

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/02/2027



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA
Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora
Programa de Pós-graduação em Ciências
Saúde Bucal da Criança



LEONARDO ANTÔNIO DE MORAIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES DE UM NOVO CIMENTO A BASE DE
HEXAMETAFOSFATO DE SÓDIO**

ARAÇATUBA - SP

2025

LEONARDO ANTÔNIO DE MORAIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES DE UM NOVO CIMENTO A BASE DE
HEXAMETAFOSFATO DE SÓDIO**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
– UNESP, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Doutor em Ciências
– Área de Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientador: Prof. Assoc. Luciano Tavares Ângelo Cintra
Coorientadora: Prof^ª. Ass. Thayse Yumi Hosida

ARAÇATUBA - SP

2025

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Morais, Leonardo Antônio de.
M827d Desenvolvimento e avaliação das propriedades de
um novo cimento a base de hexametáfosfato de sódio /

Leonardo Antônio de Moraes. - Araçatuba, 2025
130 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra

Coorientadora: Profa. Thayse Yumi Hosida

1. Fosfatos 2. Hidróxido de cálcio 3. Citotoxicidade
4. Materiais Biocompatíveis 5. Capeamento da polpa
dentária

I. T.

Black D27

CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

LEONARDO ANTÔNIO DE MORAIS

Nascimento	15/12/1992 Jataí-GO
Filiação	Waldeci Antônio de Moraes Cleide Maria de Moraes
2008/2011	Curso Técnico Integrado de Nível Médio em Informática
2013/2017	Curso de graduação em Odontologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
2014/2017	Desenvolvimento de Projetos de Iniciação Científica, com bolsas PIBIC-CNPq.
2018/2021	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica – área de Biomateriais, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.
2021/Atual	Curso de Pós-Graduação em Ciências – área de Saúde Bucal da Criança, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.
2022/2023	Estágio de Doutorado Sanduíche na <i>Colorado State University</i> , no Estado do Colorado nos Estados Unidos da América.
Associações	CROSP- Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO- Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Dedicatória

Dedicatória

Aos meus pais, Waldeci e Cleide:

Por todo apoio, suporte, dedicação, “puxões de orelha” e amor que vocês me proporcionam. Vocês são meus maiores exemplos de pais, família, dedicação, trabalho duro e incentivo para correr atrás dos nossos sonhos. Nada disso seria possível sem o apoio de vocês. Obrigado por sempre estarem ao meu lado me ajudando a levantar a cada tombo e me mostrando que sempre existe uma luz no fim do túnel, apenas precisamos ter paciência e determinação para caminhar até lá! Meu amor por vocês é algo inimaginável e só tenho a agradecer por ter vocês na minha vida!! Muito Obrigado por tudo!!

Aos meus irmãos, Lucas e Luan:

Por todas as brigas, conversas, festas, churrascos, viagens, apoios e conselhos. Dedico esse trabalho a vocês que estão sempre ao meu lado, me estimulando a seguir sempre o melhor caminho, tal como meus pais nos ensinaram! Vocês são a minha saudade diária de casa! Obrigado por tudo, amo vocês!

Agradecimentos especiais

Agradecimentos Especiais

A Deus

Por todas as bênçãos que o senhor coloca na minha vida. Obrigado por guiar o meu caminho e por não me abandonar nos momentos difíceis ou mesmo os felizes. Sinto abençoado por todas as pessoas que o senhor colocou em minha vida que torcem pelo meu sucesso e eu pelo deles.

À minha família

Por serem meus maiores incentivadores e motivadores. Meus exemplos de pessoas. Obrigado por estarem sempre ao meu lado e fazerem com que eu nunca desistisse dos meus sonhos! Cada conquista em minha vida é por vocês, sem o apoio de vocês nada seria possível.

Ao meu orientador Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Obrigado Professor por ter me acompanhado e guiado durante esses anos de pós-graduação. Muito obrigado por todo o apoio, pelas oportunidades concedidas e por ter acreditado em mim. É um enorme prazer poder trabalhar com um profissional de tanta competência, honestidade e comprometimento com o que faz. Obrigado pela paciência, disponibilidade, confiança e ensinamentos. Espero um dia ser ao menos uma pequena parte do profissional que o senhor é.

À minha coorientadora Profa. Thayse Yumi Hosida

Só tenho a agradecer pela amizade companheirismo durante todo o meu percurso desde a iniciação científica até os dias de hoje! Agradeço a oportunidade de trabalhar com você, o que contribuiu muito com a minha formação pessoal e profissional. Certamente, em todos os caminhos que trilhei durante o meu processo de formação você teve papel primordial. Não tenho palavras para agradecer tudo o que tens feito por mim.

Agradecimentos Especiais

Ao meu coorientador Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra

Agradeço por toda coorientação desse trabalho, por toda ajuda, dedicação, incentivo e ensinamentos passados. Agradeço a disponibilidade, boa vontade e preocupação, o que nos motiva a continuar. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Juliano Pelim Pessan

Por toda colaboração e assistência, mas sobretudo, por todas as oportunidades. Agradeço imensamente por várias vezes ter me orientado e me ajudado para que eu pudesse aprender, evoluir e produzir, o que foi parte essencial para o meu processo de formação acadêmica.

Ao meu orientador no exterior Dr. Ketul Popat

Muito obrigado pela hospitalidade e por todos os ensinamentos que me transmitiram durante o meu estágio no departamento. Você foi parte essencial da experiência mais rica e completa que tive em toda a minha vida.

Ao Dr. Liszt Yelson Coutinho Madruga

Agradeço por todos os ensinamentos, conversas, histórias, jogos e treinamentos durante meu estágio no exterior. Obrigado por me incentivar e pela confiança depositada. Você é uma pessoa ímpar e com certeza aprendi muito com você! Muito obrigado!

Ao Prof. Caio Sampaio

Meu amigo, no qual pude conviver durante todo o meu período de pós-graduação. Muito obrigado por todas as figurinhas (desnecessárias), risadas, conversas e lanches durante esse período. Obrigado pela amizade e convivência! Que ela perdure por muito tempo!

Aos meus amigos Jataienses

Por se fazerem presentes mesmo distantes, por serem grandes amigos e pessoas incríveis. Obrigado por cada risada, companheirismo, apoio e suporte

Agradecimentos Especiais

nos dias difíceis e também por comemorarem comigo nos dias alegres. Sinto muita falta de vocês no meu dia a dia, mas isso faz parte da nossa caminhada e luta diária! Torço muito pelo sucesso de vocês e só tenho a agradecer por nossas amizades de anos e que dure muitos anos ainda!

Aos meus amigos do exterior

Obrigado por todo incentivo, churrascos, conselhos e companheirismo. Vocês fizeram meus dias melhores durante esse período e só tenho a agradecer por toda amizade. Em especial aqui destaco a Fernanda e a Danielle que foram duas pessoas especiais durante esse processo!

Aos amigos do laboratório e pós-graduação

Obrigado por toda companhia, ideias, conselhos, frustrações, experiências e aprendizado com vocês. Considero cada um de vocês como irmãos, pois passamos tanto tempo juntos que nos importamos um com os outros! Passamos a ter empatia por todos ali presente, vivenciando as alegrias e tristezas de cada um! Obrigado por tudo!

Aos meus irmãozinhos de pesquisa: Thamires Cavazana, Lucas, Jéssica, Priscila Tiyoko, Raquel, Amanda, Luigi, Leandro, Mariana e Pedro Chaves.

Muito obrigado por toda ajuda, companheirismo, conhecimentos e risadas! De certa forma nos entendemos, nos conhecemos e criamos essa amizade que irei levar para o resto da minha vida! Muitas risadas e lágrimas nos fluxos, muitas histórias compartilhadas e isso que nos fazem únicos! Muito obrigado por toda essa vivência e parceria. Contem sempre comigo!

Agradecimientos

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do vice-diretor **Prof. Assoc. Luciano Tavares Ângelo Cintra**.

Ao programa de **Pós-Graduação em Ciências** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP representado pelo seu coordenador **Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan**, pela competência e qualidade na condução do programa de pós-graduação.

Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Lilian Sayuri Mada, Cristiane Regina Lui Matos, Lucas Sousa da Rocha e Elis Andréa Pinto** pela eficiência e profissionalismo.

Aos funcionários da área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Marcel, Luiz e Mário**, pela ajuda, atenção e suporte prestados.

À **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pelo apoio financeiro durante esses anos e ao **Programa Institucional de Internacionalização (CAPESPrint)**.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho,

Minha eterna gratidão!

Epígrafe

Epígrafe

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

Resumo

Morais, LA. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades de um novo cimento a base de hexametáfosfato de sódio**. 2025. Tese (Doutorado em Ciência, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2025.

O presente estudo avaliou as propriedades físico-químicas, antimicrobiana (Subprojeto 1-S1), citológica (Subprojeto 2-S2), potencial osteogênico e capacidade de biomineralização (Subprojeto 3-S3) de um cimento a base de hexametáfosfato de sódio (NaHMP). Em S1, o cimento experimental (CE) contendo 5% de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), 5% de clínquer, 20% de óxido de zircônio IV (ZrO_2) e 70% de NaHMP e manipulado com carboximetilcelulose de sódio (CMC) à 1,5% foi caracterizado através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS), espectrômetro de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) e avaliação do pH. Para avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado o teste de formação de halo de inibição para os microrganismos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Actinomyces israeli* (ATCC 12102), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e avaliação da citotoxicidade em cultura de células tronco-mesenquimais do tecido adiposo (ADSCs). A caracterização do CE apresentou granulações homogêneas com presença de O, P, Na e Ca. O CE apresentou redução do pH no primeiro dia avaliado e manteve o pH acima de 7 para todos os dias avaliados. No ensaio de difusão em ágar o grupo NaHMP apresentou maior atividade antimicrobiana para todos os microrganismos testados. O CE apresentou atividade antimicrobiana superior ao controle para *A. israeli* e semelhante para *C. albicans* e *S. mutans*. Após 1 dia de cultura de ADSCs o grupo controle (CT-Células) apresentou citotoxicidade semelhante ao CE, não havendo diferença estatística entre eles ($p < 0,05$). No S2, foi desenvolvido hidrogéis com os componentes do CE e avaliado a citotoxicidade e o potencial remineralizador em ADSCs. Foram confeccionados hidrogéis a base de CMC e caracterizados por MEV. Os grupos foram hidrogéis de CE, NaHMP, Ca(OH)_2 e discos de poliestirenos sem tratamento (controle, CT-PS). Para avaliação citológica, foram realizados testes de citotoxicidade, viabilidade celular, adesão e proliferação celular e quantificação do cálcio. Após 1 dia de cultura de ADSCs, todos os grupos

avaliados apresentaram citotoxicidade menor do que o grupo CT-Citotoxicidade. O CE apresentou citotoxicidade semelhante ao CT-PS. A viabilidade celular do CE foi semelhante ao grupo controle, após 7 dias. Todos os grupos avaliados apresentaram adesão e a proliferação celular após 4 e 7 dias de cultivo. Na quantificação de cálcio, o Ca(OH)_2 se mostrou com menores valores quando comparado ao CE. No S3, foi avaliado a resposta inflamatória, a deposição mineral e imunomarcagem de osteocalcina (OCN) do CE, Ca(OH)_2 e agregado de trióxido mineral (MTA). Tubos de polietileno contendo CE, NaHMP, MTA e Ca(OH)_2 , bem como tubos vazios (controle), foram implantados no tecido conjuntivo dorsal de rato Wistar ($n=8/\text{tempo}$) e avaliados após 7 e 30 dias. Após cada período, os tubos com tecido circundante foram removidos e processados histologicamente usando hematoxilina-eosina (H&E), Picrosirius red (PSR), Von Kossa (VK) e imuno-histoquímica para osteocalcina (OCN). Para coloração de H&E, não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos períodos de análise ($p<0,05$). A cápsula fibrosa foi espessa para todos os grupos avaliados em 7 dias. Em 30 dias, todos os grupos possuíam uma cápsula fibrosa fina. O PSR evidenciou que no período de 7 dias o grupo Ca(OH)_2 apresentou menor quantidade de fibras colágenas imaturas quando comparados aos grupos NaHMP e CE ($p<0,05$). Em 30 dias, o grupo MTA obteve o maior valor de fibras imaturas em relação aos demais grupos. Todos os grupos coraram para VK e luz polarizada nos tecidos adjacentes aos materiais, independente do tempo avaliado ($p<0,05$), exceto o controle. Com relação a OCN do CE para MTA, Ca(OH)_2 e NaHMP não apresentaram diferença estatística, independente do período avaliado ($p<0,05$). Conclui-se que o CE apresentou atividade antimicrobiana, baixa citotoxicidade para células tronco-mesenquimais do tecido adiposo, com potencial osteogênico e capacidade de biomineralização, sendo um material promissor para a remineralização do tecido dentário.

Palavras-chave: Fosfatos; hidróxido de cálcio; citotoxicidade; materiais biocompatíveis; capeamento da polpa dentária.

Abstract

Morais, LA. **Development and evaluation of the properties of a new cement based on sodium hexametaphosphate**. 2025. Thesis (Doctorate in Science, area of Children's Dental Health) - Faculty of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba 2025.

The present study evaluated the physicochemical properties, antimicrobial activity (Subproject 1-S1), cytological properties (Subproject 2-S2), osteogenic potential, and biomineralization capacity (Subproject 3-S3) of a cement based on sodium hexametaphosphate (NaHMP). In S1, the experimental cement (EC) containing 5% calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 5% clinker, 20% zirconium oxide IV (ZrO_2), and 70% NaHMP, manipulated with 1.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC), was characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), and pH evaluation. For antimicrobial activity, an inhibition zone test was conducted with microorganisms such as *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Actinomyces israeli* (ATCC 12102), *Candida albicans* (ATCC 10231), and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), along with cytotoxicity evaluation in adipose-derived stem cell cultures (ADSCs). The characterization of EC showed homogeneous granules with the presence of O, P, Na, and Ca. The EC showed a reduction in pH on the first day evaluated and maintained a pH above 7 for all evaluated days. In the agar diffusion test, the NaHMP group exhibited the highest antimicrobial activity against all tested microorganisms. The EC showed superior antimicrobial activity compared to the control group for *A. israeli* and similar results for *C. albicans* and *S. mutans*. After 1 day of ADSC culture, the control group (CT-Cells) showed cytotoxicity similar to EC, with no statistical difference between them ($p < 0.05$). In S2, hydrogels with the components of EC were developed and evaluated for cytotoxicity and remineralizing potential in ADSCs. Hydrogels based on CMC were fabricated and characterized by SEM. The groups included EC hydrogels, NaHMP, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, and untreated polystyrene disks (control, CT-PS). For cytological evaluation, tests for cytotoxicity, cell viability, adhesion, and proliferation, as well as calcium quantification, were performed. After 1 day of ADSC culture, all evaluated groups showed lower cytotoxicity than the CT-Cytotoxicity group. EC showed cytotoxicity

similar to CT-PS. The cell viability of EC was similar to the control group after 7 days. All evaluated groups showed cell adhesion and proliferation after 4 and 7 days of culture. In calcium quantification, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ showed lower values when compared to EC. In S3, the inflammatory response, mineral deposition, and osteocalcin (OCN) immunolabeling of EC, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, and mineral trioxide aggregate (MTA) were evaluated. Polyethylene tubes containing EC, NaHMP, MTA, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, and empty tubes (control) were implanted in the dorsal connective tissue of Wistar rats ($n=8/\text{time}$) and evaluated after 7 and 30 days. After each period, the tubes with surrounding tissue were removed and processed histologically using Hematoxylin and Eosin (H&E), Picrosirius Red (PSR), Von Kossa (VK), and immunohistochemistry for osteocalcin (OCN). For H&E staining, there was no statistical difference between the groups at any of the analysis periods ($p<0.05$). The fibrous capsule was thick for all evaluated groups at 7 days. At 30 days, all groups had a thin fibrous capsule. PSR staining revealed that at 7 days, the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ group exhibited fewer immature collagen fibers compared to the NaHMP and EC groups ($p<0.05$). At 30 days, the MTA group had the highest amount of immature fibers compared to the other groups. All groups stained positively for VK and polarized light in tissues adjacent to the materials, regardless of the evaluated time ($p<0.05$), except for the control group. Regarding OCN, there was no statistical difference between EC, MTA, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, and NaHMP, regardless of the evaluated period ($p<0.05$). In conclusion, EC showed antimicrobial activity, low cytotoxicity for adipose-derived mesenchymal stem cells, osteogenic potential, and biomineralization capacity, making it a promising material for dental tissue remineralization.

Keywords: Phosphates; calcium hydroxide; cytotoxicity; biocompatible materials; dental pulp capping.

Lista de figuras

CAPÍTULO 1

- Figura 1. (a) Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura da amostra do cimento experimental com um aumento de 500x; (b) Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura da amostra do cimento experimental com um aumento de 1000x. 37
- Figura 2. (a) Análise composicional espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) do cimento experimental. (b) Mapa em cores ilustrativas da superfície do cimento experimental. (c) Distribuição de P, O, Na e Ca respectivamente no cimento experimental. 37
- Figura 3. Espectros de varredura de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) do cimento experimental (CE) e seus componentes. Hexametáfosfato de sódio (NaHMP); hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$); óxido de zircônia (ZrO_2); clínquer e carboximetilcelulose (CMC). 38
- Figura 4. Valores médios de pH avaliados por 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 30 dias. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos ao longo do tempo. Hexametáfosfato de sódio (NaHMP); óxido de zircônia (ZrO_2); hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$); cimento experimental (CE); carboximetilcelulose (CMC); hexametáfosfato de sódio controle (NaHMP- CT); hidróxido de cálcio controle ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ – CT). 39
- Figura 5. Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição para os diferentes microrganismos avaliados. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos. Cimento experimental (CE); hexametáfosfato de sódio (NaHMP); hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e Clorexidina (CLX). 40

- Figura 6. (a) Citotoxicidade de ADSCs após 1 dia de cultura celular. 40
Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos. Cimento experimental (CE); controle com células sem tratamento (CT-Célula); controle com células mortas (CT-Citotoxicidade).

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura dos 55
hidrogéis. (a) Cimento experimental (CE); (b) hexametafosfato de sódio (NaHMP) e (c) hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2). As imagens foram realizadas com uma ampliação de 1.000X.
- Figura 2. (a) Citotoxicidade de ADSCs expostas aos hidrogéis após 1 56
dia de cultura celular. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos. Cimento experimental (CE); hexametafosfato de sódio (NaHMP); hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2); controle com poliestireno (CT - PS).
- Figura 3. Viabilidade celular de ADSCs expostas aos hidrogéis 57
usando o ensaio Alamar Blue. Letras distintas denotam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Cimento experimental (CE); hexametafosfato de sódio (NaHMP); hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2); controle com poliestireno (CT - PS).
- Figura 4. Imagens de microscopia de fluorescência de ADSCs 58
coradas com rodamina-faloidina (vermelho) e DAPI (azul) após 4 e 7 dias de cultura celular. Cimento experimental (CE); hexametafosfato de sódio (NaHMP); hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2); controle com poliestireno (CT - PS).

Figura 5. Contagem de células por cm^2 calculada usando o 58
programa ImageJ. Letras distintas mostram diferença
estatística entre os grupos. Cimento experimental (CE);
hexametáfosfato de sódio (NaHMP); hidróxido de cálcio
(Ca(OH)_2); controle com poliestireno (CT - PS).

Figura 6. Concentração de cálcio dos grupos normalizada pelo 59
conteúdo total de proteína. ($p \leq 0,05$). Letras distintas
mostram diferença estatística entre os grupos. Cimento
experimental (CE); hexametáfosfato de sódio (NaHMP);
hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2); controle com poliestireno (CT
- PS).

CAPÍTULO 3

Figura 1. Imagens representativas da coloração de H&E para 72
identificar a reação do tecido subcutâneo em 7 dias (a1-a5)
e em 30 dias (b1-b5). a1, b1 - Controle; a2, b2 – Hidróxido
de Cálcio (Ca(OH)_2); a3, b3 - MTA; a4, b4 – Hexametáfosfato
de sódio (NaHMP); a5, b5 – Cimento Experimental (CE).
(Coloração de Hematoxilina e Eosina, 100x).

Figura 2. Imagens representativas da coloração de PSR para 74
identificar a maturação de fibras colágenas em 7 dias (a1-
a5) e em 30 dias (b1-b5). a1, b1 - Controle; a2, b2 –
Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2); a3, b3 - MTA; a4, b4 –
Hexametáfosfato de sódio (NaHMP); a5, b5 - Cimento
Experimental (CE). (Coloração de Picrosirius Red, 400x).

Figura 3. Imagens representativas de Von Kossa em 7 dias (a1-a5) e 75
em 30 dias (b1-b5). (a1, b1 - Controle; a2, b2 – Hidróxido
de Cálcio; a3, b3 - MTA; a4, b4 – Hexametáfosfato de sódio
(NaHMP); a5, b5 - Cimento Experimental (CE)). (Coloração

de von Kossa, 100x) e luz polarizada em 7 dias (a6-a10) e em 30 dias (b6-b10). (a6, b6 - Controle; a7, b7 – Hidróxido de Cálcio; a8, b8 - MTA; a9, b9 – Hexametafosfato de sódio (NaHMP); a10, b10 - Cimento Experimental (CE)). (Luz Polarizada, 100x).

Figura 4. OCN - Imagens representativas da reação do tecido 75 subcutâneo em 7 dias (a1-a5) e em 30 dias (b1-b5). a1, b1 - Controle; a2, b2 – Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2); a3, b3 - MTA; a4, b4 – Hexametafosfato de sódio (NaHMP); a5, b5 – Cimento experimental (CE). (OCN, 1000x).

Lista de tabelas

CAPÍTULO 3

- Tabela 1. Escores e médias para infiltrado inflamatório e espessura da cápsula fibrosa para todos os grupos e períodos de análise. * Análise de variância de um critério; letras sobreescritas iguais indicam a ausência de diferença estatística entre os grupos em cada período de análise ($p>0.05$). 73
- Tabela 2. Porcentagens de fibras colágenas imaturas e maduras na cápsula fibrosa de acordo com os grupos aos 7 e 30 dias. * Teste ANOVA de um critério seguido do teste de Tukey, após um teste de normalidade; *, mesmas letras maiúsculas e minúsculas indicam ausência de diferença estatística entre os grupos aos 7 e 30 dias, respectivamente ($p>0.05$). 74
- Tabela 3. Média da imunorreatividade para OCN nos grupos de animais nos períodos de 7 e 30 dias. * Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos ($p<0.05$). 76

Sumário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	24
------------------	----

CAPÍTULO 1

RESUMO	29
ABSTRACT	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAIS E METODOS	32
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	44

CAPÍTULO 2

RESUMO	47
ABSTRACT	48
INTRODUÇÃO	49
MATERIAIS E METODOS	51
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	63

CAPÍTULO 3

RESUMO	66
ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAIS E METODOS	70
RESULTADOS	72
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81

ANEXOS	85
--------	----

INTRODUÇÃO GERAL

A polpa dentária é um tecido conjuntivo que, em associação com a dentina, forma a unidade dentina-polpa. Esse complexo dentina-polpa pode apresentar injúrias de dois tipos: periapicopatias, que são patologias oriundas de inflamação na polpa, que se estendem até a região apical do elemento dentário, ou através de traumas, bruxismo ou sobrecarga oclusal, e pulpopatias, que são necroses da polpa provocadas por cárie dentária, ou por fraturas, fissuras ou defeitos no desenvolvimento dental (Marcos, 2004). Os tratamentos do complexo dentina-polpa são sempre um desafio à manutenção da vitalidade do dente ou mesmo à sua permanência na cavidade. Dentre os tratamentos para manutenção da vitalidade temos os procedimentos conservadores, tais como o capeamento pulpar, pulpotomia e os procedimentos regenerativos para o tecido pulpar (Soares e Goldberg, 2011).

Especificamente ao capeamento pulpar, este depende primariamente da capacidade do tecido pulpar em se reparar. A polpa é um tecido conjuntivo altamente especializado, responsável pela vitalidade do dente. Sua principal função é produzir dentina, mas também exerce as funções de nutrição, proteção e reparação (Soares e Goldberg, 2011). Vários fatores interferem nessa reparação, como, idade do dente, condição periodontal e estágio de formação da raiz. Fatores clínicos como tamanho da exposição pulpar, natureza da exposição (traumática, mecânica ou lesão de cárie) e contaminação microbiológica do local, também são fatores determinantes para o sucesso do capeamento pulpar (Camp et al., 2002). Contudo, a atuação desses fatores clínicos na reparação tecidual, ainda não está totalmente esclarecida. O objetivo do capeamento pulpar é facilitar a cura da polpa pelo estímulo do tecido pelo material capeador, produzindo tecido mineralizado e fechando a área de exposição. Esta ação controla a microinfiltração e a penetração de bactérias e contaminantes.

O controle da infecção e a biocompatibilidade dos materiais usados para esse fim são fatores importantes na determinação do sucesso do tratamento (Schroder et al., 1985; Bjørndal e Mjör, 2001). Diferentes materiais já foram propostos como capeadores, entretanto, a busca por materiais mais adequados e com melhores propriedades físicas e biológicas permanece. O hidróxido de

cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) apresenta efeito bactericida (Camp et al., 2002; Keyes, 1970; Björndal et al., 2000), além de ser um material muito utilizado em procedimentos de exposição pulpar (Le Fournis et al., 2019, Taha, 2020). Porém, após o capeamento pulpar com esse agente convencional alcalino, em decorrência do elevado pH local, o tecido pulpar adjacente geralmente é alterado, formando uma zona de obliteração (Kashiwada et al., 1991). No tecido subjacente, mais apicalmente, ocorre a formação de uma zona de coagulação e necrose (Furusawa et al., 1991; Stanley et al., 1989, Yoshimine et al., 1995). Em outros casos, ocorre a formação de uma dentina reparadora sob o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e de uma ponte de dentina mineralizada, fechando a exposição pulpar (Camp et al., 2002). A avaliação do potencial reparador de um material em situações de agressão à polpa é essencial para a aplicação consciente de um material na prática clínica.

No início de 1990, o mineral trioxide aggregate (MTA) foi introduzido e, posteriormente, recebeu muita atenção como uma alternativa ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Torabinejad et al., 1993, 1995). A capacidade do MTA de induzir a dentinogênese reparadora foi bem demonstrada em estudos com animais, nos quais o capeamento pulpar direto foi realizado em polpas expostas mecanicamente na qual em comparação com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, o MTA induz a formação de dentina em uma taxa maior e com uma qualidade estrutural superior (Ford et al., 1996; Faraco e Holland, 2001; Dammaschke et al., 2010; Simon et al., 2011).

O MTA é uma preparação modificada de cimento Portland (composto principalmente de óxido de cálcio e dióxido de silício) (Camilleri et al., 2006; Roberts et al., 2008) e foi originalmente desenvolvido para selar várias comunicações entre o sistema de canal radicular e os tecidos peri-radulares (Torabinejad et al., 1999). Estudos in vitro também demonstraram que o MTA é biocompatível e, quando testado em sistemas de cultura de células, apresenta boa capacidade de selamento (Camilleri et al., 2006; Roberts et al., 2008) e propriedades antibacterianas (Eldeniz et al., 2006). A literatura apresenta estudos clínicos com avaliação histológica que demonstraram que o MTA mostra resultados comparáveis ou melhores que materiais à base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no que diz respeito à frequência de formação de ponte de dentina e grau de inflamação pulpar (Youssef et al., 2019; Aeinehchi et al., 2003; Iwamoto et al., 2006; Accorinte et al., 2008; Nair et al., 2008). Apesar de apresentar excelentes propriedades biológicas, o MTA possui limitações como as de manipulação,

aplicação e, em algumas situações, pode promover manchamento dos dentes, devido à presença de óxido de bismuto em sua composição, utilizado como radiopacificador (Darvell et al., 2011, Haapasalo et al., 2015, Marciano et al., 2015).

Durante o processo reparativo de polpas expostas, odontoblastos primários perdidos como resultado de extensos danos são substituídos por células semelhantes à odontoblastos recém-diferenciadas (Schroder et al., 1985; Goldberg, Smith, 2004). Esse processo é conhecido por seguir as etapas sequenciais de proliferação, migração e diferenciação das células progenitoras antes da secreção da matriz no local de exposição, embora ainda haja controvérsias a respeito das origens das células recém-diferenciadas e dos mecanismos de sinalização molecular subjacentes à sua diferenciação (Goldberg, Smith, 2004). O MTA é conhecido por estimular vários tipos de células, como os fibroblastos (Bonson et al., 2004) e células semelhantes a osteoblastos (Nakayama et al., 2005; Tani-Ishii et al., 2007) para induzir a expressão gênica de proteínas relacionadas ao tecido duro, como osteopontina (Bonson et al., 2004), osteonectina (Bonson et al., 2004) e osteocalcina (Tani-Ishii et al., 2007) in vitro. Assim, a regulação positiva dessas moléculas pode aumentar, pelo menos em parte, o potencial dentinogênico do MTA.

As células-tronco têm ganhado crescente destaque nas últimas décadas devido à sua capacidade de autorrenovação e multidiferenciação (McKay, 1997). Desde o primeiro isolamento das células-tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs) a partir do tecido adiposo, em 2001, essas células passaram a ser vistas como uma alternativa terapêutica promissora, superando outras fontes celulares em diversos aspectos. O interesse em torno das ADSCs tem se intensificado, especialmente quando comparadas a outras fontes de células-tronco, pois elas apresentam as seguintes vantagens: (1) são abundantes e de fácil acesso; (2) podem ser obtidas por um procedimento minimamente invasivo; (3) têm alta taxa de proliferação; (4) são adequadas para transplantes autólogos; e (5) possuem marcadores de superfície e potencial de multidiferenciação semelhantes aos das células-tronco derivadas do osso (BDSCs) (Zuk et al., 2001). Grupos aniônicos, como os fosfatos, têm a capacidade de atrair íons cálcio, podendo atuar como nucleadores de cristais de apatita (Li & Chang, 2008; Leone et al., 2008). Esse tratamento com fosfatos deixa a superfície do substrato

com maior quantidade de sítios doadores de elétrons, facilitando a adsorção de fosfato de cálcio na superfície (Neves et al., 2017). A adesão celular também é influenciada pela interação eletrostática com a superfície dos biomateriais, sendo relacionada aos componentes polares da energia livre de superfície, já que maiores valores de sítios doadores de elétrons favorecem a adesão celular (Harnett et al., 2007).

O hexametáfosfato de sódio (NaHMP) é um fosfato inorgânico cíclico (Kulaev, Vagabov, & Kulakovskaya, 2005) que tem sido adicionado a produtos fluoretados como dentifrícios (Camara et al., 2015, Camara et al., 2016) e géis (Conceição et al., 2015) com o objetivo de aumentar a capacidade de tais produtos de reduzir a desmineralização do esmalte e aumentar a remineralização. O NaHMP apresenta grande afinidade por íons metálicos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Al^+ , Fe^{3+}), formando complexos iônicos (Kura et al. 1984; Choi et al. 1993). Esta propriedade permite que este fosfato se ligue ao Ca^{2+} e Mg^{2+} da parede celular dos microrganismos, aumentando assim a permeabilidade das células, o que está relacionado à atividade antimicrobiana do NaHMP. Além disso, é importante ressaltar que o NaHMP é capaz de promover a diferenciação osteoblástica, além de promover o crescimento, diferenciação odontogênica e o potencial angiogênico. Logo, destaca-se o possível potencial terapêutico do fosfato para promover a regeneração pulpar e endodôntica regenerativa (Bae et al., 2015; 2016).

Sendo assim, na busca por materiais com melhores propriedades físicas e biológicas (Ishizaki NT et al., 2003; Yang IS et al., 2010) seria interessante avaliar um cimento com biocompatibilidade, fácil manipulação e ação antimicrobiana. Diante do exposto, este estudo busca avaliar um cimento à base de NaHMP, associado com $Ca(OH)_2$, óxido de zircônio e clínquer, considerando as propriedades antimicrobianas, perfil citotóxico e biomineralização..

Para abordar o tema proposto, o estudo foi apresentado em três capítulos distintos:

- Capítulo 1: **“Caracterização, atividade antimicrobiana e citotóxica de um cimento a base de hexametáfosfato de sódio”** (artigo preparado para a submissão ao periódico *Biomaterials*);

- Capítulo 2: **“Avaliação citológica das propriedades de um hidrogel contendo um cimento a base de hexametafosfato de sódio”** (artigo preparado para a submissão ao periódico *Biomaterials*);

- Capítulo 3: **“Avaliação da biocompatibilidade e imuno-histoquímica de um cimento à base de hexametafosfato de sódio”** (artigo preparado para a submissão ao periódico *Journal of Endodontics*);

O CE expressou um potencial bioativo semelhantes ao MTA e ao Ca(OH)_2 , uma vez que estimulou células conjuntivas a sintetizar osteocalcina, proteína envolvida no processo de mineralização e deposição de calcita amorfa no tecido conjuntivo. Dessa forma, o CE se mostra como um possível material para ser empregado na remineralização do tecido dentário.

6. REFERÊNCIAS

1. Schröder U, Ford TRP. Effects of pulp capping agents containing calcium hydroxide on the migration, proliferation and differentiation of pulp cells. *J Dent Res* 1985;64:541-548.
2. Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ. Regeneration of the dentin-pulp complex: from the laboratory to the clinic. *Adv Dent Res* 2011;23:340-345.
3. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19:591-595.
4. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root filling material. *J Endod* 1995;21:349-353.
5. Schmitt D, Lee J, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent* 2001;23:326-330.
6. Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate as pulp capping material. *J Am Dent Assoc* 1996;127:1491-1494.
7. Faraco IM, Holland R. Response of dog pulp to capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17:163-166.
8. Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schafer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistological comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod* 2010;36:814-819.
9. Camilleri J, Ford TR Pitt. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int J* 2006;39:747-754.
10. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Use of aggregated mineral trioxide material in endodontic treatment: a literature review. *Dent Mater* 2008;24:149-164.
11. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
12. Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Ørstavik D. Antibacterial effect of selected root filling materials. *J Endod* 2006;32:345-349.
13. Youssef AR, Emara R, Taher MM, AL-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, Siddiqui SS. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health* 2019;133.
14. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int J Endod* 2003;36:225-231.
15. Iwamoto CE, Adachi E, Pameijer CH, Barnes D, Romberg EE, Jeffies S. Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct pulp capping. *Am J Dent* 2006;19:85-90.

16. Accorinte MLR, Holland R, Reis A et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp capping agents in human teeth. *J Endod* 2008;34:1-6.
17. Nair PNR, Duncan HF, Ford TR Pitt, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized clinical trial. *Int J Endod* 2008;41:128-150.
18. Darvell BW, Wu RCT. MTA an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dent Mater* 2011;27:407-422.
19. Haapasalo M, Parhar M, Huang X, Wei X, Lin J, Shen Y. Clinical use of bioceramic materials. *Endod Top* 2015;32: 97-117.
20. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investig* 2015;2201-2209.
21. Kulaev IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV. The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley & Sons , West Sussex 2005; (2^a ed.).
22. Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JAS, Danelon M, Delbem ACB. Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. *Journal of Dentistry* 2015;43:1249-1254.
23. Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JAS, Danelon M, Delbem ACB. Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization in vitro. *Clinical Oral Investigation* 2016;20:1981-1985.
24. Conceição JM, Delbem ACB, Danelon M, Camara DM, Wiegand A, Pessan JP. Fluorine gel supplemented with sodium hexametaphosphate reduces erosive enamel wear in situ. *Journal of Dentistry* 2015;43:1255-1260.
25. Kura G, Ohashi S, Kura S. Complex formation of cyclic phosphate anions with bivalent cations. *J Inorg Nucl Chem* 1974;36:1605-1609.
26. Choi IK, Wen WW, Smith RW. The effect of a long chain phosphate on the adsorption of collectors on kaolinite. *Miner Eng* 1993;6:1191-1197.
27. Bae WJ, Jue SS, Kim SY, Moon JH, Kim EC. Effects of sodium tri- and hexametaphosphate on proliferation, differentiation, and angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod* 2015;896-902.
28. Bae WJ, Auh QS, Kim GT, Moon JH, Kim EC. Effects of sodium tri- and hexameta-phosphate in vitro osteoblastic differentiation in Periodontal Ligament and Osteoblasts, and in vivo bone regeneration. *Differentiation* 2016;257-269.
29. Ishizaki NT, Matsumoto K, Kimura Y, Wang X, Yamashita A. Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *J Endod* 2003;176-179.
30. Yang IS, Lee DS, Park JT, Kim HJ, Son HH, Park JC. Tertiary dentin formation after direct pulp capping with odontogenic ameloblast-associated protein in rat teeth. *J Endod* 2010;36(12):1956-62.
31. Gomes-Filho JE, Rodrigues G, Watanabe S et al. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. *Journal of Endodontics* 2009;35:1377–80.
32. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *Journal of Endodontics* 2017a;43:774–8.
33. Martins CM, de Azevedo Queiroz IO, Ervolino E, Cintra LTA, Gomes-Filho JE. RUNX-2, OPN and OCN expression induced by grey and white mineral trioxide aggregate in normal and hypertensive rats. *Int Endod J* 2008;51(6):641-648.
34. Willershausen I, Wolf T, Kasaj A, et al. Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. *Arch Oral Biol* 2013;58:1232-1237

35. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:221-225.
36. Cintra LT, de Moraes IG, Estrada BP, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, Bernardinelli N. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod* 2006;32:556–559.
37. Bernabé PF, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Moretto MJ, Lodi CS, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan E Jr. Histologic evaluation of the use of membrane, bone graft, and MTA in apical surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:309–314.
38. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Filho JA, Dezan EJ, Bernabé PF. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. *Dent Traumatol* 2012;28:452–456.
39. Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *J Endod* 2014;40:1485–1488.
40. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, de Oliveira SHP, Gomes-Filho JE. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J Endod* 2017b;43:2088–2092.
41. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O'Sullivan MI. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endod J* 2002;35:47–55.
42. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod* 2006;32:1094–1096.
43. Arikan V, Sonmez H, Sari S. Comparison of Two Base Materials Regarding Their Effect on Root Canal Treatment Success in Primary Molars with Furcation Lesions. *Biomed Res Int* 2016;1429286.
44. Katge FA, Patil DP. Comparative Analysis of 2 Calcium Silicate-based Cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as Direct Pulp-capping Agent in Young Permanent Molars: a Split Mouth Study. *J Endod* 2017;43:507–513.
45. Silveira CM, Pinto SC, Zedebski R de A, et al. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J* 2011;22:21-27.
46. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999;25(3):161-6.
47. Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. *Journal of Endodontics* 1988;14:229–35.
48. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri OS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2012;100:1773–81.
49. Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol* 1971;4:83–95.
50. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe O Júnior. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dental J* 1995;6:85–90.
51. Parirokh M, Torabinejad M. Agregado de trióxido mineral: uma revisão abrangente da literatura - Parte III: Aplicações clínicas, desvantagens e mecanismo de ação. *J Endod* 2010;36:400–413.

52. Harnett EM, Alderman J, Wood T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2007;55:90-97.
53. Al-Harbi N, Mohammed H, Al-Hadeethi Y, Bakry AS, Umar A, Hussein MA, Abbassy MA, Vaidya KG, Al Berakdar G, Mkawi EM, et al. Silica-Based Bioactive Glasses and Their Applications in Hard Tissue Regeneration: A Review. *Pharmaceuticals* 2021;14:75.
54. Accorinte ML, Holland R, Reis A, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod* 2008;34:352-6.
55. Hinata G, Yoshioka K, Han L, Edanami N, Yoshioka N, Okiji T. Bioactivity and biomineralization ability of calcium silicate-based pulp-capping materials after subcutaneous implantation. *Int Endod J* 2017;50(Suppl 2):e40-e51.
56. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J* 2018; 51: 284-317.
57. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod* 2007;33:836-839.
58. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducky P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*. 1998;23:187-196.
59. Hosseini S, Naderi-Manesh H, Vali H, et al. Contribution of osteocalcin-mimetic peptide enhances osteogenic activity and extracellular matrix mineralization of human osteoblast-like cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019;173:662-671.
60. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental m. *J Dent* 1994; 22:352-4.