



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

REVISIÓN SISTEMÁTICA DEL EFECTO
ANTIBACTERIANO DE LAS
NANOPARTÍCULAS DE PLATA
INCORPORADOS EN CEMENTOS
SELLADORES PARA USO
ENDODÓNTICO

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA
OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN
ESTOMATOLOGÍA

VICTOR MIGUEL BERMUDEZ AZAÑA

LIMA-PERÚ
2023

ASESOR

Mg. Esp. César Del Castillo López

JURADO DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Presidente: Dr. Carlos Vladimir Espinoza Montes

Vocal: Mg. Leyla Antoinette Delgado Cotrina

Secretario: Mg. Lillie Elizabeth Abanto Silva

DEDICATORIA

A la memoria de mi amado padre, Leopoldo Bermúdez; por sus enseñanzas, su esfuerzo, su motivación y por el infinito amor que siempre me entregó.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi fortaleza y provisión, quién me sostuvo entre sus manos en mis momentos de angustia, gracias mi Señor. A mi Esposa Mónica por su incansable amor y empuje; a mis hijos, Damaris, Mathias y Benjamín, a mi madre Rosa, por ser esa mamá sacrificada y desprendida por sus hijos y nietos, a mis hermanos Gustavo y Katy por su motivación constante. A mis docentes y a la Universidad Peruana Cayetano Heredia por permitirme formar parte de esta hermosa comunidad.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Trabajo de investigación Autofinanciado.

REVISIÓN SISTEMÁTICA DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA INCORPORADOS EN CEMENTOS SELLADORES PARA USO ENDODÓNTICO

INFORME DE ORIGINALIDAD

| | | | |
|---------------------|---------------------|---------------|-------------------------|
| 14% | 12% | 8% | 5% |
| INDICE DE SIMILITUD | FUENTES DE INTERNET | PUBLICACIONES | TRABAJOS DEL ESTUDIANTE |

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante | 2% |
| 2 | repositorio.unesp.br Fuente de Internet | 1% |
| 3 | repositorio.ucm.edu.co Fuente de Internet | 1% |
| 4 | rsdjournal.org Fuente de Internet | 1% |
| 5 | clonerresources.com Fuente de Internet | 1% |
| 6 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 1% |
| 7 | www.gbd.sasd.ibilce.unesp.br Fuente de Internet | 1% |
| 8 | eprints.uanl.mx Fuente de Internet | 1% |

TABLA DE CONTENIDOS

| | Pág. |
|--|------|
| Resumen | |
| Abstract | |
| I. DESARROLLO DE LOS TRABAJOS | 1 |
| 1.1. Docencia universitaria estomatológica: Silabo | 2 |
| 1.2 Análisis crítico de literatura estomatológica | 6 |
| 1.3 Proyecto de investigación en estomatología | 12 |
| II. CONCLUSIONES | 30 |
| III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 31 |
| IV. Anexos | |

RESUMEN

Introducción: La presencia de bacterias dentro del canal radicular antes y después de un tratamiento de conductos es la principal causa de fracaso en endodoncia, es por ello la importancia de buscar el mejor material sellador con la capacidad de eliminar estas bacterias dentro del conducto, este portafolio tratará conceptos, estudios y analizará artículos científicos que ayuden a comprender la importancia de las nanopartículas de plata dentro de la composición de cementos selladores endodónticos para combatir la infección bacteriana. **Desarrollo temático:** Se ha realizado 3 trabajos: un sílabo correspondiente a un curso de educación continua en el área de Endodoncia que tratará temas específicos relacionados a los cementos selladores de uso endodóntico, así como la naturaleza y propiedades antibacterianas de las nanopartículas de plata. Se ha realizado también una revisión de literatura, donde se ha evaluado la calidad del reporte escrito y metodológica de un estudio de tipo In vitro relacionado al eje temático del portafolio, y por último se ha realizado un proyecto de investigación de tipo revisión sistemática. **Conclusiones:** El presente silabo nos permitirá conocer más en profundidad a los cementos selladores, así como las propiedades antibacterianas que otorga la adición de nanopartículas de plata a su composición. El análisis crítico de literatura del presente artículo evidencia falencias metodológicas, pero establece de manera clara el problema, así como la resolución del objetivo principal, además, constituye un gran aporte a la línea de investigación de biomateriales para uso endodóntico. Con este proyecto de investigación se quiere establecer pautas clínicas al momento de elegir un biomaterial para sellado endodóntico, como resultado de una exhaustiva revisión de la literatura científica relacionada específicamente en este tema.

Palabras clave: silicato de calcio, nano partículas, plata, endodoncia

ABSTRACT

Introduction: The presence of bacteria inside the root canal before and after root canal treatment is the main cause of failure in endodontics, which is why it is important to look for the best sealing material with the ability to eliminate these bacteria inside the canal. portfolio will discuss concepts, studies and analyze scientific articles that help understand the importance of silver nanoparticles within the composition of endodontic sealing cements to combat bacterial infection.

Thematic development: 3 works have been carried out: a syllabus corresponding to a continuing education course in the area of Endodontics that will address specific topics related to sealing cements for endodontic use, as well as the nature and antibacterial properties of silver nanoparticles. A Literature Review has also been carried out, where the quality of the written and methodological report of an In vitro type study related to the thematic axis of the portfolio has been evaluated, and finally a systematic review type research project has been carried out.

Conclusions: This syllable will allow us to learn more about sealing cements, as well as the antibacterial properties provided by the addition of silver nanoparticles to their composition. The critical analysis of literature in this article shows methodological flaws, but clearly establishes the problem, as well as the resolution of the main objective, and also constitutes a great contribution to the line of research into biomaterials for endodontic use. This research project aims to establish clinical guidelines when choosing a biomaterial for endodontic sealing, as a result of an exhaustive review of the scientific literature specifically related to this topic.

Keywords: Calcium silicate, nanoparticles, silver, endodontics.

I. DESARROLLO DE LOS TRABAJOS

En este trabajo de investigación se ha elaborado un sílabo correspondiente a un curso de educación continua en el área de Endodoncia, que abarca los temas relacionados al origen, evolución y clasificación de los cementos selladores, así como la causa principal del fracaso en el tratamiento de conductos, a su vez se ha incluido como parte de este curso, el estudio de las nanopartículas y en especial, el análisis de la propiedad antibacteriana que poseen como parte estructural de un cemento sellador.

El segundo producto de este trabajo es un análisis crítico de literatura estomatológica, donde el artículo base tuvo como tema principal el estudio de las propiedades fisicoquímicas, así como la capacidad antibacteriana de los cementos de silicato de calcio que han sido tratados con agregado nanoparticulado de hidroxiapatita. Se analizó la calidad del reporte escrito CRIS, así como la calidad metodológica AXIS para estudios de tipo in vitro.

Finalmente se elaboró un proyecto de investigación de tipo revisión sistemática, de donde se busca obtener evidencia científica de calidad que apoye la hipótesis de que el agregado nanoparticulado de plata en cementos selladores de tipo endodóntico favorecen las propiedades antibacterianas de estos cementos.

1.1. Docencia universitaria estomatológica: Silabo

| |
|--|
| FACULTAD DE MEDICINA, DE ESTOMATOLOGÍA Y ENFERMERIA |
| FACULTAD DE ESTOMATOLOGIA |
| UNIDAD DE POSGRADO Y ESPECIALIZACIÓN |
| EDUCACION CONTINUA |

I. DATOS GENERALES

| | | | |
|------|--------------------|---|---|
| 1.1 | Nombre del curso | : | Avances en biomateriales endodónticos: nanopartículas en cementos selladores y su efecto antibacteriano |
| 1.2 | Dirigido a | : | Cirujanos y dentistas especialistas |
| 1.3 | Organizado por | : | Unidad de posgrado y especialización |
| 1.4 | Semestre académico | : | 2023-II |
| 1.5 | Tipo de asignatura | : | Curso de actualización |
| 1.6 | Prerrequisito | : | Ninguno |
| 1.7 | Modalidad | : | A distancia |
| 1.8 | Créditos | : | 2 créditos |
| 1.9 | Duración: | : | 32 horas |
| 1.10 | Coordinador | : | C.D. Víctor Bermúdez A. |

II. SUMILLA

El curso permite que el alumno sea capaz de elegir la mejor alternativa terapéutica para casos de retratamiento endodóntico o donde una infección persistente comprometa el éxito del tratamiento de conductos, a partir de un conocimiento amplio de la microbiología radicular y de los biomateriales más usados actualmente, haciendo énfasis principalmente al uso de nanopartículas antibacterianas añadidas a cementos selladores endodónticos, partiendo de un análisis exhaustivo de la literatura actual y casos clínicos.

III. RESULTADOS DE APRENDIZAJE

Al término del curso el estudiante será capaz de:

- 1. Describir los distintos tipos de cementos selladores endodónticos reconociendo sus desventajas frente a infecciones endodónticas que llevan al fracaso.
- 2. Elegir la mejor opción terapéutica frente a una situación clínica específica.

IV. CONTENIDOS

UNIDAD DIDÁCTICA 1: CEMENTOS SELLADORES ENDODÓNTICOS

Origen y evolución de los cementos selladores
Clasificación de los cementos selladores endodónticos
Fracaso en endodoncia

UNIDAD DIDÁCTICA 2: NANOPARTÍCULAS EN CEMENTOS SELLADORES

Clasificación de nanopartículas
Capacidad antibacteriana
Cementos con agregado de nanopartículas

V. ESTRATEGIAS DIDÁCTICAS

El curso se dictará en base a:

Clase magistral

Estará a cargo del docente responsable del curso, donde se presentará de manera secuencial el contenido actualizado y detallado sobre el tema en desarrollo. Se llevará a cabo usando medios audiovisuales en una exposición donde se buscará la interacción con los participantes.

Taller

Estará a cargo del docente del curso, en donde los alumnos serán divididos en grupos con la finalidad de discutir e intercambiar ideas sobre aspectos vinculados con las recientes investigaciones en el campo de las nanopartículas en cementos selladores endodónticos.

VI. EVALUACIÓN

Al finalizar el curso, a través de una ponderación entre las notas de una evaluación escrita sumativa final y de la discusión sobre los artículos estudiados en el taller, se calificará al estudiante según el cuadro de ponderación siguiente:

| Aspectos a evaluar | Ponderación |
|--------------------|-------------|
| Examen teórico | 50% |
| Taller | 50% |
| Total | 100% |

1. La nota final del curso se expresará en escala vigesimal, en valores con dos decimales. No hay redondeo a la cifra inmediatamente superior o inferior.
 2. La nota mínima aprobatoria del curso es once (11.00).
 3. A los estudiantes que no rindan el examen se les calificará con nota cero (0).
 4. A los estudiantes que no participen del taller se les calificará con nota cero (0).
 5. Los estudiantes tienen hasta 3 días para realizar algún reclamo después de la publicación de las calificaciones ante el responsable del curso.
- La asistencia a las actividades académicas es obligatoria.

VII. CERTIFICACIÓN

Al concluir el curso se entregará el certificado correspondiente a 1.5 créditos académicos. Se considerará al Estudiante como “Habilitado” para recibir el certificado si ha superado el 80% de asistencias al curso.

Además, el estudiante deberá haber aprobado satisfactoriamente el examen del curso con nota mínima de 11.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod.* [Internet]. 2016 Oct;42(10):1417-26. DOI: 10.1016/j.joen.2016.05.021. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27520408
2. Vazquez-Garcia F, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Basso-Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Effect of Silver Nanoparticles on Physicochemical and Antibacterial Properties of Calcium Silicate Cements. *Braz Dent J.* [Internet]. 2016 Sep-Oct;27(5):508-514. DOI: 10.1590/0103-6440201600689. PMID: 27982226
3. Khalil I, Naaman A, Camilleri J. Properties of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod.* [Internet]. 2016;42(10):1529-1535. doi:10.1016/j.joen.2016.06.002
4. Farrugia C, Lung CYK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The Relationship of Surface Characteristics and Antimicrobial Performance of Pulp Capping Materials. *J Endod.* 2018;44(7):1115-1120. DOI 10.1016/j.joen.2018.04.00
5. Song, W., & Ge, S. (2019). Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(6), 1033. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules24061033>
6. Kangarlou, A., Neshandar, R., Matini, N., & Dianat, O. (2016). Antibacterial efficacy of AH Plus and AH26 sealers mixed with amoxicillin, triple antibiotic paste and nanosilver. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 10(4), 220–225. Disponible en: <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.035>
7. Chen L, Yang J, Wang JR, Suh BI. Physical and biological properties of a newly developed calcium silicate-based self-adhesive cement. *Am J Dent.* 2018;31(2):86-90
8. Hamouda IM, Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *Journal of Biomedical Research.* Volume 26, Issue 3, 2012. Pages 143-151, ISSN 1674-8301. Disponible en: <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20120027>.
9. Vimbela, G. V., Ngo, S. M., Frazee, C., Yang, L., & Stout, D. A. (2017). Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *International journal of nanomedicine*, 12, 3941–3965. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/IJN.S134526>
10. Dorileo MC, Villa RD, Guedes OA, Aranha AM, Semenoff-Segundo Bandeca MC, Borges AH. Comparative Analysis of Selected Physicochemical Properties of Pozzolan Portland and MTA-Based Cements. *Int Sch Res Notices.* 2014 Aug 12;2014:831908.
11. Khan S1, Kaleem M, Fareed MA, Habib A, Iqbal K, Aslam A, Ud Din S. Chemical and morphological characteristics of mineral trioxide aggregate and Portland cements. *Dent Mater J.* 2016;35(1):112-7. Zanjani VA, Tabari K, Sheikh-Al-Eslamian SM, Abrandabadi AN. Physicochemical Properties of Experimental Nano-hybrid MTA. *J Med Life.* 2018 Jan-Mar;11(1):51-56. Torabinejad J, White DJ, Tooth filling material and method of Use. WIPO Patent Publication WO 94/ 24955. November 1994.
12. Tanomaru, Juliane & Vázquez García, Fernando & Bosso Martelo, Roberta & Bernardi, M. & Faria, Gisele & FILHO, Mario. (2016). Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physico-chemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements. *Journal of Applied Oral Science.* 24. 204-210. DOI 10.1590/1678-775720150422.

VIII. PROFESOR DEL CURSO

| Grado o Título | Nombre | Apellidos | Correo electrónico | Departamento Académico |
|----------------|---------------|----------------|-----------------------------|------------------------|
| C.D. | Víctor Miguel | Bermúdez Azaña | victor.bermudez@upch. pe | DACE |

IX. PROGRAMACIÓN DE ACTIVIDADES

| FECHA | CONTENIDOS | METODOLOGÍA | PROFESOR |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------|
| 02 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Origen, evolución y clasificación de los cementos endodónticos | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 06 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Cementos a base de Óxido de Zinc e hidróxido de calcio | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 09 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Cementos a base de Resina Epóxica | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 13 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Cementos a base de Silicatos de calcio | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 16 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Fracaso en endodoncia | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 20 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Nanopartículas, clasificación y propiedades | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 23 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Capacidad antibacteriana de las nanopartículas | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 27 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Cementos con agregado de nanopartículas | Clase magistral Modalidad virtual | Víctor Bermúdez Azaña |
| 30 octubre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Taller: análisis, exposición y discusión de artículos | Taller | Víctor Bermúdez Azaña |
| 03 noviembre 19:00 – 22:00 | <ul style="list-style-type: none"> Taller: análisis, exposición y discusión de artículos | Taller | Víctor Bermúdez Azaña |
| 06 noviembre 19:00 – 21:00 | <ul style="list-style-type: none"> EXAMEN FINAL (formato de Google /plataforma EVA) | EVALUACIÓN SUMATIVA | Víctor Bermúdez Azaña |

1.2. Análisis crítico de literatura estomatológica

1.2.1. Información general

| Información | Descripción |
|--------------------|--|
| Título | Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physicochemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements. |
| Autores | Guerreiro-Tanomaru J, Vasquez-Garcia F, Bosso-Martelo R, Bernardi M, Faria G, Tanomaru-Filho M. |
| Revista | Journal of Applied Oral Science |
| Año de publicación | 2016 |
| País | Brasil |
| Tipo de estudio | In vitro |
| Objetivo | Evaluar las propiedades físico-químicas, mecánicas y antibacterianas del MTA asociado óxido de zirconio (ZrO ₂) y nanopartículas de hidroxiapatita. |
| Metodología | <p>Se realizaron 4 grupos de biomateriales a estudiar: 1) MTA blanco, 2) Cemento Portland 70% + óxido de zirconio 30%, 3) Cemento portland 60% + óxido de zirconio 30% + nano hidroxiapatita 10%, 4) Cemento portland 50% + óxido de zirconio 30% + nano hidroxiapatita 20%.</p> <p>Se evaluó el pH, con un ph-metro digital, la solubilidad mediante pérdida de masa, el tiempo de fraguado, usando agujas de Gilmore, la resistencia a la compresión, mediante prueba mecánica, la radiopacidad, mediante el uso de láminas de aluminio milimetradas y el efecto antibacteriano, que se realizó mediante el conteo de UFC después de estar en contacto directo con <i>E. Faecalis</i>.</p> |
| Resultados | No se encontró diferencia significativa en los niveles de pH entre los grupos de estudio, la más alta solubilidad se presentó en el grupo 3 y grupo 4, con respecto al tiempo de fraguado el MTA blanco presentó el tiempo de fraguado más rápido. Todos los grupos de estudio presentaron una radiopacidad comparable a 3mm de aluminio. Con respecto a la resistencia a la compresión los grupos 1 y 2 presentaron mayores niveles de resistencia, por último, ningún grupo de estudio pudo eliminar el 100% de las bacterias, pero quien presentó mejores niveles antibacterianos fueron el grupo 4, seguido del grupo 1 y el grupo 2, después de dos días. |
| Conclusiones | La adición de nanohidroxiapatita al cemento portland asociado a óxido de zirconio perjudicó los niveles de resistencia a la compresión y a la solubilidad, por otro lado, la nanohidroxiapatita no modificó los niveles de pH ni el tiempo de fraguado inicial, mejoró la radiopacidad en el grupo 3, el tiempo de fraguado final y la actividad antibacteriana sobre <i>E. faecalis</i> . |

1.2.2. Calidad del reporte escrito: CRIS para estudios in vitro

| Secciones | Ítem | Recomendación | Descripción | Página |
|--------------------------|------|--|---|---------|
| Título y resumen | | | | |
| Título y resumen | 1a | Identifica en el título que es un estudio in vitro/laboratorio. | No, en ninguna parte del título, ni mucho menos en el resumen se menciona que se trata de un estudio in vitro/laboratorio. | 204 |
| | 1b | Resumen estructurado del diseño, métodos, resultados y conclusiones. | Sí, los grupos de estudio se definen claramente, así como lo que se evalúa, los resultados y conclusiones. | 204 |
| Introducción | | | | |
| Antecedentes y objetivos | 2a | Antecedentes científicos y explicación de los motivos del estudio | Sí, presenta algunos antecedentes científicos de manera incompleta y no fundamenta la razón del estudio. | 204-205 |
| | 2b | Objetivos específicos o hipótesis | Sí, menciona el objetivo general del estudio, pero no menciona los específicos. En cuanto a la hipótesis, si formula una hipótesis nula. | 204-205 |
| Métodos | | | | |
| Intervenciones | 3 | La intervención para cada grupo, incluyendo cómo y cuándo se administraron realmente, tienen suficiente detalle para permitir su reproducción. | Sí, lo documentado en el artículo es suficiente para poder reproducir nuevamente el trabajo. | 205-207 |
| Resultados (outcomes) | 4 | Medidas de resultado primarias y secundarias completamente definidas, incluyendo cómo y cuándo fueron evaluadas. | Sí, se detallan explícita y coherentemente los resultados, así también los momentos de su evaluación. | 205-208 |
| Tamaño muestral | 5 | Explica cómo se determinó el tamaño muestral. | Sí, establece el tamaño muestral para cada grupo y para cada tipo de variable a analizar, referenciando al autor y/o describiendo la norma ISO correspondiente. | 205-207 |
| Randomización: | | | | |

| | | | | |
|--|-----|--|--|---------|
| Generación de la secuencia | 6 | Menciona el método utilizado para generar la secuencia de asignación aleatoria. | No, no se describe en el documento la secuencia o el criterio de selección de especímenes. | 205-207 |
| Mecanismo de ocultación de la asignación | 7 | Indica el mecanismo usado para implementar la secuencia de asignación aleatoria (como contenedores numerados secuencialmente), descripción de las medidas adoptadas para ocultar la secuencia hasta la asignación de las intervenciones. | No, carece de información con respecto a la asignación aleatoria de contenedores y no existe secuencia alguna para ocultar asignaciones. | 205-207 |
| Implementación | 8 | Determina quién generó la secuencia de asignación aleatoria, quién enroló las muestras y quién las asignó a la intervención. | No, no existe secuencia de asignación respectiva. | 205-207 |
| Cegamiento | 9 | En caso sea afirmativo, ¿indica a quién se cegó tras la asignación a las intervenciones (por ejemplo, a los profesionales sanitarios, a los que evalúan los resultados) y cómo se hizo? | No se realizó ningún tipo de cegado. | 205-208 |
| Métodos estadísticos | 10 | Menciona los métodos estadísticos usados para comparar los grupos para resultados primarios y secundarios | Sí, se realizó ANOVA para la evaluación de los grupos y el Test de comparación de Tukey para la evaluación intragrupo, con un 5% de significancia. | 207 |
| Resultados | | | | |
| Especímenes analizados | 11a | Indica el número de especímenes incluidos en cada grupo de análisis. | No, no se observa en el documento el número final de especímenes analizados. | 207-208 |
| Resultados y estimación | 11b | Describe los resultados primarios y secundarios, de cada grupo, y la magnitud estimada del efecto y su precisión (como el intervalo de confianza del 95%, valor de p, etc.) | Sí, se establecen resultados para cada grupo y se encuentra el intervalo correspondiente de confianza. | 207-208 |
| Discusión | | | | |
| Limitaciones | 12a | Establece las limitaciones, abordando las fuentes de posibles sesgos, imprecisiones y, si procede, multiplicidad de análisis. | No, no establece limitaciones ni contempla sesgos. | 208-209 |
| Generalización | 12b | Indicar la generalización (validez externa, aplicabilidad) de los resultados. | No, estos grupos son experimentales, no se encuentran en el mercado de la misma forma. | 204-205 |

| | | | | |
|-------------------------|-----|---|---|---------|
| Interpretación | 12c | Interpretación coherente con los resultados, sopesando los beneficios y los perjuicios, y teniendo en cuenta otras pruebas pertinentes. | Sí, presenta los resultados de manera coherente, correlacionada con antecedentes adecuados. | 208-209 |
| Otra información | | | | |
| Protocolo | 24 | Indica dónde puede consultarse el protocolo completo, si está disponible | No, no menciona el protocolo ni se referencia o anexa. | |
| Financiamiento | 25 | Menciona las fuentes de financiamiento y otras ayudas (como suministros), papel de los financiadores | Sí, detalla al final del documento que está financiado por la Fundación de Sao Paulo para la investigación. | 209 |

1.2.3. Calidad metodológica del estudio: AXIS adaptada para estudios in vitro

| Introducción | Sí | No | No sé | ¿Por qué? | Página |
|---|----|----|-------|---|---------|
| 1. ¿Fueron los objetivos del estudio claros? | X | | | Establece con claridad el objetivo general pero no los específicos. | 204-205 |
| Métodos | | | | | |
| 2. ¿Fue el estudio diseñado apropiadamente para los objetivos propuestos? | X | | | El diseño de tipo In vitro es el adecuado para este trabajo, ya que se pueden controlar las variables y se adaptan mejor los grupos de estudio para este fin. | 205-207 |
| 3. ¿Fue el tamaño de muestra justificado? | | | X | El tamaño de muestra fue referenciado de otro estudio, pero no se detalló cómo fue determinado para esta investigación. | 205-207 |
| 4. ¿Fueron los especímenes tomados de una población de base apropiada? | | X | | No se realizó una correcta elección de especímenes, ya que todos fueron considerados para el estudio. | 205-207 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---------|
| 5. ¿Fue el proceso de selección de especímenes congruente con la población de investigación? | | X | | La selección de los especímenes no siguió algún criterio de elegibilidad. | 205-207 |
| 6. ¿Se midieron adecuadamente los resultados de acuerdo con los objetivos del estudio? | X | | | Los objetivos del estudio si guardaron correspondencia con los resultados expuestos en el estudio. | 205-207 |
| 7. ¿Se midieron correctamente los resultados con el uso de instrumentos o medidas que hayan sido experimentadas, probadas o publicadas previamente? | | | X | Se midió correctamente los resultados, pero no se detalla que los instrumentos hayan pasado algún proceso de calibración previo. | 205-207 |
| 8. ¿Está claro que se usó para determinar significancia estadística, estimadores de precisión, o ambos? (por ejemplo: valores p, intervalos de confianza) | X | | | Se establece la significancia estadística y el intervalo de confianza de 95%. | 205-207 |
| 9. ¿Fueron los métodos (incluye métodos estadísticos) suficientemente descritos para permitir que estos sean repetidos? | X | | | La metodología utilizada está suficientemente descrita como para poder replicar el estudio nuevamente. | 205-207 |
| Resultados | | | | | |
| 10. ¿Fueron descritos adecuadamente los datos básicos? | X | | | Fueron claros y ordenados, las tablas para cada una de los grupos presentan los resultados coherentes y comprensibles. | 207-208 |
| 11. ¿Si es apropiado, la información de los individuos con no respuesta fue descrita? | | X | | No aplica | 207-208 |
| 12. ¿Fueron los resultados consistentes internamente? | | | X | Los resultados son coherentes con el objetivo planteado en el estudio, los instrumentos de medición fueron los correctos, aunque no se detalla ningún proceso de calibración. | 207-208 |
| 13. ¿Fueron presentados los resultados según lo descrito en la metodología? | X | | | Los resultados se presentaron de manera | 205-208 |

| | | | | | |
|---|---|---|--|---|---------|
| | | | | clara y ordenada con relación a las descritas en la metodología. | |
| Discusión | | | | | |
| 14. ¿Fueron las discusiones y conclusiones de los autores justificadas por los resultados? | X | | | Los estudios previos respaldan a priori la hipótesis formulada que fue corroborada con los resultados obtenidos | 208-209 |
| 15. ¿Fueron discutidas las limitaciones del estudio? | | X | | No se menciona en el documento. | 207-208 |
| Otros | | | | | |
| 16. ¿Existieron algunas fuentes de financiación o conflictos de interés que puedan afectar la interpretación de los resultados por los autores? | X | | | La fuente de financiamiento tiene su origen en la Fundación de Sao Paulo para la Investigación | 209 |
| 17. ¿Se obtuvo aprobación ética o consentimiento de los participantes? | | X | | No se contempla en el documento. | 209 |

1.2.4 BIBLIOGRAFÍA

1. Tanomaru, Juliane & Vázquez García, Fernando & Bosso Martelo, Roberta & Bernardi, M. & Faria, Gisele & FILHO, Mario. (2016). Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physico-chemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements. *Journal of Applied Oral Science*. 24. 204-210. DOI 10.1590/1678-775720150422.

1.3. Proyecto de investigación en estomatología

TÍTULO

Revisión sistemática del efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata incorporados en cementos selladores para uso endodóntico

RESUMEN

Antecedentes: La capacidad antibacteriana de un cemento sellador para uso endodóntico es una propiedad fundamental para inhibir el crecimiento bacteriano y asegurar el éxito del tratamiento, durante muchos años se ha intentado encontrar el mejor componente que garantice este resultado, actualmente las nanopartículas de plata han demostrado tener una capacidad antibacteriana esperanzadora y se ha reportado sus resultados en diversos estudios a nivel mundial. **Objetivo:** Recopilar el conocimiento científico actual disponible del poder antibacteriano de los cementos de uso endodóntico con agregado nano particulado de plata. **Material y métodos:** El presente estudio analiza la literatura científica registrada hasta la actualidad siguiendo el criterio de elegibilidad determinado según PICO, que responda a la pregunta ¿Qué efecto antibacteriano tienen los agentes nano particulados incorporados en los cementos de silicatos de calcio (MTA) de uso endodóntico?

Palabras clave: silicato de calcio, nano partículas, plata, endodoncia

INTRODUCCIÓN

Las bacterias que aun después del tratamiento endodóntico perduran dentro del conducto, o que lo vuelven a colonizar, son la principal causa de los fracasos endodónticos que se reportan. Las infecciones primarias están constituidas por grupos bacterianos variados, en donde predominan bacterias anaerobias estrictas, como bacilos anaerobios gramnegativos, cocos anaerobios Gram positivos, bacilos anaerobios Gram positivos y facultativos, especies de lactobacilos y algunas especies de *Streptococos* facultativos Gram positivos (1). En las últimas cuatro décadas se ha intentado luchar contra este factor siendo infructífera la tarea. La preparación biomecánica, así como el uso de irrigantes han colaborado sustancialmente a limitar o retrasar esta primera infección del conducto radicular, pero existen grupos bacterianos persistentes tales como *Streptococos* no mutans, enterococos y los lactobacilos (2). Frente a esta realidad, se ha puesto la mirada en el cemento sellador, en donde se han realizado una variedad de investigaciones con el fin de mejorar las propiedades antimicrobianas de los mismos, haciendo algunas modificaciones en su composición y estructura (3).

Se han desarrollado cementos selladores experimentales con agregados particulados que le han conferido mejoras en sus propiedades fisicoquímicas o de radiopacidad (4, 5), pero es el campo de la nanotecnología lo que más ha despertado el interés de los investigadores por desarrollar sistemas de obturación con agregados nanoparticulados que le otorguen una capacidad antibacteriana mejor que los cementos convencionales (2). Estas Nanopartículas (NP) tienen dimensiones que

van de 1 a 1000 nm, aunque generalmente poseen de 5 a 350 nm de diámetro, y potencian positivamente las propiedades fisicoquímicas de los cementos, al tener un tamaño de partícula extremadamente pequeño que aumenta la superficie en relación a la masa del cemento y le brinda mayor reactividad química (1, 6).

Dentro de las nanopartículas metálicas más usadas para este fin podemos encontrar a la plata (AgNP), y aunque este compuesto puede llegar a ser tóxico cuando es aplicado en concentraciones elevadas, está ampliamente comprobada su efectividad en biomedicina. Su capacidad antibacteriana ha sido probada y su mecanismo de acción radica en su acción múltiple a partir de la interacción con los grupos Sulfhidrilo de las proteínas y el ADN bacteriano, en donde altera los enlaces de hidrógeno, desenrolla el ADN interfiriendo con la síntesis y división celular de la pared bacteriana. Son las nanopartículas de plata las que más desestabilizan la membrana bacteriana aumentando su permeabilidad, lo que se traduce en la fuga de sus componentes celulares. Hirashi y col. Investigaron la capacidad antibacteriana de AgNp en Fluoruro de Diamina contra biopelículas de *Enterococos faecalis* obteniendo como resultado la eliminación completa de biopelículas jóvenes después de 1 hora de interacción, además se comprobó que las partículas del Fluoruro de Diamina de Plata al 3.8% penetraron hasta 40 um por los túbulos dentinarios. Resultados como estos han servido de empuje a una gran variedad de investigadores quienes han aplicado la nanotecnología y en particular las nanopartículas de plata en conjunto a los cementos selladores actuales para lograr un tratamiento de conductos más eficaz en cuanto a las capacidades antibacterianas de estos cementos (1, 2,7 -10).

Es por este motivo que en esta revisión se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Las nanopartículas de plata en cementos selladores de endodoncia reducen la actividad bacteriana en comparación a los cementos tradicionales sin uso de nanopartículas?

OBJETIVO

Analizar el efecto antibacteriano de las AgNP incorporados en cementos selladores para uso endodóntico según la evidencia científica disponible

PROCESOS DE BUSQUEDA DE INFORMACION

Tipo de estudio

Revisión sistemática

Estrategia de búsqueda

La revisión se realizará mediante estudios experimentales in vitro que describen o comparan el potencial antibacteriano de las nanopartículas de plata usados en cementos de sellado endodóntico.

La búsqueda de literatura se realizará en la base de datos electrónica de PubMed, considerando a los estudios que tengan no más de diez años de haber sido

publicadas. Además, se realizará una búsqueda manual en revistas científicas de acceso virtual que presenten mayor factor de impacto según SCImago Journal Rank del año 2022. Se aplicarán los filtros en los campos indicados Dentistry, All subject categories, All regions/countries, Journals, año 2022. Teniendo como resultado la lista de las revistas con su respectivo factor de impacto, seleccionamos aquellas que están relacionadas con el tema tratado, en orden descendente, seleccionando:

1. International Journal of Oral Science (SJR: 2.603; Q1)
2. Journal of Dental Research (SJR:1.872; Q1)
3. International Endodontic Journal (SJR: 1.506; Q1)
4. Journal of Endodontics (SJR: 1.399; Q1)
5. Dental Materials (SJR:1.283; Q1).

Se emplearán términos MeSH como por ejemplo: silicate cement, metal nanoparticles, antibacterial agents, antimicrobial agents, para la búsqueda correspondiente.

Criterios de selección

Criterios de inclusión: Artículos originales de tipo experimental in vitro con un máximo de 10 años de antigüedad.

Criterios de exclusión: Se excluirán revisiones narrativas, reportes de caso, y estudios originales con humanos.

Pregunta de investigación

Para esta revisión, se aplicará la pregunta PICO de elegibilidad:

Población (P): Cementos selladores usados en endodoncia

Intervención (I): Cementos con nanopartículas de plata

Comparación (C): Cementos sin nanopartículas de plata

Resultados (O): Actividad antibacteriana medida vía inhibición de crecimiento in vitro

Procedimiento de búsqueda

Se establecerán de acuerdo con los parámetros de la pregunta PICO y los términos MeSH la realización de la búsqueda de la literatura en la base de datos de LILACS, Scielo, PubMed, Scielo, Scopus, Web of Science y Embase usando las estrategias de búsqueda correspondientes (Anexo 1), desde 2013 hasta setiembre de 2023.

Selección de estudios y extracción de datos

Dos revisores (VM, EAC) realizarán una prueba piloto de calibración siguiendo el procedimiento de correlación de Kappa, que debe ser mayor a 0.60, que determina una concordancia adecuada(11). La selección y extracción de datos se realizará de forma independiente. Luego de excluir los estudios repetidos entre las distintas bases de datos, se evaluarán los títulos y resúmenes. Luego, los artículos serán analizados a texto completo para su inclusión final. Si existiera algún desacuerdo

entre los revisores, la inclusión será decidida por otro autor como gold estándar (LD). Además, se registrarán los artículos eliminados con su respectivo motivo (Anexo 2). Luego, se recogerán los siguientes datos de los estudios finales: Autores y año del estudio (como referencia), diseño del estudio, características de la muestra, tipo de cemento nanoparticulado y control (si está disponible), bacteria o biopelícula intervenida, efecto antibacteriano, conclusiones y origen de financiamiento (si está disponible). Los desacuerdos se absolverán por medio una discusión, y al final toda la información recopilada será analizada por dos autores (RV, EAC) para asegurar la extracción de toda la información importante.

Medidas de resultados

Para evaluar el efecto antibacteriano de los agentes nanoparticulados en los cementos de endodoncia, la medida de resultado primaria será la inhibición del crecimiento bacteriano por medio de cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) restantes.

Riesgo de sesgo

El riesgo de sesgo será evaluado independientemente y por duplicado por (VB, EAC), previamente calibrados en rondas de evaluación observadas por un tercer investigador como gold estándar (RV). Las diferencias se resolverán mediante discusión. Los estudios se evaluarán utilizando una versión modificada de la hoja de puntuación del Nature Publication Quality Improvement Project

(NPQIP)(Anexo 3).

Consideraciones éticas

Por tratarse de un estudio de tipo revisión sistemática se solicitará la aprobación de la Dirección Universitaria de Asuntos Regulatorios de la investigación (DUARI).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod.* 2016 Oct;42(10):1417-26. doi: 10.1016/j.joen.2016.05.021.
2. Vazquez-Garcia F, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Basso-Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Effect of Silver Nanoparticles on Physicochemical and Antibacterial Properties of Calcium Silicate Cements. *Braz Dent J.* 2016 Sep-Oct;27(5):508-514. doi: 10.1590/0103-6440201600689.
3. Khalil I, Naaman A, Camilleri J. Properties of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod.* 2016;42(10):1529-1535. doi:10.1016/j.joen.2016.06.002
4. Farrugia C, Lung CYK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The Relationship of Surface Characteristics and Antimicrobial Performance of Pulp Capping Materials. *J Endod.* 2018;44(7):1115-1120. doi:10.1016/j.joen.2018.04.00
5. Song, W., & Ge, S. (2019). Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(6), 1033. <https://doi.org/10.3390/molecules24061033>

6. Kangarlou, A., Neshandar, R., Matini, N., & Dianat, O. (2016). Antibacterial efficacy of AH Plus and AH26 sealers mixed with amoxicillin, triple antibiotic paste and nanosilver. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 10(4), 220–225. Disponible en: <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.035>
7. Chen L, Yang J, Wang JR, Suh BI. Physical and biological properties of a newly developed calcium silicate-based self-adhesive cement. *Am J Dent*. 2018;31(2):86-90
8. Hamouda IM, Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *Journal of Biomedical Research*. Volume 26, Issue 3, 2012. Pages 143-151, ISSN 1674-8301. Disponible en: <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20120027>.
9. Vimbela, G. V., Ngo, S. M., Frazee, C., Yang, L., & Stout, D. A. (2017). Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *International journal of nanomedicine*, 12, 3941–3965. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/IJN.S134526>
10. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097.
11. Orwin, R.G. Evaluating coding decisions. En H.M. Cooper y L.V. Hedges (Dirs.): *The handbook of research síntesis*. 1994 (pp. 134-172). Nueva York: Sage.

PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA

Presupuesto:

| | | | |
|-------|-------------------------|--------|-------|
| 1. | Ordenador portátil | 02 und | 10000 |
| 2. | Materiales de impresión | | 100 |
| <hr/> | | | |
| 3. | Total | | 10100 |

Cronograma

| Actividades | octubre 2023 | Noviembre 2023 | diciembre 2023 | enero 2023 | febrero 2023 | marzo 2023 |
|----------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------------|-----------------|---------------|
| Presentación del protocolo | X | | | | | |
| Aceptación del protocolo | X | | | | | |
| Recojo de datos | | X | | | | |
| Procesamiento de datos | | | X | | | |
| Análisis de los resultados | | | | X | | |
| Informe final | | | | | X | |
| Presentación de resultados | | | | | | X |

ANEXOS

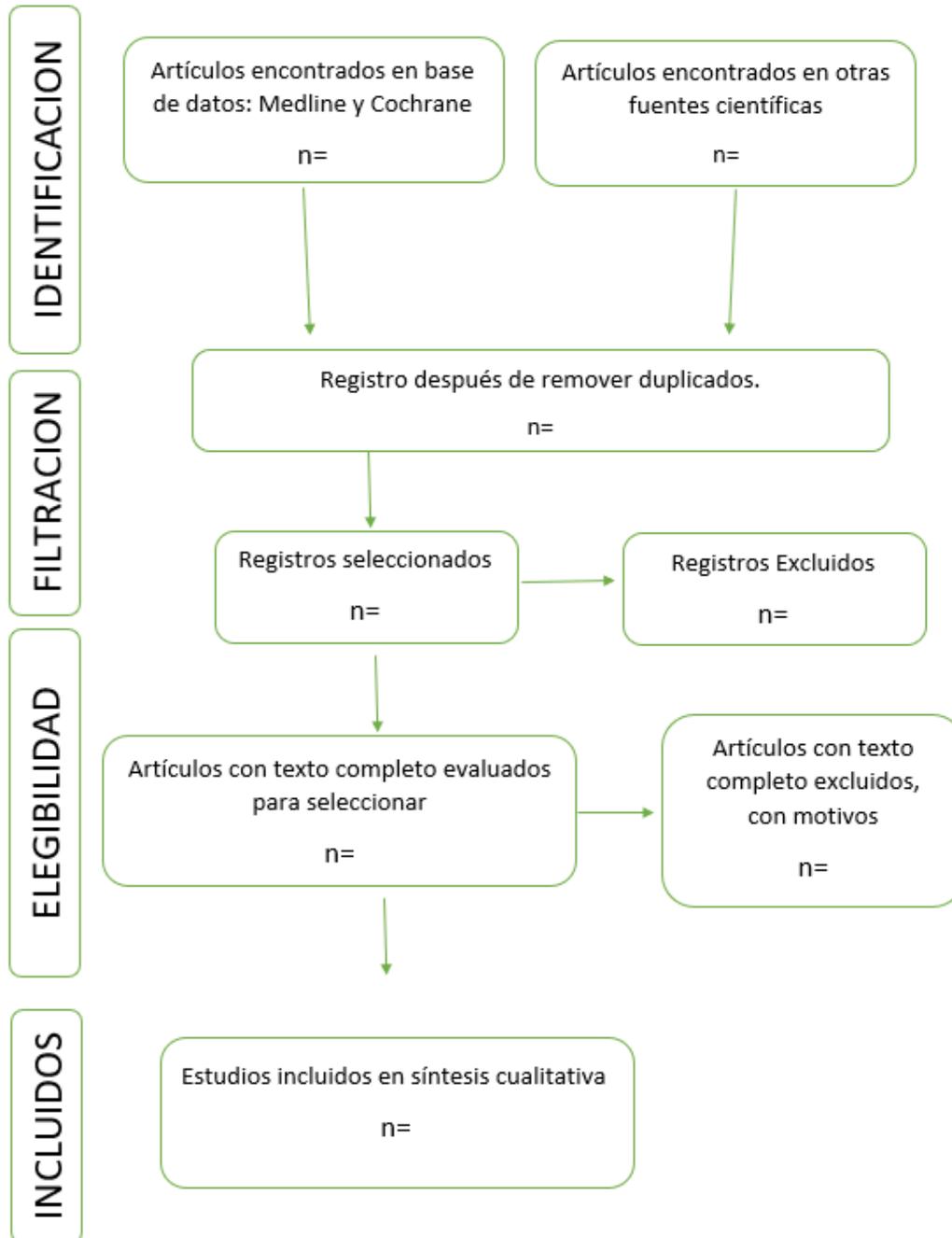
Anexo 1. Estrategia de búsqueda

((("sealant"[All Fields] OR "sealant s"[All Fields] OR "sealants"[All Fields]) AND ("cement s"[All Fields] OR "cementable"[All Fields] OR "cementation"[MeSH Terms] OR "cementation"[All Fields] OR "cementations"[All Fields] OR "cementing"[All Fields] OR "dental cementum"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cementum"[All Fields]) OR "dental cementum"[All Fields] OR "cement"[All Fields] OR "dental cements"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cements"[All Fields]) OR "dental cements"[All Fields] OR "cemented"[All Fields] OR "cements"[All Fields])) OR "bioroot"[All Fields] OR ("tricalcium silicate"[Supplementary Concept] OR "tricalcium silicate"[All Fields] OR "biodentine"[All Fields]) OR "mta"[All Fields] OR "endoroot"[All Fields] OR ("silicate cement"[MeSH Terms] OR ("silicate"[All Fields] AND "cement"[All Fields]) OR "silicate cement"[All Fields]) OR "iroot"[All Fields] OR ("tricalcium"[All Fields] AND ("cement s"[All Fields] OR "cementable"[All Fields] OR "cementation"[MeSH Terms] OR "cementation"[All Fields] OR "cementations"[All Fields] OR "cementing"[All Fields] OR "dental cementum"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cementum"[All Fields]) OR "dental cementum"[All Fields] OR "cement"[All Fields] OR "dental cements"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cements"[All Fields]) OR "dental cements"[All Fields] OR "cemented"[All Fields] OR "cements"[All Fields])) OR (("endodontal"[All Fields] OR "endodontic"[All Fields] OR "endodontical"[All Fields] OR "endodontically"[All Fields] OR

"endodontics"[MeSH Terms] OR "endodontics"[All Fields]) AND ("cement s"[All Fields] OR "cementable"[All Fields] OR "cementation"[MeSH Terms] OR "cementation"[All Fields] OR "cementations"[All Fields] OR "cementing"[All Fields] OR "dental cementum"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cementum"[All Fields]) OR "dental cementum"[All Fields] OR "cement"[All Fields] OR "dental cements"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cements"[All Fields]) OR "dental cements"[All Fields] OR "cemented"[All Fields] OR "cements"[All Fields])) OR (("plant roots"[MeSH Terms] OR ("plant"[All Fields] AND "roots"[All Fields]) OR "plant roots"[All Fields] OR "root"[All Fields]) AND ("cement s"[All Fields] OR "cementable"[All Fields] OR "cementation"[MeSH Terms] OR "cementation"[All Fields] OR "cementations"[All Fields] OR "cementing"[All Fields] OR "dental cementum"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cementum"[All Fields]) OR "dental cementum"[All Fields] OR "cement"[All Fields] OR "dental cements"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cements"[All Fields]) OR "dental cements"[All Fields] OR "cemented"[All Fields] OR "cements"[All Fields])) AND (((("silver"[MeSH Terms] OR "silver"[All Fields] OR "silvers"[All Fields] OR "silvered"[All Fields]) AND ("nanoparticle s"[All Fields] OR "nanoparticles"[MeSH Terms] OR "nanoparticles"[All Fields] OR "nanoparticle"[All Fields])) OR ("particle"[All Fields] OR "particle s"[All Fields] OR "particles"[All Fields]) OR ("nanoparticle s"[All Fields] OR "nanoparticles"[MeSH Terms] OR "nanoparticles"[All Fields] OR "nanoparticle"[All Fields]) OR "agnp"[All Fields])) AND ("anti bacterial agents"[Pharmacological Action] OR "anti bacterial agents"[MeSH Terms] OR

("anti bacterial"[All Fields] AND "agents"[All Fields]) OR "anti bacterial agents"[All Fields] OR "antibacterial"[All Fields] OR "antibacterials"[All Fields] OR "antibacterially"[All Fields] OR ("bactericidal"[All Fields] OR "bactericidalness"[All Fields] OR "bactericidally"[All Fields] OR "bactericidals"[All Fields] OR "bactericide"[All Fields] OR "bactericides"[All Fields] OR "bactericidalness"[All Fields] OR "bactericidity"[All Fields]) OR ("antimicrobial"[All Fields] OR "antimicrobials"[All Fields]) OR ("infection control"[MeSH Terms] OR ("infection"[All Fields] AND "control"[All Fields]) OR "infection control"[All Fields]))

Anexo 2. Flujograma



Anexo 3. Hoja modificada del Nature Publication Quality Improvement

Project checklist (NPQIP)

| Section title | Item number | Item |
|---|-------------|--|
| Figures and statistical representation of data (in vitro studies) | 1.1 | The legend or the main text report the exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a number, not a range? |
| The following items should be found either in the figure legends or the methods section of the manuscript | 1.2 | A description of the sample collection allowing the reader to understand whether the samples represent technical or biological replicates (including how many animals, litters, cultures, etc.)? |
| | 1.3 | A statement of how many times the experiment shown was replicated in the laboratory? |
| | 1.4.1 | Definitions of statistical methods and measures: If not a very common test (such as <i>t</i> test, simple χ^2 tests, Wilcoxon and Mann–Whitney tests, ANOVA), is the test described in the methods section? |
| | 1.4.2 | Definitions of statistical methods and measures: Are tests reported as one-sided or two-sided? |
| | 1.4.3 | Definitions of statistical methods and measures: Are there adjustments for multiple comparisons where this is appropriate? |
| | 1.4.4 | Definitions of statistical methods and measures: Are the statistical test results (e.g., <i>p</i> values, <i>F</i> statistic etc.) presented? |
| | 1.4.5 | Definitions of statistical methods and measures: Are the summary estimates defined as a median or average? |
| | 1.4.6 | Definitions of statistical methods and measures: Are the error bars defined as s.d., s.e.m. or c.i.? |
| | 1.5.1 | Implementation of statistical methods and measures: Do the authors show that their data meet the assumptions of the tests (e.g., normal distribution)? |
| | 1.5.2 | Implementation of statistical methods and measures: Is there an estimate of variation within each group of data? |
| | 1.5.3 | Implementation of statistical methods and measures: Is the variance similar (difference less than twofold) between the groups that are being statistically compared? |

| Section title | Item number | Item |
|--|-------------|--|
| For in vitro study: sample size | 2 | Does the manuscript describe how the sample size was chosen to ensure adequate power to detect a pre-specified effect size? |
| | 2.1 | Does the manuscript include a statement about sample size estimate even if no statistical methods were used? |
| For in vitro study: exclusions | 3 | Does the manuscript describe if samples or animals were excluded from the analysis? |
| | 3.1 | Are exclusion criteria defined? |
| | 3.2 | Is it clear that the criteria were pre-established? |
| For in vitro study: randomization | 4 | Does the manuscript describe which method of randomization was used to determine how samples/animals were allocated to experimental groups? |
| | 4.1 | Does the manuscript describe include a statement about randomization even if no randomization was used? |
| For in vitro study: blinding | 5 | Does the manuscript describe whether the investigator was blinded to the group allocation during the experiment and/or when assessing the outcome? |
| | 5.1 | Does the manuscript include a statement about blinding even if no blinding was done? |
| For in vitro study: reagents | 6.1 | Has every antibody used in this manuscript been profiled for use in the system under study, by either citation, catalog number, clone number or validation profile? |
| | 6.2.1 | Was the source of cell lines provided? |
| | 6.2.2 | Do the authors report whether the lines used have been authenticated recently (e.g., by STR profiling: within 1 year of use)? |
| | 6.2.3 | Do the authors report whether the lines used have been tested for mycoplasma contamination recently (within 6 months of use)? |
| For in vivo study: figures and statistical representation of data: for each figure (and each panel, where relevant), does the legend or the main text report | 1.1 | The legend or the main text report the exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a number, not a range? |
| | 1.2 | A description of the sample collection allowing the reader to understand whether the samples represent technical or biological replicates (including how many animals, litters, cultures, etc.)? |
| | 1.3 | A statement of how many times the experiment shown was replicated in the laboratory? |
| | 1.4.1 | Definitions of statistical methods and measures: If not a very common test (such as <i>t</i> test, simple χ^2 tests, Wilcoxon and Mann-Whitney tests, ANOVA), is the test described in the methods section? |
| | 1.4.2 | Definitions of statistical methods and measures: Where appropriate are tests reported as one-sided or two-sided? |
| | 1.4.3 | Definitions of statistical methods and measures: Are there adjustments for multiple comparisons where this is appropriate? |
| | 1.4.4 | Definitions of statistical methods and measures: Are the statistical test results (e.g., <i>p</i> values, <i>F</i> statistic etc.) presented? |

| Section title | Item number | Item |
|---|-------------|--|
| | 1.4.5 | Definitions of statistical methods and measures: Are the summary estimates defined as a median or average? |
| | 1.4.6 | Definitions of statistical methods and measures: Are the error bars defined as s.d., s.e.m. or c.i.? |
| | 1.5.1 | Implementation of statistical methods and measures: Do the authors show that their data meet the assumptions of the tests (e.g., normal distribution)? |
| | 1.5.2 | Implementation of statistical methods and measures: Is there an estimate of variation within each experimental group of data (e.g. Control vs Intervention group)? |
| | 1.5.3 | Implementation of statistical methods and measures: Is the variance similar (difference less than twofold) between the groups that are being statistically compared? |
| For in vivo study: sample size | 2 | Does the manuscript describe how the sample size was chosen to ensure adequate power to detect a pre-specified effect size? |
| | 2.1 | Does the manuscript include a statement about sample size estimate even if no statistical methods were used? |
| For in vivo study: exclusions | 3 | Does the manuscript describe if samples or animals were excluded from the analysis? |
| | 3.1 | Are inclusion and exclusion criteria defined? |
| | 3.2 | Is it clear that the criteria were pre-established? |
| For in vivo study: randomization | 4 | Does the manuscript describe which method of randomization was used to determine how samples/animals were allocated to experimental groups? |
| | 4.1 | Does the manuscript describe include a statement about randomization even if no randomization was used? |
| For in vivo study: blinding | 5 | Does the manuscript describe whether the investigator was blinded to the group allocation during the experiment and/or when assessing the outcome? |
| | 5.1 | Does the manuscript include a statement about blinding even if no blinding was done? |
| For in vivo study: reagents | 6.1 | Has every antibody used in this manuscript been profiled for use in the system under study, by either citation, catalog number, clone number or validation profile? |
| For in vivo study: non-human animal studies | 7.1.1 | Does the study report the Species? |
| | 7.1.2 | Does the study report the Strain? |
| | 7.1.3 | Does the study report the Sex? |
| | 7.1.4 | Does the study report the age or weight (exact numbers required not ranges)? |
| | 7.2.1 | Does the study include a statement of compliance with ethical regulations? |
| | 7.2.2 | Does the study include the committee(s) approving the experiments? |
| For manuscript that include human studies | 8.1 | Does the manuscript identify the committee(s) approving the study protocol? |
| | 8.2 | Does the manuscript include a statement confirming that informed consent was obtained from all subjects? |

| Section title | Item number | Item |
|--|-------------|--|
| | 8.3 | For publication of patient photos, does the study include a statement confirming that consent to publish was obtained? |
| | 8.4 | Does the study report the clinical trial registration number (at ClinicalTrials.gov or equivalent)? |
| | 8.5 | For phase II and III randomized controlled trials, does the supplementary material include a CONSORT checklist? |
| | 8.6 | For tumor marker prognostic studies, does the supplementary material include a REMARK checklist? |
| Data deposition | 9.1 | For studies describing Protein, DNA and RNA sequences, is an accession code for deposited data in a public repository provided? |
| | 9.1.1 | Does that accession code give access to the data? |
| | 9.2 | For studies describing Macromolecular structures, is an accession code for deposited data in a public repository provided? |
| | 9.2.1 | Does that accession code give access to the data? |
| | 9.3 | For studies describing Crystallographic data for small molecules, is an accession code for deposited data in a public repository provided? |
| | 9.3.1 | Does that accession code give access to the data? |
| | 9.4 | For studies describing microarray data, is an accession code for deposited data in a public repository provided? |
| | 9.4.1 | Does that accession code give access to the data? |
| | 9.5 | For studies describing other data, is an accession code for deposited data in a public repository provided? |
| | 9.5.1 | Does that accession code give access to the data? |
| Computer code: for studies using bespoke computer based analysis | 10.1 | Is the computer source code provided with the paper? |
| | 10.2 | Is the computer source code deposited in a public repository? |
| | 10.2.1 | Is that source code accessible? |
| | 10.2.2 | Does the source code function as described? |
| | 10.3 | If NO to 10.1 and 10.2, does the manuscript indicate how the computer source code can be obtained? |
| Experiment type | 0.1 | Does this publication describe in vivo experiments, in vitro/ ex vivo experiments or both? |
| Human related | 0.2 | Does this publication include human study? |
| Computer code | 0.3 | Does this publication include computer code? |
| Comments | 0.4 | Do you have other comments? If yes, please leave them here |

II. CONCLUSIONES

Del presente trabajo de investigación se concluye que:

1. El silabo nos permitirá describir los distintos tipos de cementos selladores endodónticos reconociendo sus desventajas frente a infecciones endodónticas que llevan al fracaso, así como, nos ayudarán a elegir la mejor opción terapéutica frente a una situación clínica específica.
2. El artículo analizado presenta algunas deficiencias metodológicas pero el planteamiento del problema, así como la resolución del objetivo principal está claramente establecido y proporciona un punto de partida positivo para futuros trabajos en esta línea de investigación en específico.
3. Con este proyecto de investigación de tipo revisión sistemática se busca establecer pautas clínicas al momento de enfrentar una infección bacteriana endodóntica, ya que ha quedado demostrada la eficacia antibacteriana de las nanopartículas que han sido agregadas a la composición de un cemento sellador endodóntico.

III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Chen L, Yang J, Wang JR, Suh BI. Physical and biological properties of a newly developed calcium silicate-based self-adhesive cement. *Am J Dent*. [Internet]. 2018. [Citado 15 agosto 2023];31(2):86-90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29630792/>
- (2) Dorileo MC, Villa RD, Guedes OA, Aranha AM, Semenoff-Segundo Bandeca MC, Borges AH. Comparative Analysis of Selected Physicochemical Properties of Pozzolan Portland and MTA-Based Cements. *Int Sch Res Notices* [Internet]. 2014; [Citado 15 agosto de 2023]; Aug 12;2014:831908. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4897100/>
- (3) Farrugia C, Lung CYK, Schembri Wismayer P, Arias-Moliz MT, Camilleri J. The Relationship of Surface Characteristics and Antimicrobial Performance of Pulp Capping Materials. *J Endod* [Internet]. 2018; [Citado 15 agosto de 2023]; 44(7):1115-1120. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29861063/>
- (4) Hamouda IM. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *Journal of Biomedical Research*. [Internet]. Volume 26, Issue 3, 2012. [Citado 15 de Agosto de 2023]; 143-151, ISSN 1674-8301. Disponible en: <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20120027>.
- (5) Kangarlou, A., Neshandar, R., Matini, N., & Dianat, O. (2016). Antibacterial efficacy of AH Plus and AH26 sealers mixed with amoxicillin, triple antibiotic paste and nanosilver. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*. [Internet]. 2016; [Citado 15 agosto de 2023]; 10(4), 220–225. Disponible en: <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.035>

- (6) Jalil I, Naaman A, Camilleri J. Properties of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod* [Internet]. 2016; [Citado 17 agosto de 2023]; 42(10):1529-1535. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27523906/>
- (7) Khan S, Kaleem M, Fareed MA, Habib A, Iqbal K, Aslam A, Ud Din S. Chemical and morphological characteristics of mineral trioxide aggregate and Portland cements. *Dent Mater J* [Internet]. 2016; [citado 17 agosto de 2023]; 35(1):112-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26830831/>
- (8) Zanjani VA, Tabari K, Sheikh-Al-Eslamian SM, Abrandabadi AN. Physiochemical Properties of Experimental Nano-hybrid MTA. *J Med Life* [Internet]. 2018; [Citado 18 agosto de 2023]; 11(1):51-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5909946/>
- (9) Torabinejad J, White DJ, Tooth filling material and method of Use. WIPO Patent Publication [Internet]. 1994; [Citado 19 agosto de 2023]; WO 94/ 24955. November 1994. Disponible en: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO1994024955>
- (10) Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* [Internet]. 2009; [Citado 19 agosto de 2023]; 6(7): e1000097. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19621072/>
- (11) Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod.* [Internet]. 2016; [Citado 20 agosto de 2023]; Oct;42(10):1417-26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27520408/>

- (12) Song, W., & Ge, S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2019; [Citado 20 agosto de 2023]; 24(6), 1033. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules24061033>
- (13) Tanomaru, Juliane & Vázquez García, Fernando & Bosso Martelo, Roberta & Bernardi, M. & Faria, Gisele & FILHO, Mario. Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physico-chemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements. *Journal of Applied Oral Science* [Internet]. 2016; [Citado 20 agosto de 2023]; 24. 204-210. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5022225/>
- (14) Vazquez-Garcia F, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Basso-Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Effect of Silver Nanoparticles on Physicochemical and Antibacterial Properties of Calcium Silicate Cements. *Braz Dent J* [Internet]. 2016; [Citado 21 agosto 2023]; 27(5):508-514. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27982226/>
- (15) Vimbela, G. V., Ngo, S. M., Frazee, C., Yang, L., & Stout, D. A. (2017). Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *International journal of nanomedicine* [Internet]. 2017; [Citado 21 agosto 2023]; 3941–3965. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/IJN.S134526>

ANEXO: Artículo empleado para el análisis crítico de literatura estomatológica

www.scielo.br/jaooc

http://dx.doi.org/10.1590/1678-776720160422

Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physico-chemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements

Juliane Maria GUERREIRO-TANOMARU¹, Fernando Antonio VÁZQUEZ-GARCÍA¹, Roberta BOSSO-MARTELO¹, Maria Inês Basso BERNARDI², Gisele FARIA¹, Mario TANOMARU-FILHO¹

1- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Odontologia Restauradora, Araraquara, SP, Brasil.
2- Universidade de São Paulo, Instituto de Física, São Carlos, SP, Brasil.

Corresponding address: Mario Tanomaru-Filho - Departamento de Odontologia Restauradora - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Rua Humaitá, 1680 - CP 331 - 14.801-903 - Araraquara - SP - Brazil - Phone: +55-16-3301-6391 - Fax: +55-16-3301-6392 - e-mail: tanomaru@uol.com.br

Submitted: September 7, 2015 - Modification: December 17, 2015 - Accepted: February 15, 2016

ABSTRACT

Objective: Mineral Trioxide Aggregate (MTA) is a calcium silicate cement composed of Portland cement (PC) and bismuth oxide. Hydroxyapatite has been incorporated to enhance physicochemical and biological properties of dental materials. This study evaluated physicochemical and mechanical properties and antibiofilm activity of MTA and PC associated with zirconium oxide (ZrO₂) and hydroxyapatite nanoparticles (HAN). Material and Methods: White MTA (Angelus, Brazil); PC (70%)+ZrO₂ (30%); PC (60%)+ZrO₂ (30%)+HAN (10%); PC (50%)+ZrO₂ (30%)+HAN (20%) were evaluated. The pH was assessed by a digital pH-meter and solubility by mass loss. Setting time was evaluated by using Gilmore needles. Compressive strength was analyzed by mechanical test. Samples were radiographed alongside an aluminum step wedge to evaluate radiopacity. For the antibiofilm evaluation, materials were placed in direct contact with *E. faecalis* biofilm induced on dentine blocks. The number of colony-forming units (CFU mL⁻¹) in the remaining biofilm was evaluated. The results were submitted to ANOVA and the Tukey test, with 5% significance. Results: There was no difference in pH levels of PC+ZrO₂, PC+ZrO₂+HAN (10%) and PC+ZrO₂+HAN (20%) (p>0.05) and these cements presented higher pH levels than MTA (p<0.05). The highest solubility was observed in PC+ZrO₂+HAN (10%) and PC+ZrO₂+HAN (20%) (p<0.05). MTA had the shortest initial setting time (p<0.05). All the materials showed radiopacity higher than 3 mmAl. PC+ZrO₂ and MTA had the highest compressive strength (p<0.05). Materials did not completely neutralize the bacterial biofilm, but the association with HAN provided greater bacterial reduction than MTA and PC+ZrO₂ (p<0.05) after the post-manipulation period of 2 days. Conclusions: The addition of HAN to PC associated with ZrO₂ harmed the compressive strength and solubility. On the other hand, HAN did not change the pH and the initial setting time, but improved the radiopacity (HAN 10%), the final setting time and the *E. faecalis* antibiofilm activity of the cement.

Keywords: Physicochemical analysis. Biofilms. *Enterococcus faecalis*. Zirconium. Nanotechnology.

INTRODUCTION

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) is a calcium silicate cement composed of Portland cement (PC) and bismuth oxide (Bi₂O₃)²⁴. MTA shows proper physicochemical properties, biocompatibility, bioactivity and antimicrobial activity^{27,30}.

The Bi₂O₃ replacement in MTA composition has

been suggested, since it interferes in the solubility, pH, and setting time²⁷. The PC association with 30% zirconium oxide (ZrO₂) exhibited radiopacity, compressive strength, setting time, water uptake, solubility and sorption comparable to ProRoot MTA¹⁶. Bioactive potential have been observed for the PC/ZrO₂ association¹⁵.

Hydroxyapatite have been incorporated into

root canal sealers¹⁴, retrofilling materials⁴, dental composites² and adhesive resin systems²⁸ to enhance the mechanical, physicochemical and biological properties of materials. Nanohydroxyapatite (HAN) is considered a biocompatible and bioactive material¹⁷ and presents osteoconductive property²⁹. Dasgupta, et al.¹⁷ (2013) evaluated the properties presented by micro and nanoparticles of hydroxyapatite (HAN), and observed better physical, mechanical and biological properties for the material with particle sizes of 168 nm. Therefore, the addition of HAN could be an option for improving the properties of the calcium silicate-based cements.

The aim of this study was to evaluate physicochemical, mechanical and antibiofilm properties against *E faecalis* presented by MTA and PC with ZrO₂ associated with different concentrations of HAN. The null hypothesis is that the addition of HAN would not improve the properties for PC associated with ZrO₂.

MATERIAL AND METHODS

The materials and powder/liquid proportion used are described in Figure 1.

Hydroxyapatite nanoparticle

The HAN was produced using the coprecipitation method. Initially, two aqueous solutions were prepared: a calcium nitrate tetrahydrate solution 1M (Mallinckrodt, 99.9%) and an ammonium phosphate anhydrous 0.6 M solution (Mallinckrodt, 99.4%). The ammonium phosphate solution was dripped into calcium nitrate solution. The pH solution was maintained at approximately 11 with the addition of ammonium hydroxide under N₂ flow. Analysis in scanning electron microscopy demonstrated that the obtained particles had a size of 200 nm.

Setting time

To evaluate the setting time, stainless steel rings with an internal diameter of 10 mm and thickness of 1 mm were filled with the different cements (n=6). The setting time evaluation was performed

according to ISO-6876¹² (2002) and ASTM⁷ (2007) standards, with analyses every 3 minutes during the first half hour, every 5 minutes in the first 2 hours and every 15 minutes from this time forward. To determine the initial setting time, a Gilmore needle with mass of 100±0.5 g and tip diameter of 2±0.1 mm supported on the cement surface was used until the needle could not produce indentations on the cement surface. After determining the initial setting time, measurements continued until the time of the final setting. The specimens were maintained at 37°C during the measurements. To determine the final setting time, the procedures were repeated, using a Gilmore needle with mass of 456±0.5 g and tip diameter of 1±0.1 mm.

Compressive strength

Specimens (n=6) were fabricated according to BSI-6039¹¹ (1981) standards for the compressive strength test. The cements were placed into cylindrical molds with 12 mm of thickness and 6 mm in diameter. They were stored at 37°C and 100% humidity for 3 hours, and then the samples were removed from the mold. The samples remained in the incubator for the period of 24 hours and 21 days. The compressive strength tests were performed in the test machine Emic DL2000, (EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, PR, Brazil) with 5 kN load cell, at 0.5 mm/minute speed. The maximum stress was recorded in MPa, using the maximum compressive force and the diameter of the cylinders (MPa=N/mm²).

Radiopacity

Radiopacity analysis (n=6) was performed according to ISO-6876¹² (2002) standards. Samples measuring 10 mm in diameter and 1 mm thickness were manipulated for each material and stored at 37°C and 100% humidity for 48 hours. They were radiographed on an occlusal film (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY, USA), next to an aluminum step wedge with a range from 2 to 16 mm thickness. Radiographs were performed using an X-ray device

| | Material | Powder:Liquid Ratio |
|---------------------------------|---|---------------------|
| MTA | White MTA Angelus (MTA)* | 1g: 320 µL |
| PC+ZrO ₂ | PC**(70%)+ZrO ₂ (30%) | 1g: 320 µL |
| PC+ZrO ₂ ***+HAN10% | PC (60%)+ZrO ₂ (30%)+HAN (10%) | 1g: 330 µL |
| PC+ZrO ₂ +HAN****20% | PC (50%)+ZrO ₂ (30%)+HAN (20%) | 1g: 340 µL |

*MTA: Angelus Soluções Odontológicas (Angelus, Londrina, Brazil)

**PC: Portland cement: CP - CPB-40 Estrutural Votoran (Votorantin Cimentos, Camargo Correa Cimentos S.A., Pedro Leopoldo, MG, Brazil)

***ZrO₂: Zirconium oxide (Sigma Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)

****HAN: Nanoparticulated Hydroxyapatite (HAN - Nanotechnology Laboratory, Physics Institute of São Carlos, SP, Brazil)

Figure 1- Evaluated materials and powder/liquid proportions

GE 1000 (General Electric, Milwaukee, WI, USA), calibrated at 60 kV, 7 mA, 18 pulses per second, and 30 cm of focal distance. The images obtained were digitized and analyzed by the ImageJ software (Fiji 1.46). The areas of the aluminum step wedge and the cements were selected to determine the radiopacity values of the cements in equivalent millimeters of aluminum.

Solubility

The solubility assay was performed according to ISO-6876¹² (2002) standards. Sample (n=10) dimensions were 7 mm in diameter and 1 mm thickness, and 5 cm of nylon thread was placed in the cement when the material was inserted into the mold. After 2 and 7 days, the samples were removed from the mold. After removal of residues and loose particles, the samples were placed in a silica desiccator for one hour. The disks and the nylon thread were weighed on a precision scale Model Adventure (Ohaus Corp., Parsippany, NJ, USA) to obtain the initial mass.

Each of the specimens were held by the thread and put in a plastic container with 10 mL of deionized water, without any contact between the sample and the inner wall of the container. The samples were kept in an oven at 37°C for 15 hours. After this period, the cements were removed from the containers, and washed with distilled and deionized water.

The excess water was removed with absorbent paper. Specimens returned to the silica desiccator for 24 hours, after that they were weighed once again to determine the final mass. Stabilization of each specimen's weight was confirmed after a new cycle of 24 hours in the silica desiccator. The material solubility corresponded to the mass loss identified for each sample, expressed as a percentage of the original mass.

pH

The pH analysis (n=10) was performed according to Faria-Junior, et al.¹⁹ (2013), for which samples measuring 7 mm in diameter and 1 mm thickness were manipulated. Samples were maintained in an oven at 37°C for setting during 2 or 7 days. Then, samples were immersed in plastic flasks with 10 mL of deionized water, with previously determined pH of 6.5. The flasks were closed and kept in an oven at 37°C. The pH measurements were taken with a previously calibrated pH meter, at time intervals of 5 and 15 hours after immersion of the disks. After each measurement, performed in triplicate, the mean pH of each group in each experimental period was calculated.

Antibiofilm activity

The antimicrobial activity test in direct contact

with the biofilm was performed according to Faria-Junior, et al.¹⁹ (2013). Bovine central incisors were used in the biofilm formation process. The roots were sectioned longitudinally. Dentine blocks measuring 5x5x0.7 mm (width x length x thickness) were obtained using a diamond disc (Isomet – Buheler, Lake Bluff, IL, USA) at low speed, under abundant irrigation. The blocks were put into a test tube containing distilled water for sterilization in an autoclave at 121°C for 20 min.

The microbiological procedures and manipulation of the dentine blocks were performed within a laminar flow chamber (Veco Flow Ltda, Campinas, SP, Brazil). A standard strain of *E. faecalis* (ATCC 29212) was used for biofilm formation. The purity of the strain was confirmed by Gram staining and colony morphology. The microorganisms were reactivated in 4 mL of sterile Brain Heart Infusion broth (BHI, Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) and kept in an oven at 37°C for 12 hours. The optical density of the medium was calibrated in a spectrophotometer (Model 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brazil) set at $DO_{600}=0.2$, which is equivalent to 10^8 CFU mL⁻¹.

The bovine dentine blocks were placed in 24-well culture plates, and each well received 200 µL of the adjusted inoculum and 1.8 mL of BHI medium. The well plates with the submerged bovine dentine block were kept in an incubator (Model Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil) under constant agitation and microaerophilic conditions at 37°C for 14 days. The samples were kept under constant agitation for uniform biofilm formation on the sample surface, as described by Guerreiro-Tanomaru, et al.²² (2013) using confocal laser scanning microscopy. *E. faecalis* is able to develop biofilm on dentin blocks after a period of 14 days²². The BHI medium of each well completely changed every 48 hours, without adding new microorganisms, to ensure sufficient nutrients for bacterial growth.

After the post-manipulation periods of 2 and 7 days, according to the method used by Faria-Junior, et al.¹⁹ (2013), each sample was removed from the mold, sterilized by UV light, and placed over a dentine block containing biofilm, which was previously washed in saline solution to remove the planktonic bacteria. The dentine block/cement sample set was placed in a 48-well plate. On each sample set 20 µL of sterile saline solution was deposited to prevent the dehydration of the sample. The plates were kept at 37°C for the time intervals of 5 and 15 hours of contact. Six discs of each material were used for each period. In the control group Teflon disks with the same size of the cement discs were used. After the contact time, the cement discs were removed and the dentine blocks with remaining biofilm were individually placed in

test tubes with 1 mL of sterile saline solution and two glass pearls. The tubes were agitated in vortex (Model Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil) for 1 minute to detach the remaining biofilm.

After this, decimal serial dilutions of *E. faecalis* were obtained. Three aliquots of 20 µL of each dilution was inoculated in a Petri dish with *m-Enterococcus* agar medium (Difco Laboratories – Becton Dickinson and Company - Detroit, MI, USA) and stored in a microaerophilic environment at 37°C for 48 hours.

The readings for each plate resulted in a mean CFU mL⁻¹ value in the three areas of bacterial growth that generated between 5 and 50 colonies per field. The number of CFU mL⁻¹ was calculated for each cement in each period. The data were submitted to logarithmic transformation to base 10 and the results were presented as the mean of six specimens per group.

For all the tests, the results obtained were submitted to a normality test, and with this being proved, they were submitted to the parametric ANOVA statistical test for comparison of the different groups among them and to the Tukey multiple comparison test, with 5% significance.

RESULTS

Setting time

Table 1 shows that the MTA group presented the shortest initial setting time in comparison with the other groups ($p < 0.05$), which were similar among them ($p > 0.05$). The shortest final setting time was presented by PC+ZrO₂+HAn10% group and the longest by MTA group.

Compressive strength

The results obtained point out statistical similarity between MTA and PC+ZrO₂ groups in the time interval of 24 hours. For the 21 days period, PC+ZrO₂ group presented the highest value ($p < 0.05$). The lowest value in both experimental times was expressed by PC+ZrO₂+HAn20% group, as shown in Table 1.

Radiopacity

PC+ZrO₂ and PC+ZrO₂+HAn20% groups presented lower radiopacity when compared with the other groups. MTA and PC+ZrO₂+HAn10% presented the highest radiopacity values ($p < 0.05$), based on Table 1.

Solubility

The highest solubility values were shown by PC+ZrO₂+HAn10% and PC+ZrO₂+HAn20% groups ($p < 0.05$) in both experimental periods (2

Table 1- Mean values and standard deviation for initial and final setting time (minutes), compressive strength (MPa) after 24 hours and 21 days and radiopacity (mmAl)

| | Setting time | | Compressive strength | | Radiopacity |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Initial | Final | 24 hours | 21 days | |
| MTA | 23.67 (± 3.44) ^a | 170.7 (± 5.39) ^d | 19.63 (± 2.16) ^a | 29.51 (± 4.58) ^b | 4.52 (± 0.37) ^a |
| PC+ZrO ₂ | 42.00 (± 4.05) ^b | 151.8 (± 8.97) ^c | 23.29 (± 3.23) ^a | 45.77 (± 2.73) ^a | 3.70 (± 0.07) ^b |
| PC+ZrO ₂ +HAn10% | 40.33 (± 3.67) ^b | 100.5 (± 3.08) ^a | 14.41 (± 3.20) ^b | 30.90 (± 5.32) ^b | 4.18 (± 0.29) ^a |
| PC+ZrO ₂ +HAn20% | 40.17 (± 3.06) ^b | 119.2 (± 9.28) ^b | 4.94 (± 1.48) ^c | 19.76 (± 1.94) ^c | 3.54 (± 0.20) ^b |

Equal letters in the same column indicate statistical similarity ($p > 0.05$)

Table 2- Mean values (%) and standard deviation for solubility and pH evaluation (2- and 7-day setting), after 15 hours of immersion

| | Solubility | | pH | |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 2 days (%) | 7 days (%) | 2 days | 7 days |
| MTA | 3.70 (± 0.91) ^a | 5.54 (± 1.22) ^a | 10.99 (± 0.07) ^b | 10.54 (± 0.37) ^b |
| PC+ZrO ₂ | 3.49 (± 0.47) ^a | 5.97 (± 1.32) ^a | 11.3 (± 0.10) ^a | 10.87 (± 0.14) ^a |
| PC+ZrO ₂ +HAn10% | 5.96 (± 1.18) ^b | 7.91 (± 1.17) ^b | 11.3 (± 0.11) ^a | 11.06 (± 0.11) ^a |
| PC+ZrO ₂ +HAn20% | 6.45 (± 1.15) ^b | 7.63 (± 1.39) ^b | 11.38 (± 0.08) ^a | 10.87 (± 0.29) ^a |
| Control | | | 7.45 (± 0.09) ^c | 7.29 (± 0.20) ^c |

Equal letters in the same column indicate statistical similarity ($p > 0.05$)

Table 3- Mean values (CFU mL⁻¹) and standard deviation for antibiofilm activity evaluation

| | 2 days | 2 days | 7 days | 7 days |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 5 hours | 15 hours | 5 hours | 15 hours |
| MTA | 6.11 (±0.58) ^b | 6.50 (±0.66) ^b | 5.75 (±0.15) ^a | 5.65 (±0.38) ^a |
| PC+ZrO ₂ | 6.39 (±0.36) ^b | 6.71 (±0.22) ^b | 6.31 (±0.36) ^{ab} | 5.38 (±0.36) ^a |
| PC+ZrO ₂ +HAN10% | 5.79 (±0.12) ^{ab} | 4.99 (±0.20) ^a | 5.96 (±0.38) ^a | 5.35 (±0.43) ^a |
| PC+ZrO ₂ +HAN20% | 5.37 (±0.33) ^a | 5.44 (±0.26) ^a | 6.02 (±0.56) ^a | 5.35 (±0.34) ^a |
| Control | 7.11 (±0.35) ^c | 7.73 (±0.89) ^c | 6.76 (±.53) ^b | 6.91 (±0.36) ^b |

Equal letters in the same column indicate statistical similarity (p>0.05)

and 7 days). The lowest degree of solubility was presented by MTA and PC+ZrO₂ groups in 2 and 7 days (Table 2).

pH

There was no difference in pH levels of PC+ZrO₂, PC+ZrO₂+HAN (10%) and PC+ZrO₂+HAN (20%) (p>0.05) and these cements presented higher levels of pH than MTA (p<0.05) as shown in Table 2.

Antibiofilm activity

In the 2 days experimental period, PC+ZrO₂+HAN10% and PC+ZrO₂+HAN20% groups showed the best results in both time intervals, 5 and 15 hours, with PC+ZrO₂+HAN10% being statistically similar to MTA and PC+ZrO₂ in the time interval of 5 hours (p>0.05). In the experimental time of 7 days post manipulation, the groups were shown to be statistically similar among them (p>0.05). All the cements presented antibiofilm activity (Table 3).

DISCUSSION

HAN have been associated to materials to enhance their mechanical³ and biological¹⁷ properties. In this study, MTA showed a final setting time of 170 min, in agreement with previous study¹⁰. The addition of HAN10% and 20% to the PC+ZrO₂ did not affect the initial setting time and decreased the final setting time. Previous study showed that the addition of HAN reduced the initial setting time of the calcium silicate cement⁴.

The addition of 10% and 20% HAN provided a decrease in the PC+ZrO₂ compressive strength at 24 hours and 21 days, although the compressive strength of PC+ZrO₂+HAN10% was similar to MTA at 21 days. This result may have been influenced by the powder/liquid ratio⁹, since in the groups containing HAN, a larger amount of water were required to obtain suitable consistency for clinical use. Antonijevic, et al.⁴ (2015) observed that the addition of HAN to calcium silicate cement results in a material with better physicochemical properties without changing its mechanical properties.

The evaluated materials exhibit solubility values

greater than the ones established by ANSI/ADA no. 57³ (2000), which requires that solubility must be lower than 3%. MTA and PC+ZrO₂ had lower degree of solubility. PC+ZrO₂+HAN10% and PC+ZrO₂+HAN20% presented the highest solubility degree. The hydroxyapatite participates in chemical changes that occur during the initial setting of glass ionomer cement⁵. The reaction of HAN with glass ionomer cement occurs more slowly compared to hydroxyapatite micro size particles, due to the higher crystallinity, lower porosity and lower specific surface area of HAN⁶. This might explain the reduced compressive strength and increased solubility when HAN is added to PC+ZRO₂.

The addition of 30% ZrO₂ promotes proper radiopacity for a retrofilling material¹⁶, according to ISO-6876¹² (2002) standard. The MTA radiopacity and PC+ZrO₂+HAN10% was similar and higher than other groups. Moreover, all the cements evaluated presented higher radiopacity than the 3 mmAl recommended for dental cement¹².

MTA and PC have calcium oxide in their composition, a precursor of calcium hydroxide, responsible for releasing hydroxyl ions and raising the pH¹⁸. Camilleri, Cutajar and Mallia¹³ (2011) studied the hydration of PC+ZrO₂ and MTA ProRoot when immersed in HBSS, and showed hydrated calcium, calcium hydroxide and traces of ettringite, relating the hydroxyl ion release and elevation of pH during hydration of the cement. Guerreiro-Tanomaru, et al.²¹ (2012) related the pH value of 10.2 for PC or association to ZrO₂. There was no difference in pH levels of PC+ZrO₂, PC+ZrO₂+HAN (10%) and PC+ZrO₂+HAN (20%) and these cements presented higher pH than MTA. These results are in agreement with the study which showed that the addition of HAN to calcium silicate cement did not change the pH values compared to Portland cement⁴.

The antimicrobial test by diffusion in agar has been well established in the literature²⁵. However, it may be influenced by material solubility and capacity to diffuse into the medium²⁶. Also, it is difficult to evaluate materials after setting. The antibacterial activity by counting CFU mL⁻¹ is commonly used^{19,22},

showing the viability of the bacterial strain. The methodology used in this study, described by Faria-Junior, et al.¹⁹ (2013), allows the evaluation of the antimicrobial property against bacteria in the biofilm form, after the setting reaction of the cements, differently from studies that evaluate the antibacterial action on the planktonic form.

The evaluated materials were not capable of completely reducing *E. faecalis*. The highest level of effect against biofilm was observed for cements containing HAN 10% and 20%, in comparison with MTA and PC+ZrO₂ after the post-manipulation period of 2 days. The antimicrobial effect of MTA might be due to its high pH or to substances that are released from MTA into the media²⁷. An important aspect of hydroxyapatite is the possibility of the substitution of ions with different charges; for example, it is possible to exchange phosphate ions (-3) with carbonate ions (-2)⁸. Such situation leads to the creation of a positively charged vacancy, which is compensated by the release of one cation of calcium (Ca²⁺) and one hydroxyl ion (OH⁻)⁸. Carbonate ions are present in the Portland cement composition²⁰. Therefore, it might react with hydroxyapatite and increase the pH, improving the antibacterial activity of MTA-based cements containing HAN. However, there was no increase in the pH of the cements containing HAN in this study.

Hydroxyapatite alone has no antimicrobial activity²³. However, recent study showed that nanoparticulated hydroxyapatite has bactericidal activity against aerobes, *Streptococcus* spp. and anaerobes¹. In this study, the antibacterial activity of PC+ZrO₂+HAN (10%) and PC+ZrO₂+HAN (20%) against *E. faecalis* could be attributed to the antibacterial activity of HAN or due to some reaction of HAN with components of PC. However, studies are needed to test these hypotheses.

CONCLUSIONS

The addition of HAN to PC associated with ZrO₂ harmed the compressive strength and solubility. On the other hand, HAN did not change the pH and the initial setting time, but improved the radiopacity (HAN 10%), the final setting time and the *E. faecalis* antibiofilm activity of the cement.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Adinael Trindade Junior (*In memoriam*) for participating in all stages of this study.

To São Paulo Research Foundation – FAPESP Process No.: 2012/11318-9 and 2012/13271-0, for financial support.

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- 1- Abdulkareem EH, Memarzadeh K, Allaker RP, Huang J, Pratten J, Spratt D. Anti-biofilm activity of zinc oxide and hydroxyapatite nanoparticles as dental implant coating materials. *J Dent*. 2015;43:1462-9.
- 2- Arcis RW, López-Macipe A, Toledano M, Osorio E, Rodríguez-Clemente R, Murtra J, et al. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. *Dent Mater*. 2002;18:49-57.
- 3- American National Standards Institute; American Dental Association. Specification no. 57: endodontic sealing materials. Chicago: ANSI/ADA; 2000.
- 4- Antonijević D, Jeschke A, Colovic B, Milovanovic P, Jevremovic D, Klisic D, et al. Addition of a fluoride-containing radiopacifier improves micromechanical and biological characteristics of modified calcium silicate cements. *J Endod*. 2015;41:2050-7.
- 5- Arita K, Lucas ME, Nishino M. The effect of adding hydroxyapatite on the flexural strength of glass ionomer cement. *Dent Mater J*. 2003;22:126-36.
- 6- Arita K, Yamamoto A, Shinonaga Y, Harada K, Abe Y, Nakagawa K, et al. Hydroxyapatite particle characteristics influence the enhancement of the mechanical and chemical properties of conventional restorative glass ionomer cement. *Dent Mater J*. 2011;30:672-83.
- 7- American Society for Testing Materials. International C266-07. Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gillmore needles. West Conshohocken: ASTM; 2007.
- 8- Barralet J, Best S, Bonfield W. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. *J Biomed Mater Res*. 1998;41:79-86.
- 9- Basturk FB, Nekoofar MH, Günday M, Dummer PM. The effect of various mixing and placement techniques on the compressive strength of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013;39:111-4.
- 10- Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Invest*. 2016;20:83-90.
- 11- British Standards Institution. BS 6039:1981 - Specification for dental glass ionomer cements. London: BSI; 1981.
- 12- British Standards Institution. BS EN ISO 6876:2002. Dental root canal sealing materials. London: BSI; 2002.
- 13- Camilleri J, Cutajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater*. 2011;27:845-54.
- 14- Collares FM, Leitune VC, Rostirolla FV, Trommer RM, Bergmann CP, Samuel SM. Nanostructured hydroxyapatite as filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2012;45:63-7.
- 15- Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and experimental calcium silicate-based cements in human osteoblast-like cells. *Int Endod J*. 2015. doi: 10.1111/iej.12589. Epub ahead of print.
- 16- Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater*. 2011;27:879-91.
- 17- Dasgupta S, Tarafder S, Bandyopadhyay A, Bose S. Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33:2846-54.
- 18- Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2003;95:345-7.
- 19- Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J*. 2013;46:755-62.

- 20- Garrabrants AC, Sanchez F, Kosson DS. Changes in constituent equilibrium leaching and pore water characteristics of a Portland cement mortar as a result of carbonation. *Waste Manag.* 2004;24:19-36.
- 21- Guerreiro-Tanomaru JM, Cornélio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012;469019.
- 22- Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod.* 2013;39:346-50.
- 23- Lim PN, Teo EY, Ho B, Tay BY, Thian ES. Effect of silver content on the antibacterial and bioactive properties of silver-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101:2456-64.
- 24- Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci.* 2014;22:554-9.
- 25- Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011;44:1128-33.
- 26- Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Gutttaflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J.* 2011;44:307-13.
- 27- Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010;36:16-27.
- 28- Suzuki M, Talra Y, Kato C, Shinkai K, Katoh Y. Histological evaluation of direct pulp capping of rat pulp with experimentally developed low-viscosity adhesives containing reparative dentin-promoting agents. *J Dent.* 2015;44:27-36.
- 29- Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering - a review. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10:3124-40.
- 30- Wu BC, Wei CK, Hsueh NS, Ding SJ. Comparative cell attachment, cytotoxicity and antibacterial activity of radiopaque dicalcium silicate cement and white-coloured mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2015;48:268-76.

