença da mistura de aditivos (ZnO+Ag) o CAC apresentou radiopacidade superior a apresentada pelos materiais comerciais, MTA branco e cinza. Segundo a literatura, o MTA apresenta uma excelente radiopacidade permitindo que o material seja distinguido das estruturas anatômicas adjacentes como a dentina [75].

As características de radiopacidade são particularmente interessantes em Endodontia, pois a radiografia tradicional ou as imagens digitalizadas são os únicos métodos disponíveis para investigar a qualidade do tratamento de canal ou a qualidade dos retroobturadores, bem como o reparo tecidual pós-tratamento [75]. Vários estudos têm obtido a radiopacidade para diferentes materiais testados em mm Al usando a curva de calibração (densidade óptica x espessura da escada de alumínio) [12, 14]. A norma ISO 6876:2001 estabelece o valor mínimo (3 mm Al) de radiopacidade para materiais seladores de canal [54]. A mistura (ZnO+Ag 6%-p) apresentou resultado significativamente maior. Entretanto, radiopacidade adequada já é obtida pela mistura de ZnO com 1%-p de Ag.

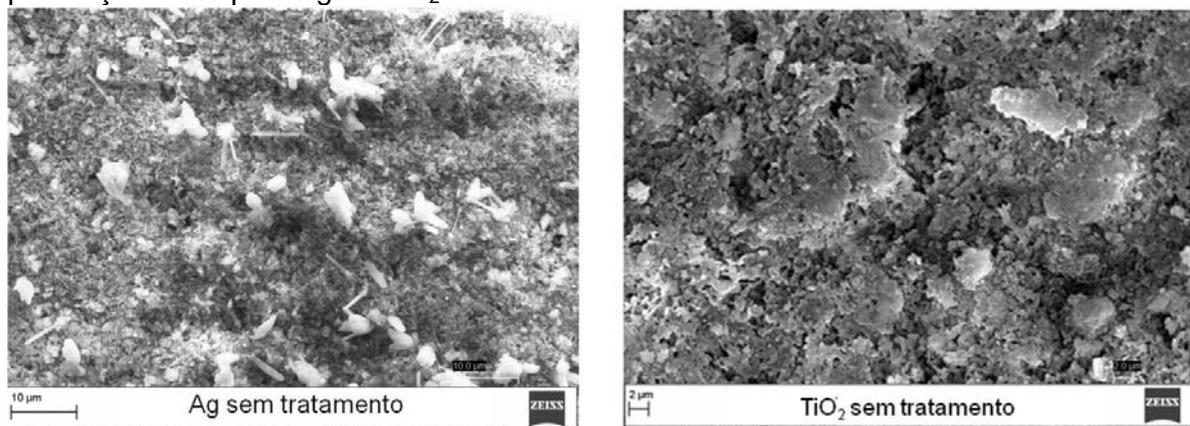
Cabe ressaltar, que a diferença significativa observada nos valores de radiopacidade entre os aditivos, está relacionada ao seu número atômico. Quanto mais alto o número atômico do elemento presente na composição do material, mais

radiopaco ele se apresenta [14]. Entre os aditivos testados, a prata apresenta o maior número atômico ($Z=47$) comparado ao titânio ($Z=22$) e zinco ($Z=30$) e apresentou um efeito significativo quando misturado ao ZnO num teor muito menor. O uso de baixa concentração de prata poderia assim, otimizar o efeito radiopaco do ZnO sem prejudicar o efeito bactericida da prata que é verificado em baixas concentrações.

5.3 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO_2) por meio do método biomimético

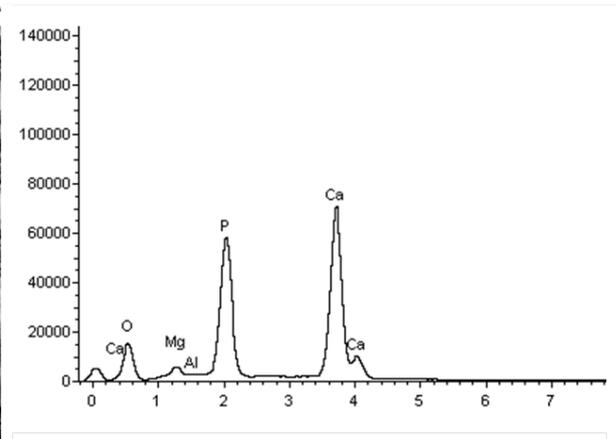
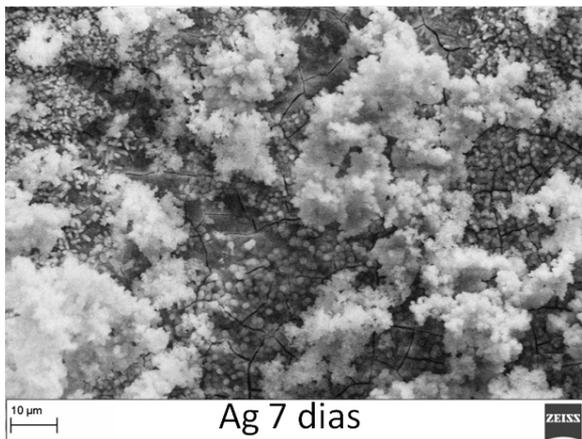
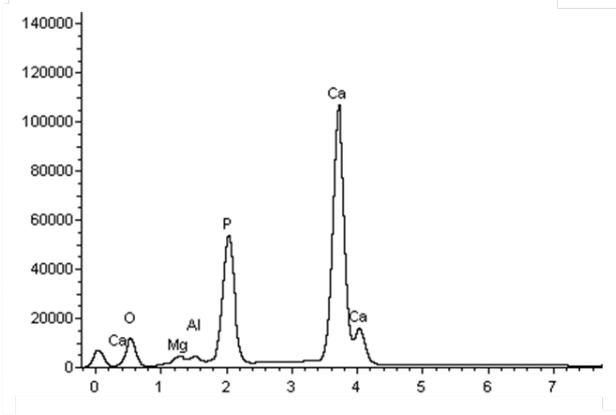
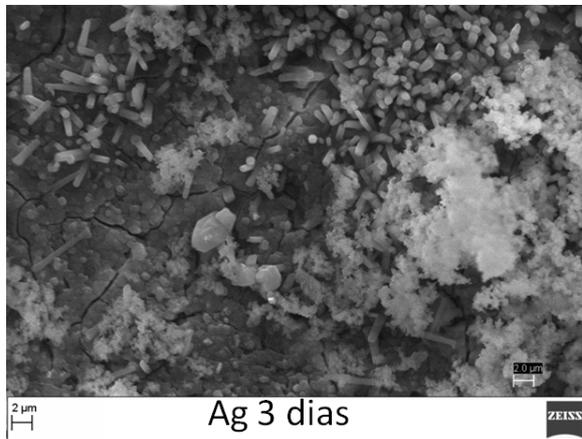
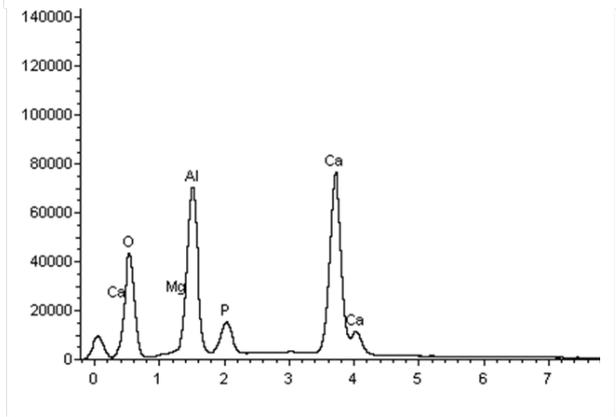
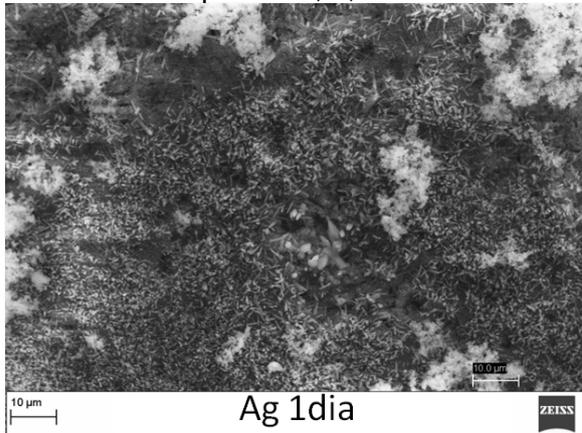
Os resultados quanto às micrografias eletrônicas de varredura realizados na superfície das amostras preparadas com 1%-p de Ag ou TiO_2 sem tratamento por meio dos métodos biomimético ou eletroquímico é apresentado na Figura 14.

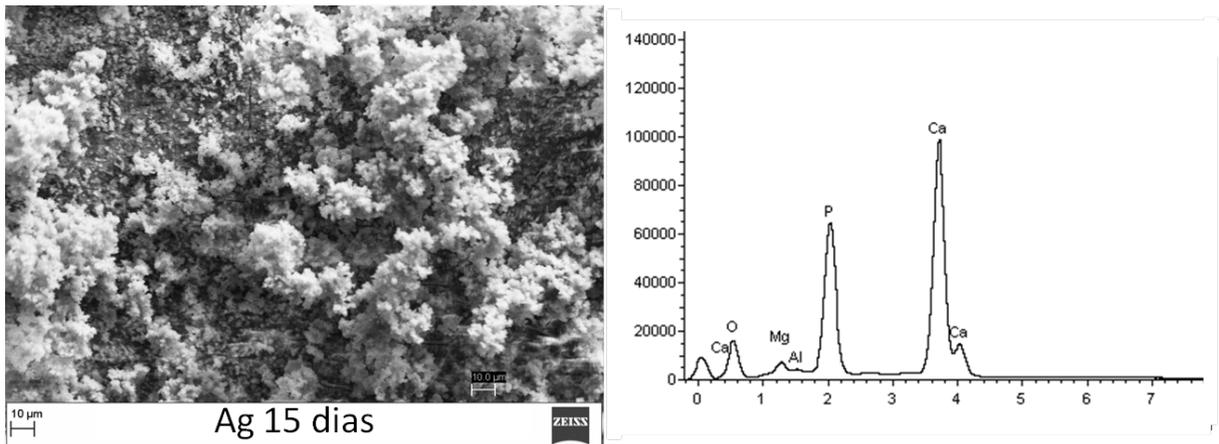
Figura 14 - Micrografias eletrônicas de varredura de amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p de Ag ou TiO_2 sem tratamento



Os resultados quanto às micrografias eletrônicas de varredura e espectros EDS realizados na superfície das amostras preparadas com 1%-p de Ag após diferentes tempos de tratamento no método biomimético são apresentados na Figura 15. Observa-se que ocorreu a deposição de fases sobre a superfície das amostras a partir do terceiro dia de tratamento. Os elementos P e Ca, indicativos da precipitação de fases de fosfato de cálcio são majoritariamente encontrados principalmente a partir do sétimo dia de tratamento, sendo observada uma superfície inteiramente recoberta.

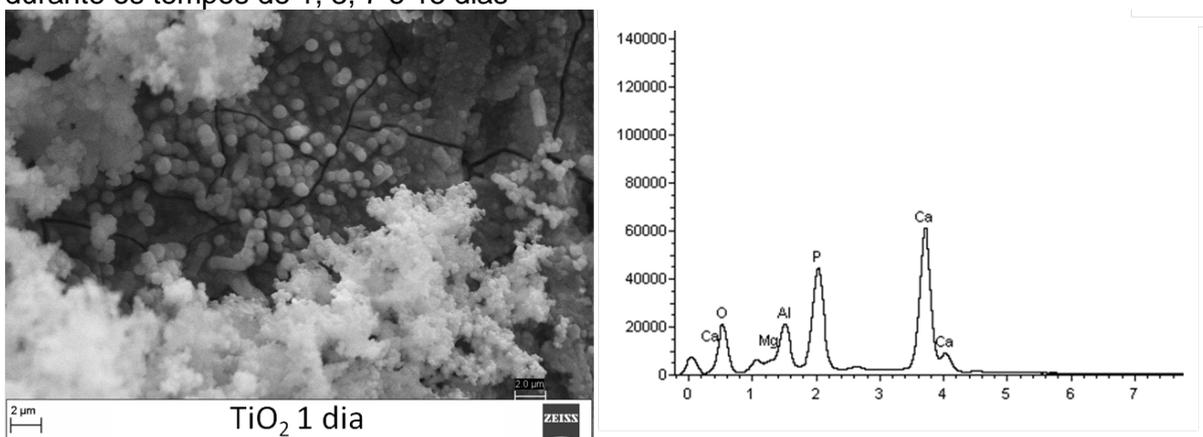
Figura 15 - Micrografias eletrônica de varredura e espectros EDS de amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p Ag após tratamento por meio do método biomimético durante os tempos de 1, 3, 7 e 15 dias.

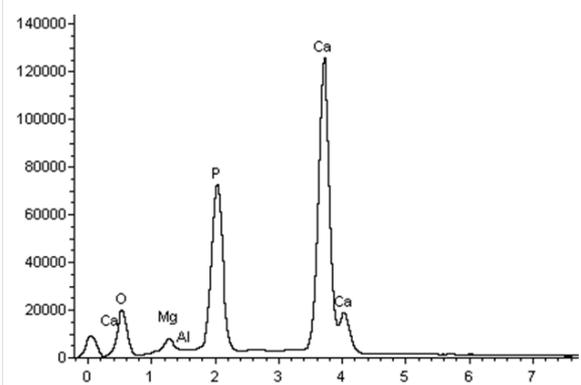
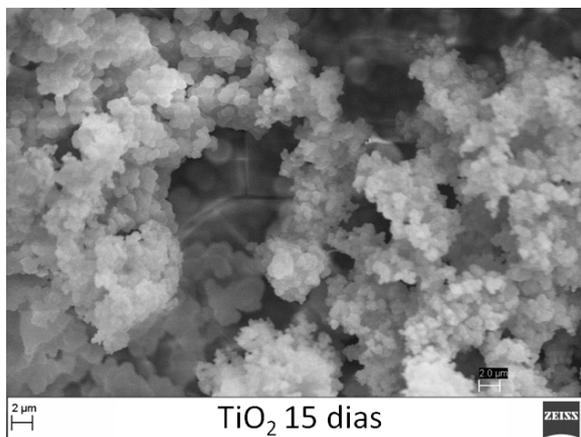
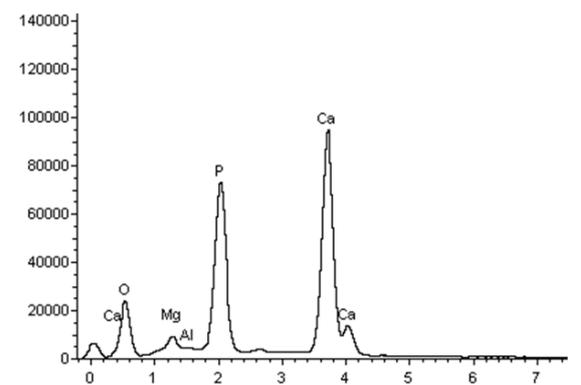
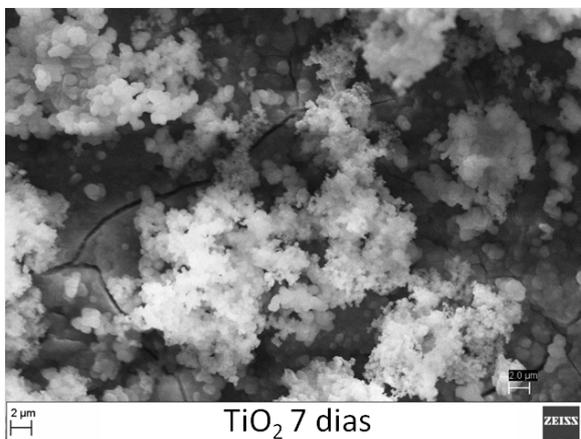
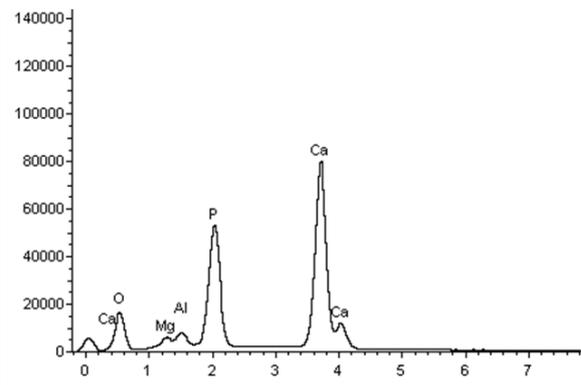
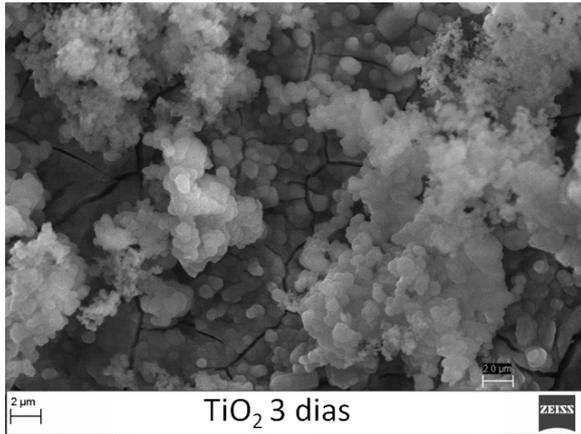




Os resultados quanto às micrografias eletrônicas de varredura e espectros EDS realizados na superfície das amostras preparadas com 1%-p de TiO_2 após diferentes tempos de tratamento biomimético são apresentados na Figura 16. Observa-se que a deposição de fases sobre a superfície das amostras ocorre, ao contrário do verificado com 1%-p de Ag, a partir do primeiro dia de tratamento. Os elementos P e Ca, indicativos da precipitação de fases de fosfato de cálcio também são majoritariamente encontrados a partir do sétimo dia de tratamento.

Figura 16 - Micrografias eletrônica de varredura e espectros EDS de amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p TiO_2 após tratamento por meio do método biomimético durante os tempos de 1, 3, 7 e 15 dias





Espectros EDS das amostras, analisado em diferentes regiões da superfície das amostras antes e após imersão em SBF durante diferentes tempos (1,3,7,15 dias) foram quantificados quanto aos elementos químicos presentes. Microanálises das amostras preparadas com 1%-p de Ag ou TiO₂ são apresentados na Tabela 9. Estes testes confirmaram a presença dos principais elementos constituintes das amostras (Al e Ca). Observa-se que o teor de alumínio quantificado diminuiu após o

tratamento assim como também se quantificou um maior teor de fósforo e cálcio quando comparado à amostra sem tratamento o que indica uma deposição de fases de fosfato de cálcio na superfície das amostras.

Tabela 9 - Resultados médios de microanálise de raios X (EDS) para as amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p de Ag ou TiO₂ por meio do método biomimético durante diferentes tempos.

Tratamento biomimético (dias)											
	Ag (%-atômica)					TiO ₂ (%-atômica)					MTA
	0	1	3	7	15	0	1	3	7	15	7
Al	18.0 ± 3,2	10.5 ± 1,7	0.9 ± 1,4	1.9 ± 2,3	1.5 ± 1,8	14.2 ± 3,4	3.1 ± 2,3	2.0 ± 1,5	1.3 ± 1,6	0.7 ± 1,3	-
P	-	4.2 ± 2,3	12.0 ± 1,0	11.9 ± 2,2	11.5 ± 1,5	-	9.6 ± 1,4	10.6 ± 1,9	11.5 ± 1,8	11.5 ± 1,7	1,8 ± 0,7
Ca	5.5 ± 2,9	10.3 ± 1,9	18.0 ± 2,5	17.2 ± 2,0	18.5 ± 2,6	5.8 ± 2,5	15.4 ± 1,5	17.4 ± 2,2	18.7 ± 2,5	24.8 ± 5,9	12,4 ± 1,8
Mg	-	0.5 ± 2,1	1.4 ± 1,8	1.2 ± 2,2	1.4 ± 1,7	-	1.2 ± 1,9	1.2 ± 1,7	1.5 ± 2,4	1.2 ± 2,6	10,9 ± 2,2

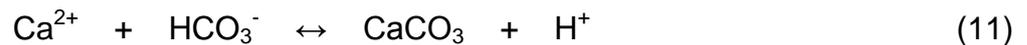
Uma importante característica que deve ser avaliada quando da aplicação de um biomaterial trata-se da interação físico-química da superfície desses materiais em contato com soluções simuladoras de fluido corporal.

A biocompatibilidade de um material se refere a sua capacidade de desenvolver uma ligação estável com tecidos vivos [21]. Materiais que exibem esta propriedade podem ser usados para reparar doenças ou danos no tecido ósseo e podem permanecer *in situ* indefinidamente. Uma indicação da bioatividade do material pode ser obtida pela formação de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície em contato com solução de fluido corporal simulado aumentando a sua biocompatibilidade [18].

Os produtos da hidratação do cimento usado na odontologia (MTA) são hidratos de silicato de cálcio (3CaO.2SiO₂.3H₂O) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂). Quando colocado em contato com SBF Rigo, hidróxido de cálcio é solubilizado do

MTA resultando num aumento significativo do pH da água, como apresentado na Figura 17.

Além disso, também foi verificada queda acentuada no pH com o tempo. Isso poderia ser explicado pela precipitação de carbonato de cálcio o que promove o consumo de íons Ca^{2+} e liberação de íons H^+ por meio das reações:



Quando em contato com a solução SBF, os íons OH^- liberados pelo MTA são parcialmente tamponados pelo líquido sobrenadante e resulta num aumento menos acentuado do pH comparado a água mas significativamente superior ao pH apresentado pelo CAC na presença de Ag ou TiO_2 , como apresentado na Figura 17. Entretanto, isso não favoreceu a precipitação de fosfato de cálcio. O alto nível de pH alcançado favoreceu a precipitação de compostos de Mg^{2+} na solução desde que compostos com magnésio precipitam em condições mais básicas comparadas com compostos de cálcio e inibem a precipitação de fosfato de cálcio [10]. Análises de EDS identificaram altos teores de magnésio na superfície de amostras de MTA após contato com SBF Rigo, como apresentado na Figura 18 e Tabela 9.

Figura 17 - pH em função do tempo para água e solução SBF Rigo 1,5; em contato com amostras endurecidas de MTA ou cimento de aluminato de cálcio contendo 1%-p de Ag e TiO_2 .

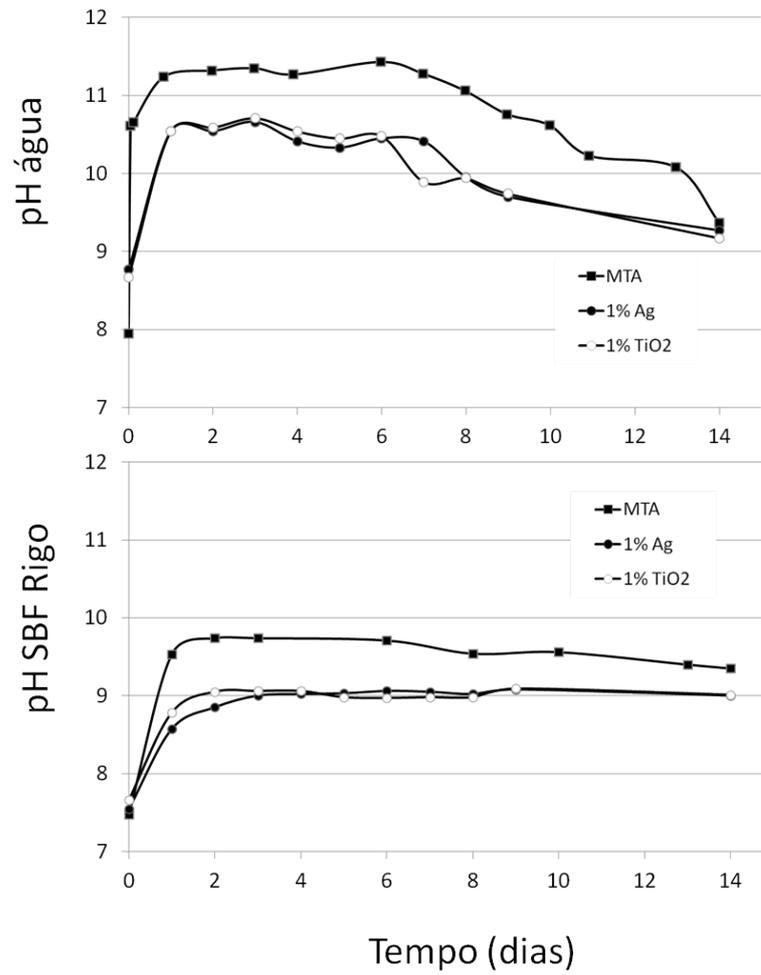
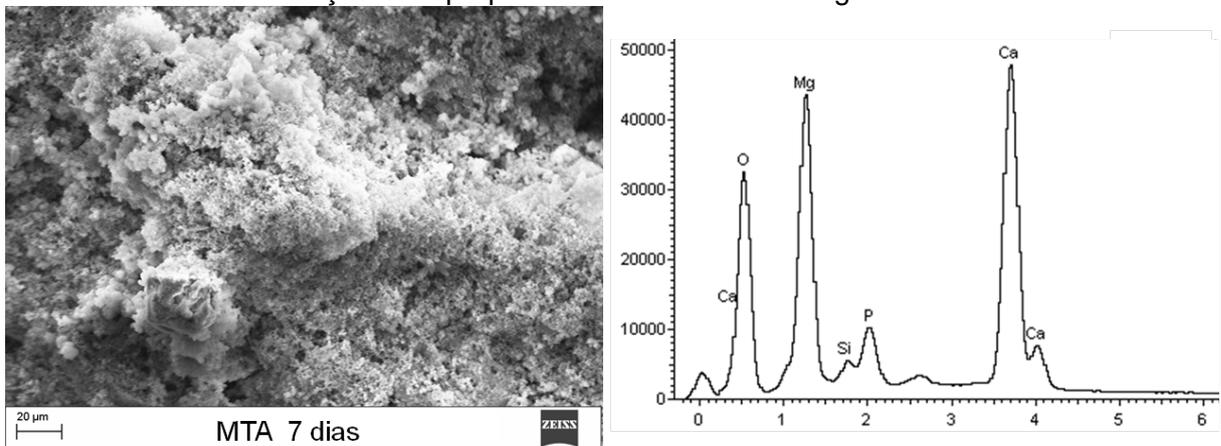


Figura 18 - Micrografia eletrônica de varredura e espectro EDS da superfície de MTA após 7 dias de imersão em solução SBF preparadas de acordo com Rigo



Por outro lado, os cimentos de aluminato de cálcio produzem durante a hidratação hidratos de aluminato de cálcio ($\text{Ca}_3[\text{Al}(\text{OH})_4]_2(\text{OH})_4$) e hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Assim, a liberação dos íons OH^- a partir do CAC pode ser atribuída as dissoluções dos hidratos de aluminato de cálcio, com menor contribuição do hidróxido de alumínio devido sua menor solubilidade em água quando comparada ao hidróxido de cálcio, resultando em menor aumento do pH da água (Figura 17). Dessa forma, devido a menor quantidade de OH^- liberada pelos hidratos de aluminato quando comparado ao MTA, ocorreu aumento moderado de pH suficiente para promover a supersaturação da solução SBF e promover a precipitação de fases de fosfato de cálcio (Figura 18). As condições ideais de pH para precipitação das fases de fosfato de cálcio (aproximadamente 9, [10]) são obtidas em um menor tempo para o CAC na presença de TiO_2 (Figura 17) o que pode justificar a presença de fases precipitadas já a partir do primeiro dia de contato com SBF, como apresentado na Figura 16.

Análises de raios X confirmaram a formação de fases de fosfato de cálcio na superfície de CAC contendo Ag a partir do terceiro dia de tratamento, como apresentado na Figura 19. Já na presença de TiO_2 as fases estão presentes desde o primeiro dia (Figura 20). As fases identificadas foram monetita (CaHPO_4), pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) e fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. Tais fosfatos de cálcio estão presentes no sistema biológico durante as diferentes etapas do desenvolvimento ósseo. A monetita (CaHPO_4) é uma das fases precursoras da formação de hidroxiapatita. É comumente usada como material substituto ósseo reabsorvível por apresentar boa biocompatibilidade e bioatividade, entretanto existem algumas limitações no seu uso devido a sua baixa resistência mecânica [62].

Figura 19 - Difratoformas de raios X de amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p Ag após tratamento por meio do método biomimético para os tempos de (a) 1, (b) 3, (c) 7 e (d) 15 dias.

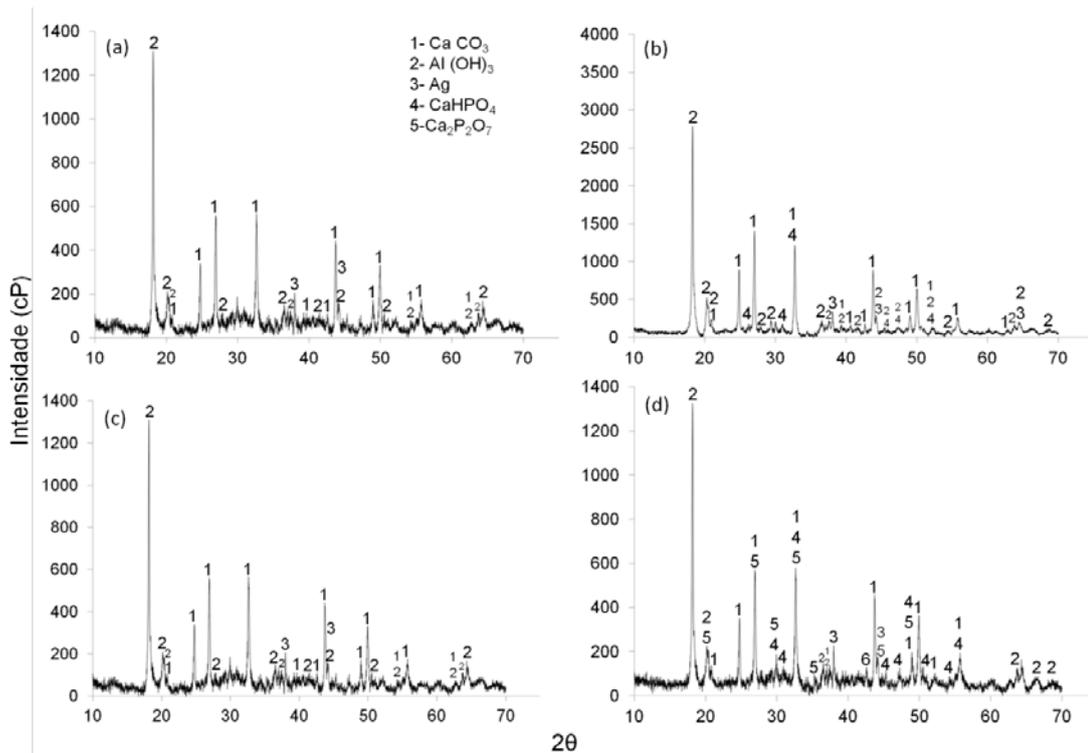
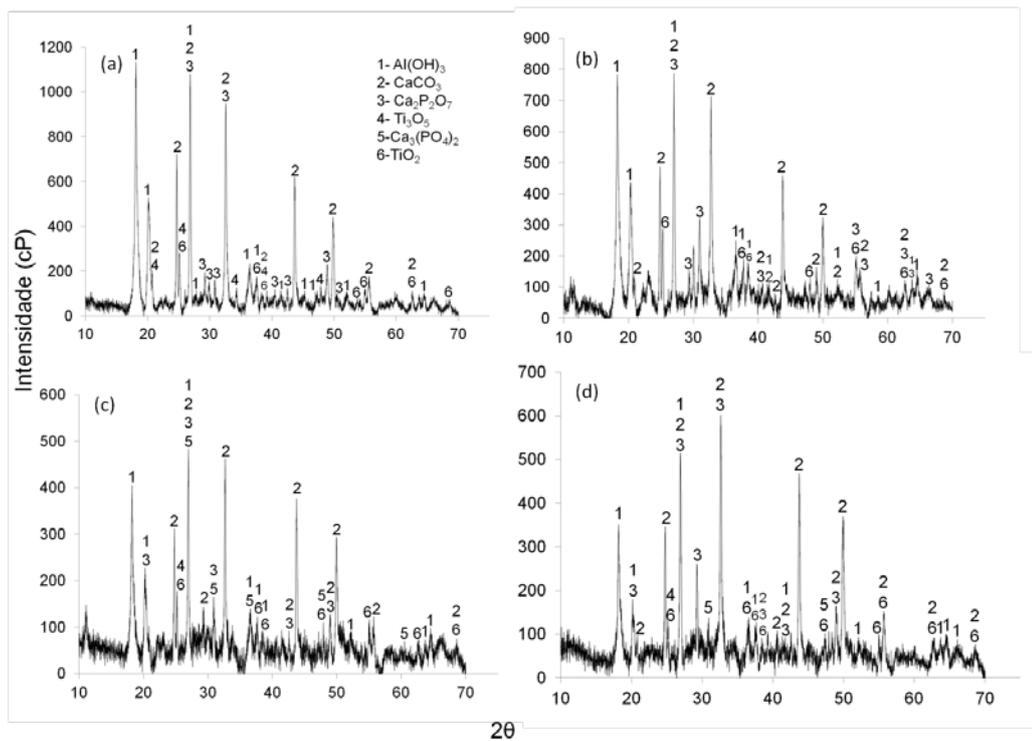


Figura 20 - Difratoformas de raios X de amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p TiO_2 após tratamento por meio do método biomimético para os tempos de (a) 1, (b) 3, (c) 7 e (d) 15 dias



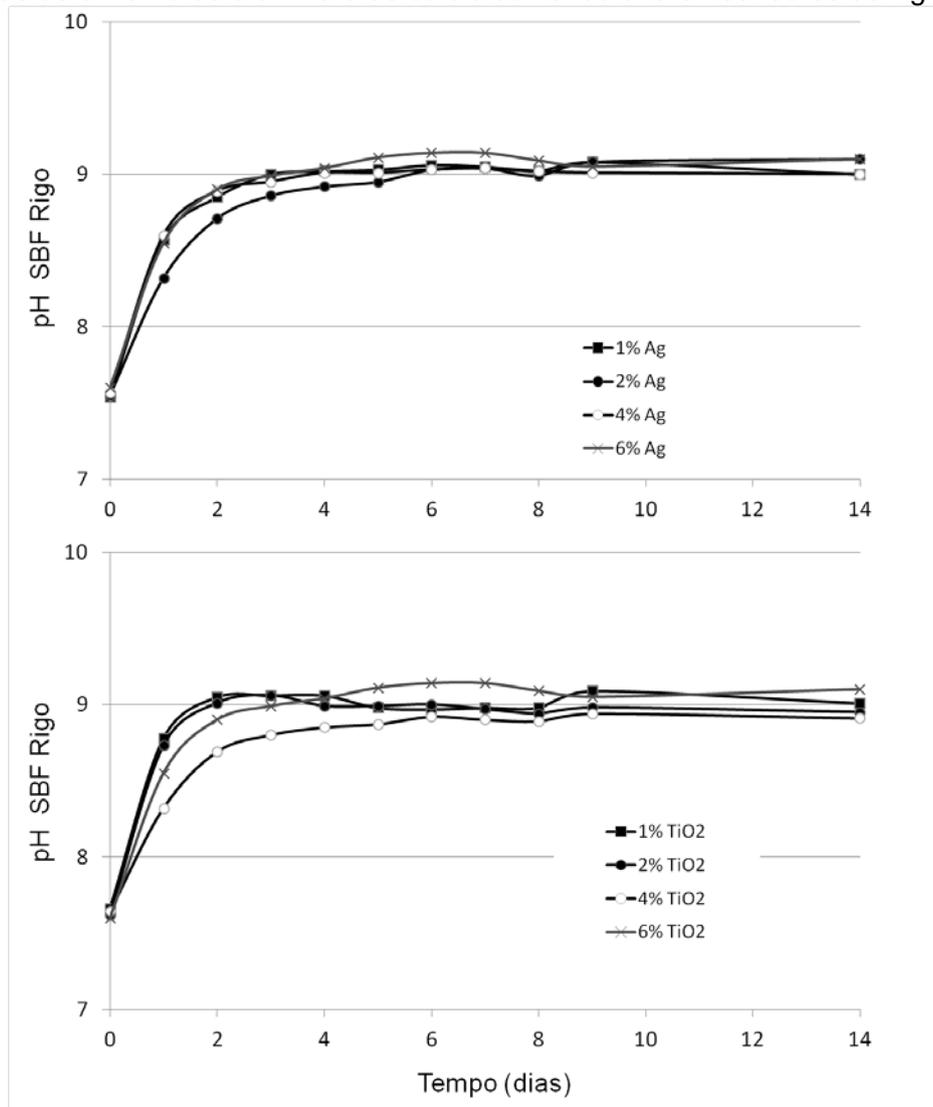
Os resultados das microanálises realizadas na superfície das amostras preparadas com diferentes teores de Ag ou TiO₂ após o tratamento por meio do método biomimético durante sete dias são apresentados na Tabela 10. Observa-se que o aumento do teor de aditivo não favoreceu uma maior concentração de fósforo e cálcio indicativos da deposição na superfície das amostras. Também não foi observada alta concentração de íons magnésio.

Esses resultados concordam com as análises de pH (Figura 21). Curvas de pH em função do tempo para os diferentes teores de aditivos Ag e TiO₂ mostraram-se muito semelhantes alcançando após 7 dias níveis de pH ideais para a precipitação de fases de fosfato de cálcio (~ 9,0) o que não favorece a precipitação do magnésio.

Tabela 10 - Resultados médios de microanálise de raios X (EDS) para as amostras de CAC na presença de diferentes teores de Ag ou TiO₂ preparadas por meio do método biomimético durante 7 dias.

Tratamento biomimético (%-p)											
	Ag (%-atômica)					TiO₂ (%-atômica)					MTA
	0	1	2	4	6	0	1	2	4	6	7
Al	18.0 ± 3,2	1.9 ± 2,8	4.7 ± 3,8	4.8 ± 2,6	6.3 ± 2,2	14.2 ± 3,4	1.3 ± 3,2	2.9 ± 2,5	0.6 ± 3,2	2.1 ± 2,3	-
P	-	11.9 ± 3,1	8.6 ± 3,2	7.3 ± 2,7	9.4 ± 3,1	-	11.5 ± 2,8	11.0 ± 3,2	11.4 ± 2,9	10.3 ± 3,2	1,8 ± 0,7
Ca	5.5 ± 2,9	17.2 ± 2,7	14.6 ± 2,6	6.7 ± 3,4	12.1 ± 2,1	5.8 ± 2,5	18.7 ± 2,9	16.5 ± 3,7	20.2 ± 3,1	19.5 ± 3,4	12,4 ± 1,8
Mg	-	1.2 ± 1,9	1.5 ± 2,1	1.0 ± 1,1	1.2 ± 1,0	-	1.5 ± 1,0	1.5 ± 1,0	1.5 ± 1,4	1.9 ± 1,2	10,9 ± 2,2

Figura 21 - pH em função do tempo para solução SBF Rigo 1,5; em contato com amostras endurecidas de cimento de aluminato de cálcio contendo diferentes teores de Ag ou TiO₂.



Análises de raios X confirmaram a formação de fases de fosfato de cálcio na superfície de CAC contendo diferentes teores de Ag e TiO₂, como apresentado nas Figuras 22 e 23. As fases identificadas também foram monetita (CaHPO₄), pirofosfato de cálcio (Ca₂P₂O₇). Na Presença TiO₂ outros fosfatos foram identificados como fosfato tricálcico [Ca₃(PO₄)₂] e monetita hidratada (CaHPO₄. 2H₂O) .

Figura 22 - Difratoogramas de raios X de amostras de CAC preparadas na presença de Ag após tratamento por meio do método biomimético durante 7 dias para os teores de (a) 1, (b) 2, (c) 4 e (d) 6%-p.

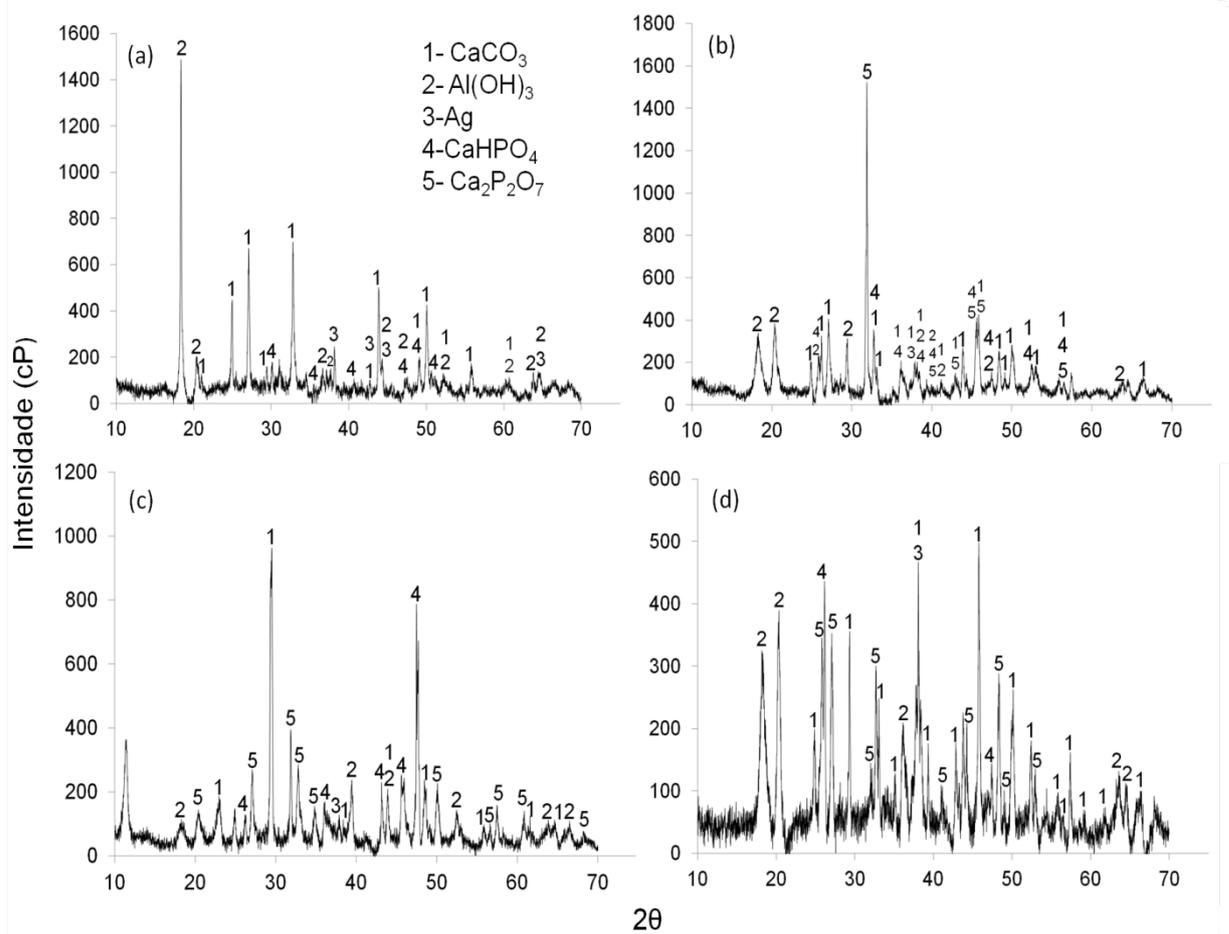
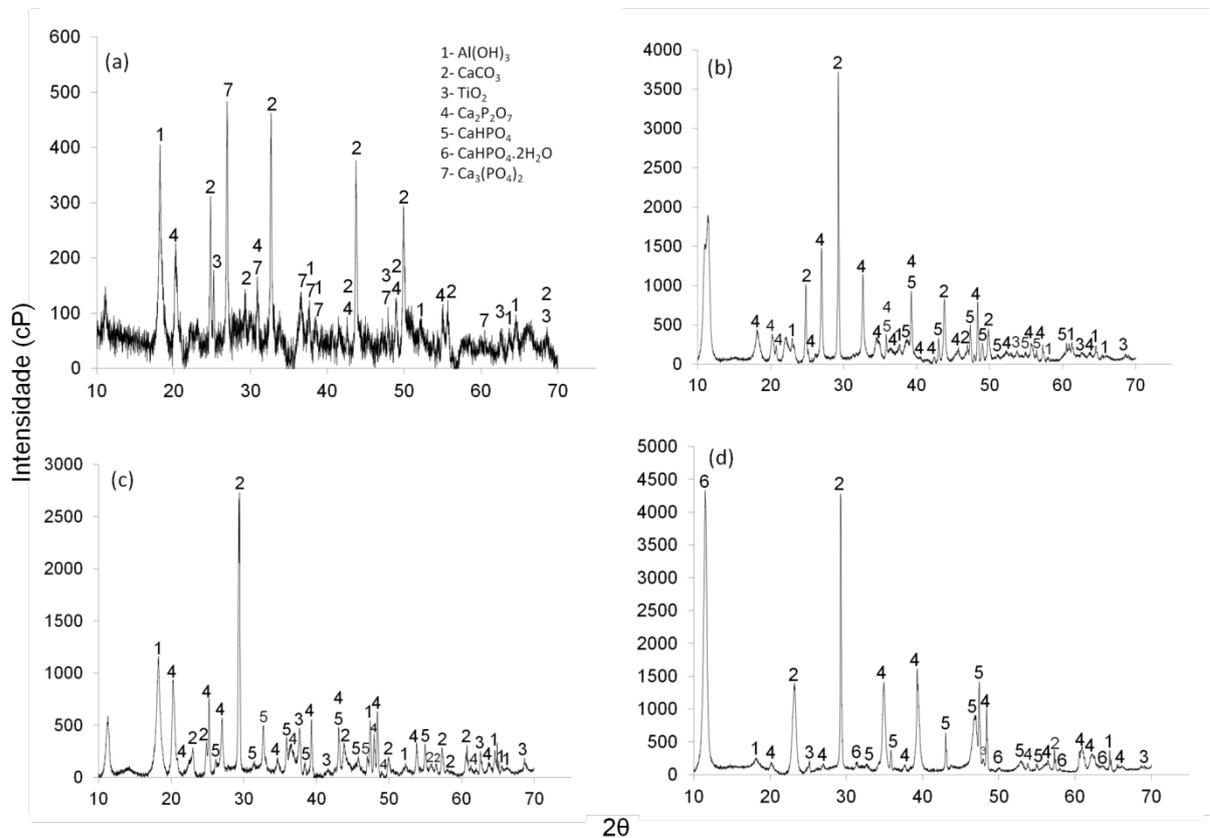


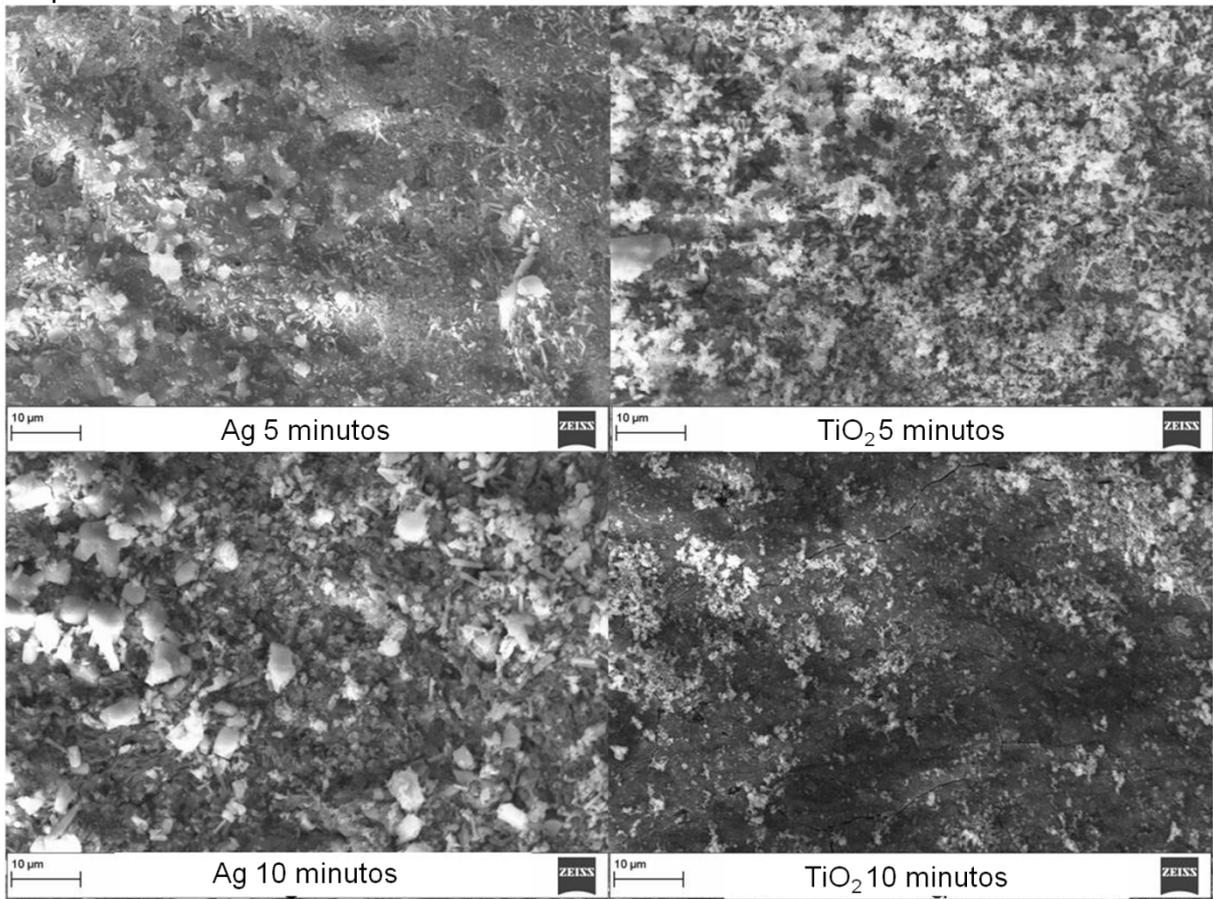
Figura 23 - Difratogramas de raios X de amostras de CAC preparadas na presença de TiO_2 após tratamento por meio do método biomimético durante 7 dias para os teores de (a) 1, (b) 2, (c) 4 e (d) 6%-p.



5.4 Avaliação da biocompatibilidade de amostras de CAC na presença de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO_2) por meio do método eletroquímico

Os resultados quanto às micrografias eletrônicas de varredura realizados na superfície das amostras preparadas com 1%-p de Ag ou TiO_2 após tratamento pelo método eletroquímico para os tempos de 5 e 10 minutos são apresentados na Figura 24. Quando comparado com as mesmas amostras sem tratamento (Figura 14) observa-se que o tratamento foi muito menos significativo quanto à deposição de fases sobre a superfície das amostras, quando comparado ao recobrimento pelo método biomimético (Figuras 15 e 16).

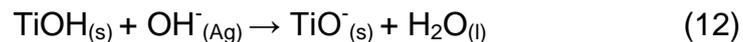
Figura 24 - Micrografias eletrônica de varredura de amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p Ag ou TiO_2 após tratamento por meio do método eletroquímico para os tempos de 5 e 10 minutos



Os resultados das microanálises de raios X (EDS) realizadas na superfície das amostras preparadas com 1%-p de Ag ou TiO_2 após o tratamento eletroquímico são apresentados na Tabela 11. Observa-se que o teor de alumínio quantificado não diminuiu quando comparado à amostra sem tratamento o que indicaria o recobrimento da superfície assim como também não se quantificou um maior teor de cálcio após o tratamento indicativo da precipitação de fases de fosfato de cálcio. Com o aumento do teor de Ag e TiO_2 , observou-se decréscimo do teor de alumínio e aumento principalmente de Ca, como apresentado na Tabela 12. Por meio das análises de raios X foram identificadas as seguintes fases de fosfato: monetita (CaHPO_4), monetita hidratada ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) como apresentado nas Figuras 25 e 26. A partir de 2%-p de Ag também foram observados picos mais intensos relacionados às fases $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ e CaCO_3 o que poderia justificar o aumento do teor de cálcio tanto no método eletroquímico como no método biomimético verificou-se a precipitação da fase CaCO_3 . Isso se deve a reação de

íons Ca^{2+} dissociados a partir dos hidratos de aluminato de cálcio, com íons HCO_3^- presentes na solução resultando em CaCO_3 de acordo com as reações 10 e 11. Já a partir de 2%-p de TiO_2 foram observado picos mais intensos relacionados ao próprio aditivo. Isso indica que o aditivo pode não ter sido homogeneamente misturado ao material segregado na superfície. A Figura 27 mostra que as amostras sem tratamento também apresentam um aumento na intensidade dos picos da fase TiO_2 com o aumento do teor de 1 para 6%-p.

A segregação de TiO_2 na superfície com o aumento do teor de aditivo favorecem a precipitação de fase de fosfato quando tratada pelo método biomimético sendo verificados picos mais intensos nos difratogramas (Figura 23). Isso ocorreu porque provavelmente nas condições de pH das soluções SBF a superfície das partículas devem se tornar negativamente carregadas, dado as reações de óxidos em meio básico:



As partículas carregadas negativamente atraem íons Ca^{2+} e em sequência ocorre a adsorção de íons de PO_4^{3-} .

Tabela 11 - Resultados médios de microanálise de raios X (EDS) para as amostras de CAC preparadas na presença de 1%-p de Ag ou TiO_2 por meio do método eletroquímico durante diferentes tempos

	Tratamento eletroquímico (min.)					
	Ag (%-atômica)			TiO_2 (%-atômica)		
	0	5	10	0	5	10
Al	$18.0 \pm 3,2$	$23.5 \pm 3,8$	$19.1 \pm 3,1$	$14.2 \pm 3,4$	$15.4 \pm 3,2$	$15.0 \pm 3,7$
P	-	$7.4 \pm 2,9$	$4.5 \pm 3,5$	-	$4.3 \pm 3,6$	$5.1 \pm 2,8$
Ca	$5.5 \pm 2,9$	$3.9 \pm 3,2$	$5.9 \pm 3,6$	$5.8 \pm 2,5$	$2.8 \pm 3,4$	$2.5 \pm 3,9$

Tabela 12 - Resultados médios de microanálise de raios X (EDS) para as amostras de CAC na presença de diferentes teores de Ag ou TiO₂ após tratamento por meio do método eletroquímico durante 5 minutos

	Tratamento eletroquímico (%-p)							
	Ag (%-atômica)				TiO ₂ (%-atômica)			
	1	2	4	6	1	2	4	6
Al	23,5 ± 3,9	7,4 ± 3,5	10,0 ± 3,0	10,6 ± 3,8	15,4 ± 3,1	8,8 ± 3,6	6,6 ± 3,5	6,7 ± 3,3
P	7,4 ± 2,0	8,2 ± 2,6	8,3 ± 0,9	9,5 ± 1,1	4,3 ± 2,7	5,2 ± 1,9	7,9 ± 3,4	8,0 ± 3,5
Ca	3,9 ± 3,2	14,1 ± 5,9	12,0 ± 2,2	14,6 ± 1,9	2,8 ± 1,9	10,1 ± 1,7	11,3 ± 2,3	11,6 ± 2,0

Figura 25 - Difratogramas de raios X de amostras de CAC preparadas na presença de Ag após tratamento por meio do método eletroquímico durante 5 minutos para os teores de (a) 1, (b) 2, (c) 4 e (d) 6%-p

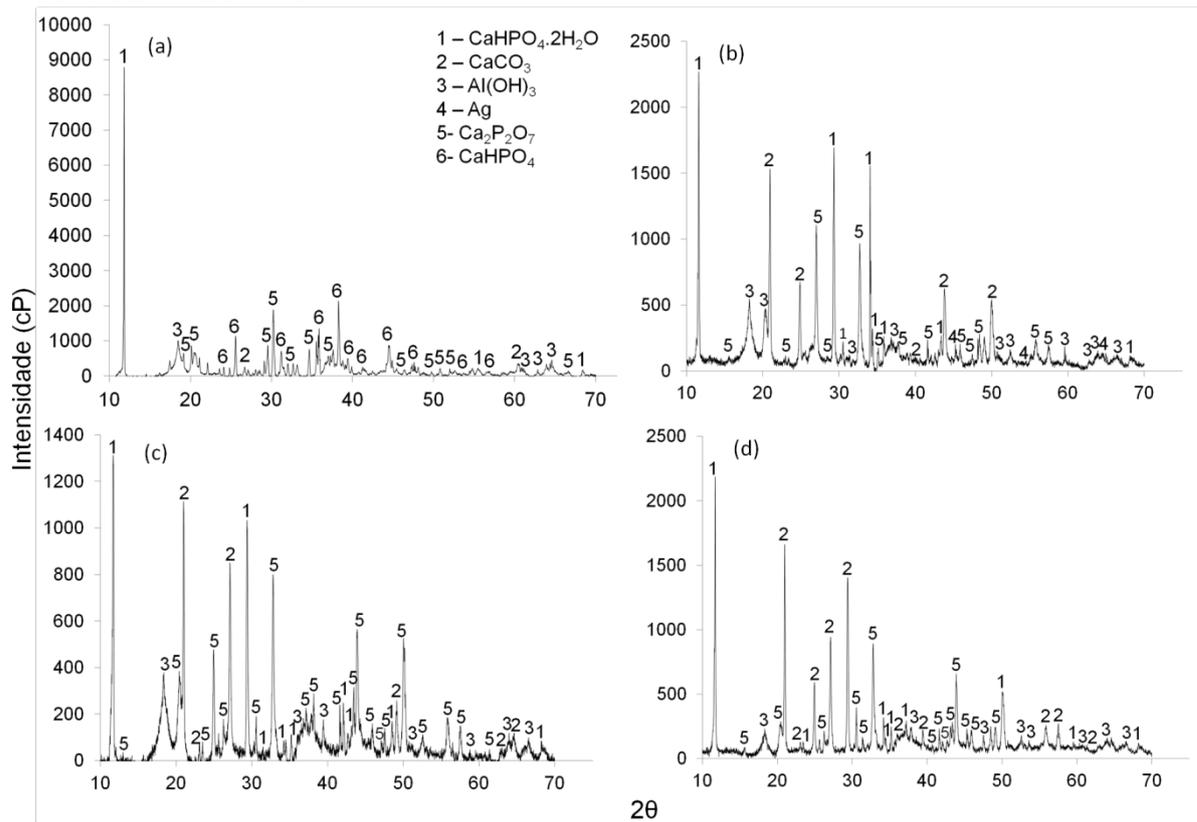


Figura 26 - Difratogramas de raios X de amostras de CAC preparadas na presença de TiO_2 após tratamento por meio do método eletroquímico durante 5 minutos para os teores de (a) 1, (b) 2, (c) 4 e (d) 6%-p

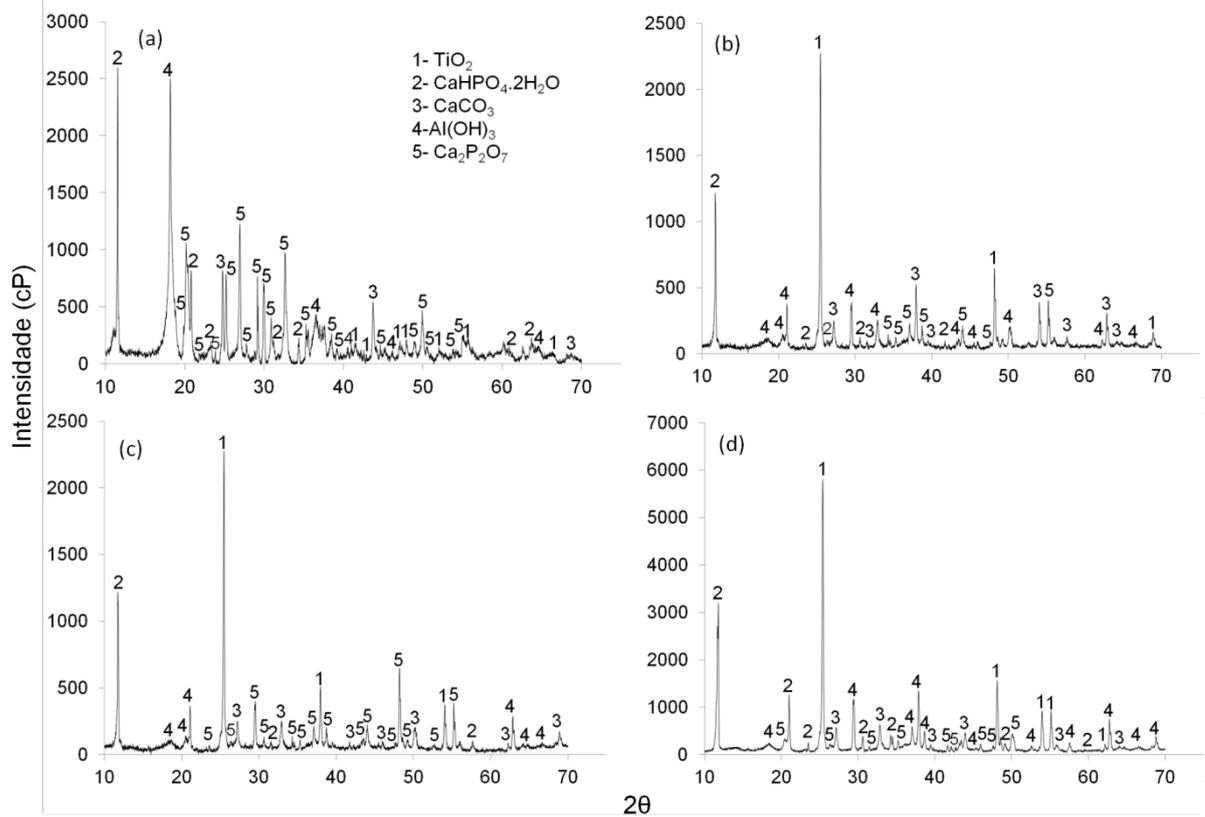
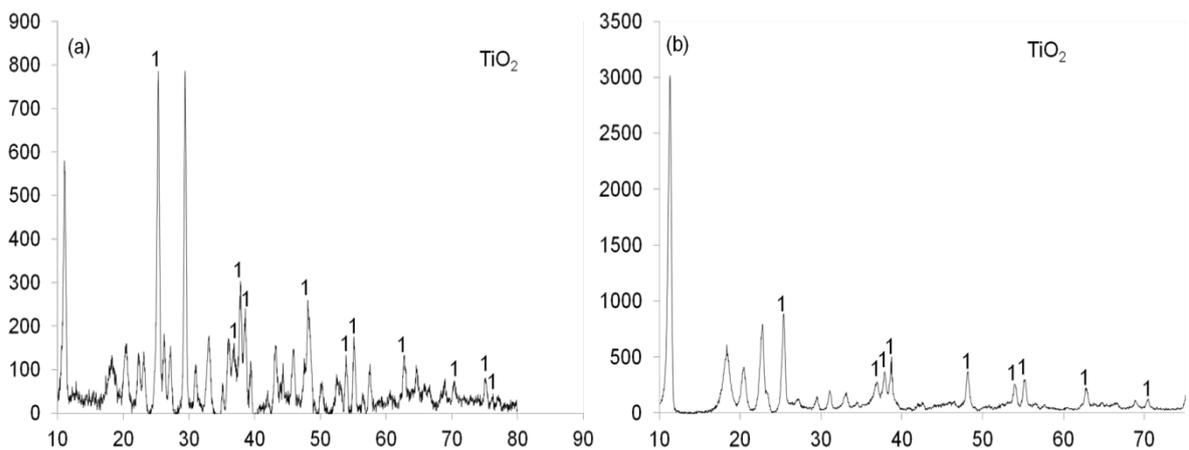


Figura 27 - Difratogramas de raios X de amostras de CAC preparadas na presença de TiO_2 sem tratamento nos teores de (a) 1 e (b) 6%-p



6 CONCLUSÕES

A ação antimicrobiana de um biomaterial é de extrema importância, pois visa evitar contaminação durante a fase de manipulação, completar o efeito antimicrobiano da medicação e inibir o crescimento de microrganismos. Baixos teores de prata com tamanho médio de partículas de 700 nm proporciona efeito bactericida ao cimento de aluminato de cálcio principalmente contra o microrganismo *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, efeito positivo contra *Escherichia coli* apenas é verificado quando usado prata com menor tamanho de partículas (40 nm). *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias mais frequentemente encontradas na boca já a *E. coli* é encontrada em menor quantidade e ambas podem causar doenças nos seres humanos. Para as amostras na presença de TiO_2 não proporcionou um efeito bactericida ao cimento de aluminato de cálcio.

A adição de prata ao cimento de aluminato de cálcio proporciona aumento da sua radiopacidade. Além disso, a prata pode ser misturada ao aditivo óxido de zinco com um teor significativamente reduzido alcançando-se radiopacidade adequada ao material (superior a 3 mm Al), para as amostras na presença de TiO_2 podemos observar uma baixa radiopacidade. As características de radiopacidade são particularmente interessantes em odontologia, pois a radiografia tradicional ou as imagens digitalizadas são os únicos métodos disponíveis para investigar a qualidade do tratamento de canal ou na qualidade dos retro-obturadores, bem como o reparo tecidual pós-tratamento.

Uma indicação da bioatividade do material pode ser obtida pela formação de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície em contato com solução de fluido corporal simulado (SBF) aumentando a sua biocompatibilidade. Tanto na presença de prata quanto óxido de titânio o material mostra-se bioativo, independente do teor avaliado, quando tratado com SBF. As condições de pH alcançadas favorecem a precipitação de fases de fosfatos como monetita (CaHPO_4), pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] e monetita hidratada ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Por outro lado, amostras tratadas por meio do método eletroquímico apresentam precipitação de fases de fosfatos, principalmente na presença de Ag, enquanto o TiO_2 foi a principal fase observada nos difratogramas com o aumento do teor devido a segregação do material.

7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Uma vez que a adição de prata ao CAC contribui significativamente para sua capacidade bactericida e radiopacidade a influencia da sua adição em outras propriedades do material deve ser avaliada como resistência mecânica, porosidade e injetabilidade.
- Uma vez que na presença de prata o material apresentou uma significativa bioatividade quando em contato com fluidos biológicos, deve ser avaliado a sua biocompatibilidade quando em contato com células, Por meio de teste in vitro com cultura de células visando simular seu comportamento in vivo.

8 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

PARREIRA, R. M.; ANDRADE, T. L.; CHO, L. Y. ; OLIVEIRA, I. R. Deposição de hidroxiapatita sobre material a base de aluminato de cálcio e sua atividade bactericida em função da adição de prata. In: 57º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2013, Natal.

PARREIRA, R. M.; ANDRADE, T. L.; CHO, L. Y. ; OLIVEIRA, I. R. Avaliação comparativa do recobrimento do material a base de aluminato de cálcio. In: XII Encontro Latino Americano de Pós Graduação, 2012, São José dos Campos.

PARREIRA, R. M.; ANDRADE, T. L.; OLIVEIRA, I. R. Avaliação de recobrimento de material a base de aluminato de cálcio por meio dos métodos biomimético e eletroquímico. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2012, Joinville.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GRONBERG, K. S. *Calcium aluminate cement as dental restorative – Mechanical properties and clinical durability*. 2004. Dissertations ([mestrado]) Department of Dental Hygienist Education, Dental School, Umeå University, Umeå, Sweden. 2004.
- [2] PARKER, K. M; SHARP, J. H; Refractory calcium aluminate cements. *British Ceramic Transitions Journal*, v. 81, p.35-42, 1982.
- [3] ALT, C; WONG, L; PARR, C. Measuring castable rheology by exothermic profile. *Refractories Applications and News*, v. 8, p. 15-8, 2003.
- [4] PANDOLFELLI, V.C.; OLIVEIRA, I. R.; ROSSETTO, H. L., JACOBOVITZ M. *Composição a base de cimento aluminoso para aplicações em endodontia e produto cimentício obtido*. PI 0704502-6. 27 nov. 2007. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- [5] BORTOLUZZI, E. A. et al. Marginal gingiva discoloration by gray MTA: a case report. *Journal of Endodontics*, v. 33, p. 325-7, 2007.
- [6] JACOBOVITZ, M.; DE LIMA R. K. P. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. *Int. Endodontic J.*, v.41, n. 10, p. 905-912, 2008.
- [7] BÜRGER, C. P.; *Cimento de Aluminato de Cálcio – Uso em defeitos ósseos induzidos em fêmures de coelhos (Oryctolagus cuniculus)*. 2010. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010.
- [8] ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR H. S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- [9] SAHA, S.; PAL, S.; Mechanical properties of bone cement: A review, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 18, p. 435-462, 2004.
- [10] OLIVEIRA, I.R.; PANDOLFELLI, V.C.; JACOBOVITZ, M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *International Endodontic Journal*, v. 43, p. 1069-1076, 2010.
- [11] NANOX S.A. *Coating cerâmico nonoestruturado bactericida e respectivo processo de obtenção*. PI 0600327-3. 31 jan. 2006. 29 set. 2006. 30 out. 2007. Revista da Propriedade industrial, Rio de Janeiro, n. 1921, p. 74.
- [12] AGUILAR, F.G. et al. Radiopacity evaluation of calcium aluminate cement containing different radiopacifying agents. *Journal of Endodontics*, v. 37, p. 67-71, 2011.
- [13] TANOMARU-FILHO, Mario et al . Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *J. Appl. Oral Sci.*, Bauru , v. 16, n. 6, Dec. 2008

Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572008000600004&lng=en&nrm=iso>. access on 27 Sept. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572008000600004>.

[14] VIVAN, R.R. et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. endod.*, v. 108, p. 35-38, 2009.

[15] FERNANDES, B.G. *Bioativação superficial do PEUAPM com hidroxiapatita*. 2009. Trabalho (Graduação) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

[16] RIGO, E. C. S. et al. Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita. *Rev. bras. eng. biomed.*, v. 15, p. 21-29, 1999.

[17] DOROZHKIN, S.V. Calcium orthophosphate- based biocomposites and hybrid biomaterials. *J. Mater. Sci.*, v. 44, p. 2343-2387, 2009.

[18] KLOPCIS, S.B.; KOVACOTSUKI, J.; KOSMAC, T.; Apatite-forming ability of alumina and zirconia ceramics in a supersaturated Ca/P solution. *Biomol. eng.*, v. 24, p. 467-471, 2007.

[19] MELO, M. C. B.; *Recobrimento eletroquímico de liga de aço 316 L a base de fosfatos de cálcio*. 2011. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São Jose dos Campos, 2011.

[20] DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. Biomaterials. In: _____. *Tissue-Biomaterial Interactions: An introduction tissue-biomaterial Interactions*. Hoboken, N.J.: Wiley- Liss, 2002. 1-13.

[21] HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. *J. am. Ceram. Soc.*, v. 74, p. 1487-1510, 1991.

[22] KAWACHI, E. Y. et al.; Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quím. Nova*, v. 23, p. 518-522, 2000.

[23] BILLOTE, W.G.; Ceramic biomaterials. In: PARK, J.B., BRONZINO, J.D. *Biomaterials: principles and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 21-15.

[24] THAMARAISELVI, T.V.; RAJESWARI, S. Biological evaluation of bioceramic materials– review. *Trends Biomater. Artif. Organs*, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2004

[25] HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

[26] DEVILLE, S. et al. Low-temperature ageing of zirconia-toughened alumina ceramics and its implication in biomedical implants. *J. Eur. Ceram. Soc.*, v. 23, n. 15, p. 2975-2982, 2003.

[27] MARIOLANI, J. R. L.; BELANGERO, W. D.; ARRUDA, A. C. F.; Resposta interfacial provocada pelas interações biológicas e mecânicas entre material de implante e tecido receptor. *Acta ortop. bras.*, v. 2, p. 48-53, 2000.

[28] ROY, D.M.; New Strong Cement Materials: Chemically Bonded Ceramics. *Science*, v. 235, 651-658, 1987.

[29] GARCIA, J. R.; OLIVEIRA, I. R.; PANDOLFELLI, V. C.; Processo de hidratação e os mecanismos de atuação dos aditivos aceleradores e retardadores de pega do cimento de aluminato de cálcio. *Cerâmica*, v. 53, p. 42-56, 2007.

[30] LEE, W.E. et al. Castable refractory concretes. *Int. mater. rev.*, v. 46, p. 145-167, 2001.

[31] SINGH, V. K.; MANDAL, U. K. Hydration and some other properties of CA and CA2 and their mixes. *Trans. Indian Ceram. Soc.*, v. 43, p. 15-18, 1984.

[32] PENA, P.; DE AZA, A. H.; Cemento de Aluminatos Cálcicos. Constitución, Características y Aplicaciones. In: BAUDIN, C. *Refractarios Monolitics*. Madrid (España): Sociedad Española de Ceramica y Vidrio, 1999. p. 85-106.

[33] ZHOU, H., et al. Investigation into the antibacterial property for carbon films. *Diam. Rel. Mater.*, v. 17, p. 1416-1419, 2008.

[34] QI, L. et al. Preparation And Antibacterial Activity Of Chitosan Nanoparticles. *Carbohydr. Res.*, v. 339, n. 16, p. 2693–2700, 2004.

[35] ARUMUGAM, S.K. et al. One step synthesis of silver nanorods by autoreduction of aqueous silver ions with hydroxyapatite: an inorganic-inorganic hybrid nanocomposite. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 80, p.391–398, 2007.

[36] KANG, S. et al. Antibacterial effects of Carbon nanotubes: Size Does Matter. *Langmuir*, v. 24, p. 6409–6413, 2008.

[37] CLEMENT, J. L; JARRETT, P. S. Antibacterial silver. *Met. Based. Drugs*, v. 1, n.5-6, 467-482, 1994.

[38] XU, X. H. et al. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry*, v. 42, n. 32, p. 10400-10413, 2004.

[39] GOGOI, S. K. et al. Green fluorescent protein-expressing Escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*, v. 22, n. 22, p. 9322-9328, 2006.

[40] ELICHIGUERRA, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-I. *J nanobiotechnology*, v. 29, p. 3-6, 2005.

- [41] KVITEK, L. et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C.*, v. 112, p. 5825–5834, 2008
- [42] KOPPER, P. M. P. et al. Avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana de três cimentos endodônticos. *Revista Odonto Ciência*, Porto Alegre, v. 22, n. 56, p. 106-111, 2007.
- [43] ROSSATO, J. H. H.; KERSTING, R. L.; VOLKMER, T. M.; Efeito da adição de prata na síntese de Hidroxapatita por precipitação via úmida. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciencia dos materiais (CBECIMAT) 15., 2002, Natal., *Anais...* São Carlos: CBECiMat, 2002. p.101-149,
- [44] RODRÍGUEZ, J. et al. El fotocatalizador: síntesis, propiedades y limitaciones. In: BLESA, M. A.; BLANCO GALVEZ, J. (Eds.). *Solar Safe Water. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua*. DEL Buenos Aires, Argentina: Sexto Programa Marco de la Unión Europea, 2005. p. 135-152. (Proyecto FP6-510603)
- [45] CORDEIRO, A. C. S; LEITE, S. G. F.; DEZOTTI, M.. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* *Quím. Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, out. 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500002&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 27 set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500002..>
- [46] MILLS, A.; LE-HUNTE, S. An overview of semiconductor photocatalysis *J. Photochem. Photobiol.*, v. 108, n. 1, p. 1-35, 1997.
- [47] NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 21, n. 1, fev. 1998. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000100011&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 27 set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100011..>
- [48] MATSUNAGA, T. et al. Photoelectrical Steruilation of microbial cells by semiconductor powers. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 29, p. 211-214, 1985.
- [49] ATTAR, N.; TAM, L.E.; MCCOMB, D.; Mechanical and physical properties of contemporary dental luting agents. *J. prosthet. dent.*, St. Louis, v. 89, n. 2, p. 127-134, 2003.
- [50] CRUVINEL, D. R. et al.; Evaluation of radiopacity and microhardness of composites submitted to artificial aging. *Mater. res.*, São Carlos, v. 10, n. 3, p. 325-329, 2007.
- [51] BEYER-OLSEN, E. M.; ORTAVIK, D. Radiopacity of root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, v. 51, n. 3, p. 320-328, 1981.

- [52] MCLEAN, J.W.; GASSER, O. Glass-Cermet-cement (I). *Quintessenz*, v. 36, p. 2059-2068, 1985.
- [53] CAMILLERI, J.; GANDOLFI, M. G.; Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *Int. endod. j.*, v. 43, p. 21-30, 2010.
- [54] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *International standard ISO-6876: dental root canal sealing materials*. Geneve: ISO, 2001.
- [55] ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *J. Mater. Sci.: Mat. Med.*, v. 1, n. 4, 233-238, 1990.
- [56] CAO, W.; HENCH, L.L. Bioactive materials. *Ceramics International*, v. 22, p. 493-507, 1996.
- [57] KOKUBO, T. Bioactive Glass-Ceramics: Properties and Applications. *Biomaterials*, v. 12, p. 155-163, 1991.
- [58] MATHEW, M.; TAKAGI, S. Crystalstructures of calcium orthophosphates. In: CHOW, L. C.; EANES, E.D. (eds.). *Octacalcium phosphate*. Basel: Kargerp, 2001. 1-16.
- [59] LE GEROS, R. Z.; LE GEROS, J. P.; Dense Hydroxyapatite. In: HENCH, L. L.; WILSON, J. (ed.). *An Introduction to Bioceramics*. Singapore: World Scientific Publishing, 1993. p.139-180,
- [60] LI PANJIAN, P. et al. Role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. *J. biomed. mater. res.*, v. 28, p. 7-15, 1994.
- [61] GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quím. Nova*, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.
- [62] DE GROOT, K. *Biocompatibility of clinical implant materials*. Flórida: CRC Press, 1981. v.1, p.199-222.
- [63] LE GEROS, R. Z.; *Calcium phosphate in oral biology and medicine*. Basel: Karger, 1991.
- [64] VISWANATH, B.; RAVISHANKAR, N. Interfacial reactions in hydroxyapatite / alumina nanocomposites. *Scripta Materialia*, v. 55, p. 863-866, 2006.
- [65] KERN, P.; SCHWALLER, P.; MICHLER, J. Electrolytic deposition of titania films as interference coatings on biomedical implants: Microstructure, chemistry and nano mechanical properties. *Thin Solid Films*, v. 494, p. 279-286, 2005.
- [66] TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. *Eletroquímica*. São Paulo: Edusp 1988. 225,

- [67] LONG, M.; RACK, H.J. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. *Biomaterials*, v. 19, p. 1621-1639, 1998.
- [68] MACDONALD, D.E. et al. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials*, v. 25, p. 3125-3146, 2004.
- [69] YANG, B. et al. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials*, v. 25, p. 1003-1010, 2004.
- [70] PARK, J.H. et al. Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid. *Mater Letters*, v. 60, p. 2573-2577, 2006.
- [71] RIGO, E.C.S; BOSCHI, A.O; YOSHIMOTO, M. Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Materials Science and Engineering* 24, 647-651, 2004.
- [72] KISHEN, A. et al. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J. Endod.*, v. 34, p.1515-1520, 2008.
- [73] SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B.; Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* v. 275, p. 177-182, 2004.
- [74] KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 3,; p. 95-101, 2007.
- [75] TAY, F.R. et al. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J. Endod.*, v.33, p. 1347-1351, 2007.