



**SINVAL PEREIRA DO AMARAL JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E  
CAPACIDADE DE BIOMINERALIZAÇÃO DE CIMENTOS  
ENDODÔNTICOS OBTURADORES RESINOSOS**

Araçatuba - SP  
2026

**SINVAL PEREIRA DO AMARAL JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E  
CAPACIDADE DE BIOMINERALIZAÇÃO DE CIMENTOS  
ENDODÔNTICOS OBTURADORES RESINOSOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual Paulista  
(UNESP), Faculdade de Odontologia  
de Araçatuba, para obtenção do  
título de Mestre.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos  
Roberto Emerenciano Bueno

Araçatuba - SP  
2026

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A485a Amaral Júnior, Sinval Pereira do.  
Avaliação da resposta inflamatória e capacidade de biomineralização de cimentos endodônticos obturadores resinosos / Sinval Pereira do Amaral Júnior. – Araçatuba, 2026  
36 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientador: Prof. Carlos Roberto Emerenciano Bueno

1. Biomineralização 2. Endodontia 3. Inflamação  
4. Teste de materiais I. T.

Black D24  
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## RESUMO

AMARAL JÚNIOR, S. P. **Avaliação da resposta inflamatória e capacidade de biomineralização de cimentos endodônticos obturadores resinosos.** 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

A obturação do sistema de canais radiculares objetiva preencher espaços vazios antes ocupado pela polpa radicular, visando selamento hermético, reparo e selamento biológico. Portanto, características como biocompatibilidade e biomineralização são fundamentais dos cimentos obturadores. O presente estudo utilizou 20 ratos Wistar em dois períodos de 7 e 30 dias (n=10) submetidos à implante subcutâneo de tubos de polietileno, preenchidos por cimentos endodônticos obturadores resinosos Endosealer, Endosealer Plus, Endosealer Premium e um tubo vazio como controle, para avaliação da resposta inflamatória e indução de mineralização. Após 7 e 30 dias, os animais foram eutanasiados e os tubos de polietileno removidos com os tecidos adjacentes. Infiltrado inflamatório e espessura da cápsula fibrosa foram avaliados histologicamente, através da atribuição de escores inflamatórios (escores 0, 1, 2 e 3), de acordo com a intensidade da inflamação. A presença ou ausência de biomineralização foi avaliada pela coloração de Von Kossa e sem coloração para análise de cristais birrefringentes sob luz polarizada. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste estatístico com significância de 5%. Aos 7 dias, não houve diferença significativa entre os cimentos e grupo controle ( $P > .05$ ). Após 30 dias, o grupo Endosealer Premium apresentou maior reação inflamatória em relação ao grupo controle ( $P < .05$ ). Embora tenha ocorrido biomineralização em algumas amostras, a maioria dos espécimes não apresentou indícios de biomineralização. Os cimentos avaliados foram biocompatíveis e induziram pouca biomineralização.

**Palavras-chave:** biomineralização, endodontia, inflamação, teste de materiais.

## ABSTRACT

AMARAL JÚNIOR, S. P. **Evaluation of the inflammatory response and biomineralization capacity of resin-based endodontic sealers.** 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

The obturation of the root canal system aims to fill empty spaces previously occupied by the pulp, aiming for hermetic seal, repair, and biological seal. Therefore, characteristics such as biocompatibility and biomineralization are fundamental features of endodontic sealers. The present study used 20 Wistar rats in two experimental periods of 7 and 30 days (n=10) subjected to subcutaneous implantation of polyethylene tubes filled with Endosealer, Endosealer Plus, and Endosealer Premium resin endodontic sealers, and an empty tube as a control, to evaluate the inflammatory response and induction of mineralization. After 7 and 30 days, animals were euthanized and polyethylene tubes were removed along with the adjacent tissues. Inflammatory infiltrate and fibrous capsule thickness were histologically evaluated by assigning inflammatory scores (scores 0, 1, 2, and 3) according to the intensity of the inflammation. The presence or absence of biomineralization was assessed by Von Kossa staining and without staining for analysis of birefringent crystals under polarized light. The data were tabulated and subjected to statistical test with a significance level of 5% ( $P < .05$ ). At 7 days, there was no significant difference between the sealers and the control group ( $P > .05$ ). After 30 days, the Endosealer Premium group showed a greater inflammatory reaction compared to the control group ( $P < .05$ ). Although biomineralization occurred in some samples, most specimens showed no evidence of biomineralization. The sealers evaluated were biocompatible and induced mild biomineralization.

**Keywords:** biomineralization, endodontics, inflammation, materials testing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do tubo de polietileno para implante subcutâneo.	14
Figura 2 - Cirurgia para implantação dos tubos de polietileno no tecido subcutâneo do animal.	16
Figura 3 - Mapa cirúrgico (Posicionamento dos tubos de polietileno)	16
Figura 4 - Remoção dos tubos de polietileno e do tecido circundante.	17
Figura 5 - Análise de biocompatibilidade.	20
Figura 6 - Análise de biomineralização.	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cimentos testados e suas composições de acordo com a bula do fabricante. 14

Tabela 2 - Número de amostras de cada grupo com escores inflamatórios e mediana; espessura de cápsula fibrosa e número de amostras que apresentaram mineralização. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística ( $p < .05$ ). 21

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ENDO7 - Endosealer 7 dias

PLUS7 - Endosealer plus 7 dias

PREMIUM7 - Endosealer premium 7 dias

CONTROLE7 - Controle 7 dias

ENDO 30 - Endosealer 30 dias

PLUS30 - Endosealer plus 30 dias

PREMIUM30 - Endosealer premium 30 dias

CONTROLE30 - Controle 30 dias

HE - Hematoxilina e eosina

VK - Von kossa

PL - Luz polarizada

n - Tamanho da amostra

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	10
2 - OBJETIVO .....	12
3 - METODOLOGIA .....	12
3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	12
3.2 OBTENÇÃO DOS TUBOS.....	13
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	14
3.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA IMPLANTE SUBCUTÂNEO.....	15
3.5 EUTANÁSIA .....	16
3.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	17
3.7 ANÁLISE DA RESPOSTA TECIDUAL (CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E CÁPSULA FIBROSA) .....	18
3.8 ANÁLISE DE BIOMINERALIZAÇÃO .....	18
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	18
4 - RESULTADOS.....	19
4.1 BIOCOMPATIBILIDADE.....	19
4.2 BIOMINERALIZAÇÃO .....	20
5 - DISCUSSÃO .....	22
6 - CONCLUSÃO .....	26
7 - REFERÊNCIAS.....	26
8 - ANEXOS .....	35

## 1 - INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico é um procedimento odontológico comum realizado quando a polpa dental é danificada de forma irreversível, com o objetivo de reparar as estruturas apicais e periapicais previamente alteradas, geralmente por cárie, ou ainda mesmo realizada na ausência de infecção ou inflamação, para manutenção da saúde periapical (LOPES et al., 2020). Seu sucesso depende de um adequado planejamento de instrumentação, irrigação, desinfecção (quando necessário) e obturação (KHANDELWAL et al., 2022). É essencial remover todo o tecido pulpar, detritos dentinários e redução de microrganismos do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico para que se possa obter um espaço desinfectado e modelado que acomodará o material obturador. O preenchimento tridimensional do canal reduz a possibilidade de recorrência infecções endodônticas (DIOGUARDI et al., 2022).

A obturação é o preenchimento e selamento de um canal radicular preparado, realizada com guta percha e cimento obturador. A guta percha ocupa o espaço de maior volume do canal radicular, enquanto o cimento flui para áreas de irregularidades ou não atingidas pelo preparo biomecânico, além de complementar o selamento dentina/guta-percha (BHANDI et al., 2021). A obturação deve alcançar um alto nível de adaptação às paredes do canal preparado e o material preenchedor deve penetrar nos túbulos dentinários, se possível, onde pode exercer importante efeito inibitório sobre o *E. faecalis* (GUTMANN, 1993; BALGUERIE et al., 2011; SALEH et al., 2004). Cimentos obturadores são essenciais para formar uma barreira impermeável entre a guta percha e as paredes do canal radicular (SIQUEIRA JR et al., 2000). A importância deles foi descoberta no início do século XX quando constataram que obturações realizadas apenas com guta percha frequentemente levavam a periodontite apical (ORSTAVIK, 2005).

Os cimentos obturadores devem apresentar propriedades biológicas, físicas e químicas adequadas (GATEWOOD, 2007; SAXENA et al., 2013),

como boa adesividade, tempo de trabalho suficiente para sua correta manipulação, ausência de alterações dimensionais após presa, radiopacidade, ausência de manchamento da estrutura dentária, solubilidade a solventes, insolubilidade aos fluídos orais, atividade antimicrobiana, tolerância tecidual e biocompatibilidade (COLOMBO et al., 2018). Embora existam diferentes cimentos obturadores disponíveis no mercado e novos materiais estejam constantemente sendo desenvolvidos, o material obturador ideal que forneça todas essas características favoráveis ainda não existe (WONG et al., 2017).

Biocompatibilidade é a capacidade de um material ou substância de induzir uma resposta do hospedeiro apropriada em uma aplicação específica (SAMPAIO et al., 2023). Cimentos obturadores devem ser biocompatíveis, porque os componentes presentes neles podem atuar como corpo estranho e induzir reações biológicas que variam de uma inflamação persistente, a necrose do ligamento periodontal, especialmente quando extravasados nos tecidos periradiculares (DA SILVA et al., 2018).

Bioatividade é a propriedade de um biomaterial que interage com tecidos vivos e induz ou modula a atividade biológica, levando ao reparo (WILLIAMS, 2022). Um material bioativo tem a habilidade de criar uma camada de hidroxiapatita quando está em contato com fluido tecidual rico em cálcio e fosfato.

Cimentos obturadores disponíveis comercialmente são categorizados de acordo com seus componentes químicos: à base de óxido de zinco e eugenol, ionômero de vidro, silicone, resina e o mais recentemente desenvolvido cimento biocerâmico. Essa diversidade de materiais obturadores requer avaliação de suas respostas biológicas em cultura de células e em modelos animais antes do seu uso em ensaios clínicos para provar se seu uso é seguro dentro de condições clínicas.

Em geral, os cimentos resinosos presentes no mercado apresentam boas propriedades físico-químicas como: fluidez, solubilidade, estabilidade dimensional, capacidade seladora, radiopacidade e aderência a dentina, e

ainda uma baixa toxicidade e efeitos antibacterianos (Álvarez-Vásquez et al., 2024). No entanto, apontou que sua principal desvantagem é a falta de bioatividade e capacidade de biomineralização. Esta categoria de cimentos, conta com cimentos resinosos com ou sem hidróxido de cálcio na sua composição.

Recentemente introduzidos no mercado nacional, mas ainda sem respaldo científico para uso, os cimentos resinosos Endosealer e Endosealer Premium (Maquira – Maringá – PR – Brasil), possuem em sua composição uma matriz resinosa e hidróxido de cálcio. Adicionalmente, o cimento Endosealer Plus (Maquira – Maringá – PR – Brasil), também possui matriz resinosa, porém sem hidróxido de cálcio na sua composição.

Diante da introdução de cimentos obturadores no mercado sem dados na literatura de seu comportamento biológico, é fundamental que estudos sejam realizados para avaliar a resposta tecidual inflamatória e a capacidade de deposição de tecido mineralizado.

## **2 - OBJETIVO**

Avaliar *in vivo* em ratos wistar a biocompatibilidade e a capacidade de biomineralização dos cimentos à base de resina epóxi com e sem hidróxido de cálcio, por meio da análise da resposta inflamatória subcutânea e deposição de tecido mineralizado. A hipótese nula é de que não há diferenças na resposta biológica entres esses materiais.

## **3 - METODOLOGIA**

### **3.1 Obtenção dos Animais.**

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, sob o número de processo FOA nº 131-2025 (Anexo I). Foram utilizados 20 ratos machos Wistar, pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais

foram mantidos em gaiolas coletivas com quatro ratos por gaiola e alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água ad libitum. As gaiolas foram mantidas em gabinete biotério STD-5 (Vidy - Taboão da Serra – SP – Brasil) com temperatura oscilando entre 22 e 24°C e com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). A determinação do tamanho amostral (20 animais, 10 animais para cada período experimental de 7 e 30 dias), foi realizada com base nas diretrizes da norma ISO 10993-6 (ISO 10993-6, 2007) que define padrões aceitáveis para avaliação biológica na experimentação animal. Embora a norma não defina número mínimo a ser utilizado, existe uma ampla literatura científica consolidada sobre estudos de biocompatibilidade de cimentos endodônticos, utilizando a técnica de implante subcutâneo com desenho experimental similar (ELIAS et al., 2024; OKAMOTO et al., 2022; INADA et al. 2024). Este número de animais permite que o estudo seja realizado mesmo que haja perdas de animais ou amostras.

### **3.2 Obtenção dos Tubos.**

Os tubos de polietileno utilizados para inserção dos materiais a serem testados foram confeccionados a partir de cortes de sonda uretral número 4 (Mac Med, São Paulo, Brasil), com 1,5mm de diâmetro externo e 1cm de comprimento (Bueno et al. 2016, Benetti et al. 2018, Bueno et al. 2018) os quais serviram para acomodação dos materiais experimentais (Figura 1).

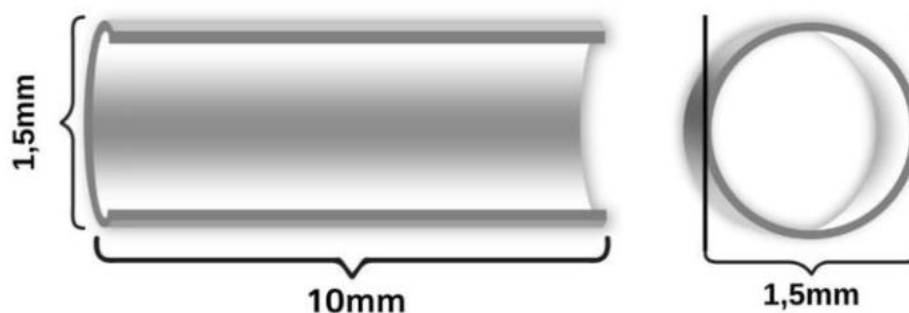


Figura 1 - Esquema do tubo de polietileno para implante subcutâneo.

### 3.3 Grupos experimentais

Endosealer 7 dias (ENDO7); Endosealer Plus 7 dias (PLUS7); Endosealer Premium 7 dias (PREMIUM7); Controle 7 dias (CONTROLE7).

Endosealer 30 dias (ENDO30); Endosealer Plus 30 dias (PLUS30); Endosealer Premium 30 dias (PREMIUM30); Controle 30 dias (CONTROLE30).

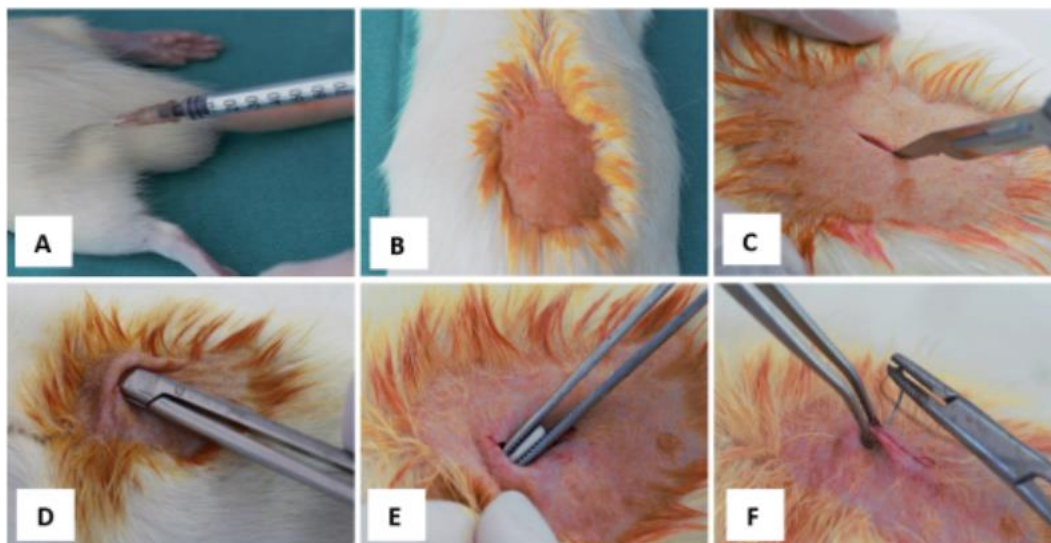
Os períodos experimentais de 7 e 30 dias, seguem a recomendação da norma ISO 10993-6 (ISO 10993-6, 2007), que preconiza pelo menos 2 períodos experimentais, um inicial (7 a 14 dias) para avaliar a inflamação inicial ou aguda, e um período tardio de ao menos 30 dias para avaliar a evolução da inflamação (crônica), além de diversos estudos mostrarem que tais períodos são suficientes para análise de biocompatibilidade e biomineralização (ALVES SILVA et al., 2020; CINTRA et al., 2017; BUENO et al., 2023a).

Tabela 1 - Cimentos testados e suas composições de acordo com a bula do fabricante.

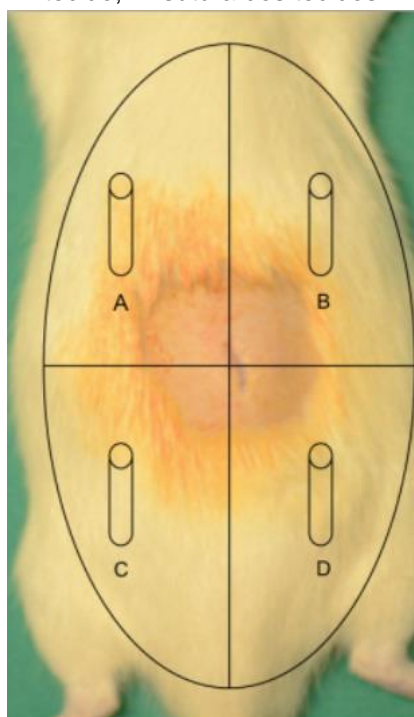
Cimento	Composição	Apresentação/ Manipulação	Fabricante
Endosealer	<b>Pó:</b> Hidróxido de cálcio, amina e radiopacificadores <b>Líquido:</b> Resina epóxi	Pó-líquido / Manual	Maquira, Maringá, PR, Brasil
Endosealer Plus	<b>Pasta Ambar:</b> Espessantes, aminas, radiopacificadores, solventes e estabilizantes. <b>Pasta Branca:</b> Espessantes Resina epóxi, radiopacificadores, solventes e estabilizantes	Seringa dupla (Pasta-pasta) / Automistura	Maquira, Maringá, PR, Brasil
Endosealer Premium	<b>Pó:</b> Hidróxido de cálcio, amina e radiopacificadores <b>Líquido:</b> Resina epóxi	Pó-líquido / Manual	Maquira, Maringá, PR, Brasil

### **3.4 Procedimentos cirúrgicos para implante subcutâneo**

Foram utilizados 10 animais para cada período experimental, sendo esses períodos de 7 e 30 dias, totalizando 20 animais. Cada animal recebeu quatro implantes: Endosealer, Endosealer Plus, Endosealer Premium e um tubo vazio como controle em um experimento. Os materiais foram manipulados de acordo com a bula de cada fabricante (Anexo II) e levados com lentulo (Dentsply Maillefer, Tulsa, USA) em baixa rotação (300rpm) para preencher os tubos a serem implantados. Para realização da intervenção cirúrgica, os animais foram submetidos à anestesia geral com xilazina (25mg/kg) e quetamina (50mg/kg) misturadas na mesma seringa, via intramuscular (região posterior da pata traseira do animal) (Figura 2A). Logo após foi realizada a depilação de uma pequena área dorsal (tricotomia), suficiente para a incisão, e antisepsia com polivinilpirrolidona a 1% (Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil) (Figura 2B), onde foi realizada uma incisão longitudinal com lâmina de bisturi número 15C acompanhando a linha mediana, com extensão entre 1 a 2cm atingindo o tecido subcutâneo (Figura 2C). Desta forma, foi realizada divulsão (Figura 2D) e com o auxílio de uma pinça os tubos de polietileno foram implantados do lado direito e esquerdo no tecido subcutâneo dos animais, em 4 sítios (figura 3). A incisão longitudinal da pele foi então suturada com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) e uma nova antisepsia foi realizada. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em gaiolas apropriadas, sendo eles dispostos em 5 animais por gaiola, onde foram aguardados os períodos experimentais.



**Figura 2** - Cirurgia para implantação dos tubos de polietileno no tecido subcutâneo do animal. **A:** Anestesia intramuscular; **B:** Tricotomia e antissepsia; **C:** Incisão dos tecidos de 1 a 2cm de comprimento; **D:** Divulsão dos tecidos para a criação das lojas; **E:** implantação dos tubos no tecido; **F:** sutura dos tecidos.

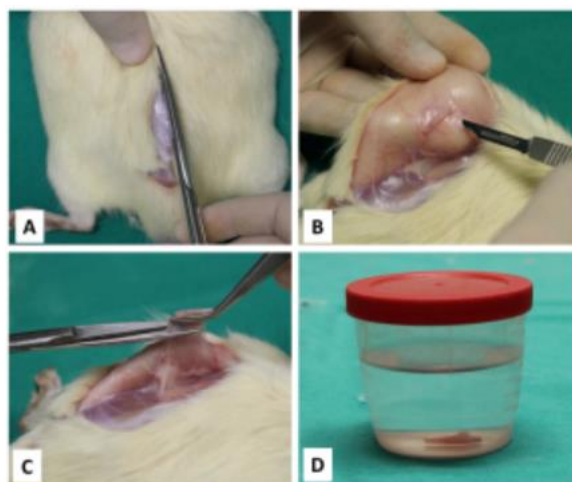


**Figura 3** - Mapa cirúrgico (Posicionamento dos tubos de polietileno)

### 3.5 Eutanásia

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados, por overdose anestésica, para obtenção das peças contendo o

tubo de polietileno, circundado por tecido conjuntivo adjacente. As peças foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formalina a 10%, tamponada com pH neutro (Figura 4), durante as primeiras 24 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda solução de fixação. Após o período de lavagem as peças foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.



**Figura 4** - Remoção dos tubos de polietileno e do tecido circundante.

**A:** Corte do tecido do dorso do animal para ter acesso às lojas; **B:** Localização do tubo implantado; **C:** Corte do tecido circundante ao tubo; **D:** Fixação do espécime em solução formalina 10%.

### 3.6 Processamento Histológico

Após inclusão, as peças foram cortadas em micrótomo Leica RM 2045 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) com cortes semi-seriados, com 5 $\mu$ m de espessura para serem coradas com hematoxilina e eosina (HE), 10  $\mu$ m para serem coradas de acordo com a técnica de Von Kossa (VK) ou permanecerem sem coloração para serem observadas sob luz polarizada (PL). Considerando a perda de animais e amostras, foi definido um número de amostras viáveis para análise de 7 por grupo sendo um número viável conforme mostra a literatura (BUENO et al., 2023b).

### **3.7 Análise da resposta tecidual (Células inflamatórias e cápsula fibrosa)**

A avaliação da resposta tecidual produzida pelos materiais, foi realizada segundo critérios descrito na ISO/TR 7405-1997(E) (International Organization for Standardization. Dentistry). Desta forma, foi analisado o número aproximado de células inflamatórias presentes em aumento de 400x. A ausência de células inflamatórias recebeu escore 0 (zero). Quando o número de células inflamatórias foi inferior a 25, o infiltrado inflamatório foi considerado pequeno (escore 1). O critério moderado (escore 2) foi atribuído quando detectadas de 25 a 125 células inflamatórias. Se essas células ocorressem em número superior a 125, o infiltrado inflamatório foi considerado severo ou intenso (escore 3) (Bueno et al. 2016, Benetti et al. 2018, Bueno et al. 2018). Quanto à espessura da cápsula fibrosa, os seguintes escores foram utilizados: escore 0 (zero) para cápsula fibrosa considerada fina, de espessura inferior a 150µm ou escore 3 para cápsula fibrosa considerada espessa, superior a 150µm (Bueno et al. 2016, Benetti et al. 2018, Bueno et al. 2018).

### **3.8 Análise de biomineralização**

A avaliação da capacidade de biomineralização foi por meio da coloração de Von Kossa (VK) e sem coloração para ser observada sob luz polarizada (PL), marcadas como presente ou ausentes. Quando houve presença de estruturas mineralizadas, a coloração de VK mostrou estruturas coradas em preto/castanho escuro e a análise de luz polarizada mostrou estruturas birrefringentes à luz (Bueno et al. 2016, Benetti et al. 2018, Bueno et al. 2018).

### **3.9 Análise estatística**

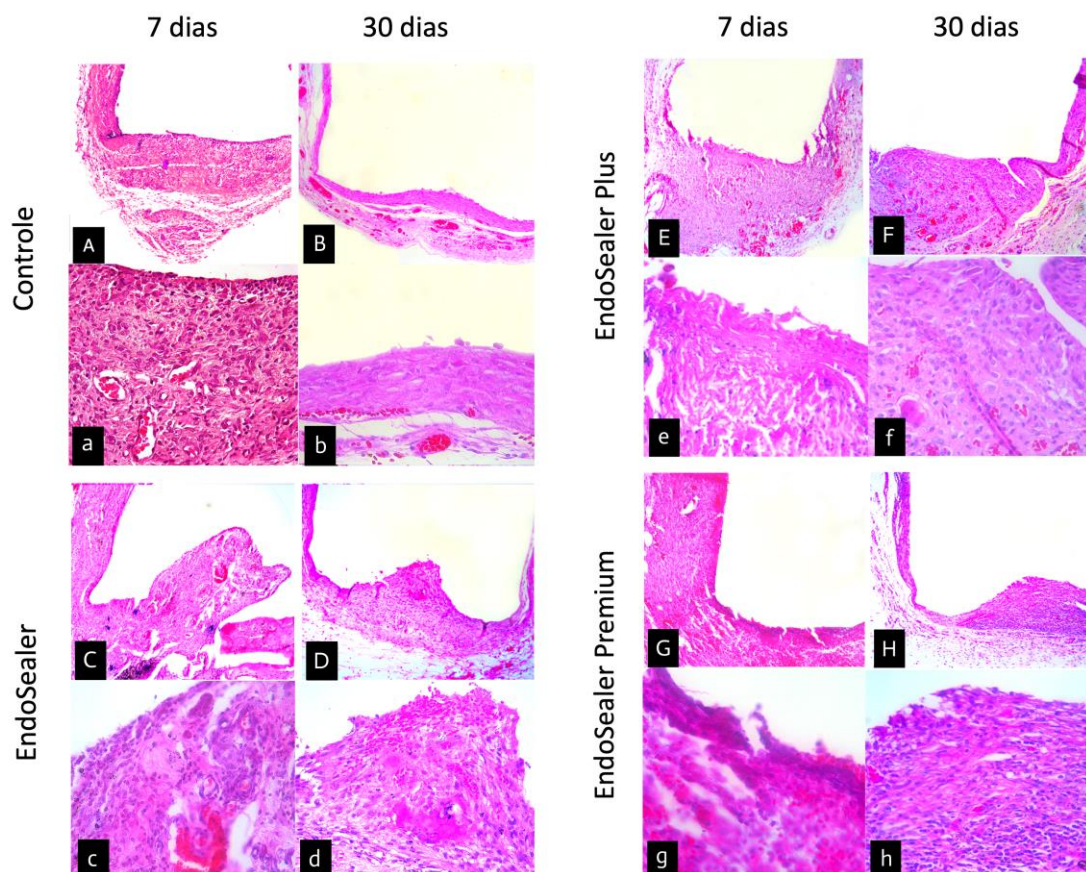
Ao fim das análises, todos os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com um nível de significância de 5% ( $P < 0.05$ ), já que foram atribuídos scores (dados categóricos ordinais sem distribuição normal e sem intervalos iguais entre as categorias) e post-hoc

Dunn com correção de Bonferroni para dados que apresentaram diferença estatística significativa.

## **4 - RESULTADOS**

### **4.1 Biocompatibilidade**

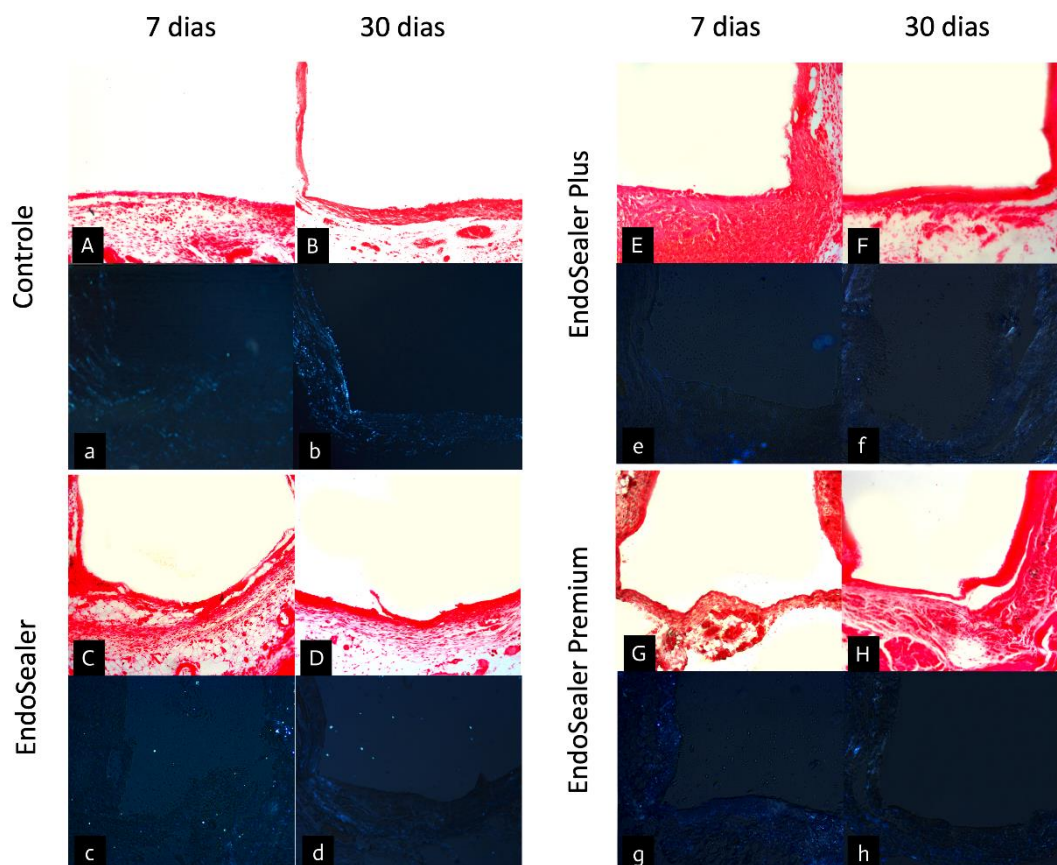
Após obter as lâminas coradas com hematoxilina e eosina, foi possível verificar a intensidade do infiltrado inflamatório e espessura da capsula fibrosa. Para o período experimental de 7 dias (Figura 5: A, a; C, c; E, e; G, g), o teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p = 0,245$ ) (Tabela 2). No período de 30 dias (Figura 5: B, b; D, d; F, f; H, h), o teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos ( $p = 0,008$ ), sendo então realizado o teste post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni para comparações múltiplas pareadas (Tabela 2). A análise post-hoc identificou diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo CONTROLE30 e o grupo PREMIUM30 ( $p = 0,014$ ) (Tabela 2). As comparações entre CONTROLE30 e ENDO30, bem como entre CONTROLE30 e PLUS30, apresentaram valores de  $p = 0,052$ , não atingindo significância estatística após a correção de Bonferroni. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais ENDO30, PLUS30 e PREMIUM30 ( $p = 1,000$  para todas as comparações) (Tabela 2). Com relação a espessura da capsula fibrosa, para todos os grupos do tempo experimental de 7 dias, foi observada capsula fibrosa espessa (Figura 5, Tabela 2). Com relação aos grupos de tempo experimental de 30 dias, os grupos CONTROLE30 e PREMIUM30 apresentaram cápsula fibrosa fina, enquanto os grupos ENDO30 e PLUS30 apresentaram capsula fibrosa espessa (Figura 5, Tabela 2).



**Figura 5** - Análise de biocompatibilidade.  
(Coloração HE – A, B, C, D, E, F, G, H Aumento 100X; a, b, c d, e, f, g, h Aumento 400X).

## 4.2 Biomineralização

A avaliação da capacidade de biomineralização foi feita por meio da coloração de Von Kossa (VK) e sem coloração para ser observada sob luz polarizada (PL) (Bueno et al. 2016, Benetti et al. 2019, Bueno et al. 2019). Nas avaliações de biomineralização dos grupos de 7 dias (Figura 6: A, a; C, c; E, e; G, g), foi possível observar resultado positivo tanto para VK quanto para PL em 1 amostra do grupo ENDO7 e 2 amostras do grupo PREMIUM7, enquanto os grupos CONTROLE7 e PLUS7 não apresentaram amostras positivas para VK e PL. Para os grupos de 30 dias (Figura 6: B, b; D, d; F, f; H, h), foi possível observar resultado positivo para VK e PL em 2 amostras dos grupos ENDO30 e PREMIUM30 e os grupos CONTROLE30 e PLUS30 não apresentaram amostras positivas.



**Figura 6** - Análise de biomineralização.  
(Von Kossa e Luz Polarizada) Aumento 100x.

**Tabela 2** - Número de amostras de cada grupo com escores inflamatórios e mediana; espessura de cápsula fibrosa e número de amostras que apresentaram mineralização. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística ( $p < .05$ ).

Grupos	Scores				Mediana	Cápsula			n
	0	1	2	3		Fibrosa	VK	PL	
<b>7 Dias</b>									
<b>CONTROLE7</b>	0	2	4	1	2 <sup>a</sup>	Espessa	0	0	7
<b>ENDO7</b>	0	0	5	2	2 <sup>a</sup>	Espessa	1	1	7
<b>PLUS7</b>	0	1	4	2	2 <sup>a</sup>	Espessa	0	0	7
<b>PREMIUM7</b>	0	0	4	3	2 <sup>a</sup>	Espessa	2	2	7

Grupos	Scores				Mediana	Cápsula Fibrosa	VK	PL	n
	0	1	2	3					
<b>30 Dias</b>									
<b>CONTROLE30</b>	1	6	0	0	1 <sup>a</sup>	Fina	0	0	7
<b>ENDO30</b>	0	2	4	1	2 <sup>a</sup>	Espessa	2	2	7
<b>PLUS30</b>	0	2	4	1	2 <sup>a</sup>	Espessa	0	0	7
<b>PREMIUM30</b>	0	1	5	1	2 <sup>b</sup>	Fina	2	2	7

## 5 - DISCUSSÃO

Muitos cimentos endodônticos são lançados no mercado, o que nos alerta sobre a importância de pesquisas que avaliem esses materiais de forma biológica e clínica (AAE, 2013). Na presente pesquisa, a hipótese nula foi parcialmente aceita, uma vez que os cimentos demonstraram diferença em biocompatibilidade em apenas em um período experimental.

Para realização dessas pesquisas, um método clássico na literatura é o implante subcutâneo, idealizado por Torneck em 1966. Torneck em sua primeira pesquisa testando esta inovadora técnica, visava avaliar a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos a tubos de polietileno implantados. Ele notou que, ao realizar implantes subcutâneos com tubos de polietileno, não gerava uma reação inflamatória significativa (TORNECK, 1966), o que possibilitou os estudos subsequentes usarem esta referência como controle, gerando protocolos que são utilizados até os dias atuais (ISO, 1997; ISO, 2007; OLSSON, 1981; ISO, 1997).

A análise de biocompatibilidade por meio da coloração de HE revelou que todos os grupos experimentais apresentaram infiltrado inflamatório moderado aos 7 dias, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles ou em relação ao controle. Este padrão de resposta inflamatória inicial é esperado por conta da composição dos cimentos utilizados, e está de acordo com estudos prévios que avaliaram cimentos à base de resina epóxi (HOLLAND et al, 1999; CINTRA et al, 2006; GOMES-FILHO et al, 2011;

CINTRA et al, 2013; GOMESFILHO et al, 2010; GOMES-FILHO et al, 2015;). CINTRA et al. (2017) observaram que o cimento Sealer Plus (MK Life, Porto Alegre, RS, Brasil), um cimento à base de resina epóxi contendo hidróxido de cálcio, apresentou inflamação moderada aos 7 dias, similar ao AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany), corroborando os achados do presente estudo. A resposta inflamatória inicial pode ser atribuída à liberação de componentes não polimerizados dos cimentos resinosos e ao trauma cirúrgico, que podem causar irritação tecidual transitória.

Aos 30 dias, apesar de PREMIUM30 demonstrar uma tendência na diminuição do infiltrado inflamatório, observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao CONTROLE30 ( $p = 0,014$ ) que indica aumento da inflamação. Porém quando comparado aos demais grupos, PREMIUM30 não apresentou diferença estatisticamente significativa. Alves Silva et al. (2020) relataram que o AH Plus apresentou aumento da reação inflamatória aos 30 dias, porém não apresentou diferença significativa aos 60 dias, indicando que o cimento apresentou biocompatibilidade em períodos experimentais mais longos.

Um fator relevante é a composição dos cimentos testados. Diversos estudos mostram que, até mesmo o radiopacificador utilizado no cimento, pode influenciar significativamente na biocompatibilidade (CHEN et al., 2018; JANINI et al., 2025; SILVA et al., 2014). Para os cimentos testados, em bula (Anexo II) o fabricante não especifica qual radiopacificador é utilizado na composição, apenas para o cimento Endosealer Premium, o fabricante especifica que não contém óxido de bismuto em sua composição.

É importante destacar que, embora tenha sido observado diferença estatística entre o CONTROLE30 e PREMIUM30, as comparações entre CONTROLE30 e os grupos ENDO30 e PLUS30 apresentaram valores de  $p = 0,052$ , muito próximos ao nível de significância estabelecido. Este resultado sugere uma tendência de diferença que pode ter relevância clínica, embora não tenha atingido significância estatística após a correção de Bonferroni. BUENO et al. (2023a) encontraram um resultado similar com relação a biocompatibilidade aos 30 dias, porém notou uma redução significativa no

infiltrado inflamatório aos 60 dias, portanto estudos com períodos maiores poderiam elucidar melhor esta questão. Adicionalmente, estudos de citotoxicidade ou imunohistoquímicos podem complementar e clarificar esses resultados.

A formação de cápsula fibrosa é uma resposta fisiológica do organismo à presença de materiais estranhos e constitui um importante parâmetro para avaliação da biocompatibilidade. No presente estudo, todos os grupos apresentaram cápsula fibrosa espessa aos 7 dias. Aos 30 dias, os grupos CONTROLE30 e PREMIUM30 apresentaram cápsula fibrosa fina, enquanto os grupos ENDO30 e PLUS30 mantiveram cápsula espessa. Estes resultados estão em concordância com Cintra et al. (2017), que observaram cápsula fibrosa espessa aos 7 dias e fina aos 30 dias para o Sealer Plus e controle. A persistência de cápsula fibrosa espessa aos 30 dias nos grupos ENDO30 e PLUS30 pode indicar uma resposta inflamatória mais prolongada ou uma maior reatividade tecidual a estes materiais. Estudos demonstram que a espessura da cápsula fibrosa está correlacionada com a intensidade da resposta inflamatória, densidade vascular e fluxo sanguíneo no tecido capsular (SILVA et al., 2017; DELFINO et al., 2020; ELIAS et al. 2024). A redução da espessura capsular ao longo do tempo, observada no grupo PREMIUM30, sugere melhor integração tecidual e menor reatividade crônica, características desejáveis para um cimento endodôntico.

A coloração de Von Kossa é amplamente utilizada para detecção de depósitos minerais em tecidos, sendo considerada um método sensível e específico para identificação de estruturas calcificadas. O processo de coloração desta técnica é realizado em duas etapas. Na primeira etapa, a prata se liga a depósitos de cálcio gerando uma coloração amarelo claro. Na etapa seguinte, essas lâminas são expostas a luz solar, o que faz com que esse tom amarelo claro escureça e torne-se marrom escuro ou preto, facilitando a identificação de calcificações (VON KOSSA, 1901), porém é uma técnica dependente do ambiente (luz solar) o que pode causar erros metodológicos. No presente estudo, as lâminas foram submetidas a uma técnica aprimorada de controle de luz, baseado no estudo realizado por Criswell em 2025, utilizando

lâmpada de 100 watts com 6500 lumens a 30 centímetros das lâminas por 30 minutos (CRISWELL, 2025).

Suplementando os resultados de Von Kossa, a análise de luz polarizada, avalia a birrefringência a luz polarizada de estruturas cristalinas organizadas, como colágeno maduro e cristais de hidroxiapatita, sendo um indicador adicional de biomineralização, observado em diversos estudos anteriores que avaliaram biomineralização de cimentos endodônticos (BENETTI et al, 2018; BUENO et al. 2016, 2018, 2023a, 2023b; Cintra et al. 2013; GOMES FILHO et al. 2009; GOMES FILHO et al 2012.).

A avaliação da biomineralização por meio da coloração de Von Kossa e análise sob luz polarizada revelou resultados positivos apenas nos grupos Endosealer e Endosealer Premium, tanto aos 7 quanto aos 30 dias. Aos 7 dias, 1 amostra do grupo ENDO7 e 2 amostras do grupo PREMIUM7 apresentaram resultado positivo, enquanto aos 30 dias, 2 amostras de cada um destes grupos foram positivas. Os grupos controle e Endosealer Plus não apresentaram amostras positivas em nenhum período avaliado.

A ausência de biomineralização no grupo Endosealer Plus está relacionada a ausência de hidróxido de cálcio na sua composição. O hidróxido de cálcio é conhecido por sua capacidade de induzir biomineralização através da liberação de íons cálcio e hidroxila, que elevam o pH local e favorecem a precipitação de fosfato de cálcio (HOLLAND et al., 1985; BINNIE et al., 1973; ESTRELA et al., 1995; MIZUNO et al., 2008). Bueno et al. (2023a) demonstraram que o Sealer 26, um cimento contendo hidróxido de cálcio, induziu maior biomineralização que o Sealer Plus e Dia-ProSeal em todos os períodos avaliados, sugerindo que a simples presença de hidróxido de cálcio não garante capacidade de biomineralização, sendo necessário considerar outros fatores como concentração, forma de liberação e interação com a matriz resinosa, dependente da qualidade da espatulação. Isso leva a outro fator que deve ser considerado, é a forma de apresentação desses materiais. Para materiais apresentados como pó e líquido, a manipulação pode influenciar não apenas nas características físicas do material manipulado, mas também nas características biológicas, já que a relação entre o pó que contém hidróxido de

cálcio e o líquido que contém a resina epóxi, pode influenciar na capacidade de biocompatibilidade e biomineralização destes materiais. Conforme bula do fabricante, a recomendação é que seja manipulado na proporção de 3 partes de pó para 1 parte de resina, porém como o material não apresenta colher dosadora, esta medida pode sofrer alterações conforme é manipulada pelo operador (FUSS et al., 2000).

## 6 - CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que todos os cimentos testados foram biocompatíveis nos períodos experimentais avaliados, porém induziram pouca biomineralização, observada apenas em algumas amostras. Estudos de citotoxicidade *in vitro* e imunohistoquímico *in vivo*, além de testes físico-químicos, são recomendados para complementar esses resultados.

## 7 - REFERÊNCIAS

Alghamdi F, Shakir M. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: a systematic review. *Cureus*. 2020 Mar 13;12(3):e7257.

Álvarez-Vásquez JL, Erazo-Guijarro MJ, Domínguez-Ordoñez GS, Ortiz-Garay ÉM. Epoxy resin-based root canal sealers: an integrative literature review. *Dent Med Probl*. 2024 Apr 30;61(2):279-91.

Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020 Nov;46(11):1596-603.

American Association of Endodontists. New materials/technologies position paper. Chicago: American Association of Endodontists; 2013.

Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Dent Traumatol*. 1996 Apr;12(2):66-9.

Balguerie E, van der Sluis L, Vallaey K, Gurgel-Georgelin M, Diemer F. Sealer penetration and adaptation in the dentinal tubules: a scanning electron microscopic study. *J Endod*. 2011 Nov;37(11):1576-9.

Benetti F, Gomes-Filho JE, de Araujo Lopes JM, Barbosa JG, Jacinto RC, Cintra LTA. In vivo biocompatibility and biomineralization of calcium silicate cements. *Eur J Oral Sci.* 2018 Aug;126(4):326-33.

Bhandi S, Al-Kahtani A, Mashyakhy M, Abumelha AS, Alsofi L, Jamal M, et al. Complete obturation—cold lateral condensation vs. thermoplastic techniques: a systematic review of micro-CT studies. *Materials (Basel).* 2021 Jul 18;14(14):4013.

Binnie WH, Mitchell DF. Induced calcification in the subdermal tissues of the rat. *J Dent Res.* 1973 Sep-Oct;52(5):1087-91.

Boucher Y, Matossian L, Rilliard F, Machtou P. Radiographic evaluation of the prevalence and technical quality of root canal treatment in a French subpopulation. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):229-38.

Bueno CRE, Valentim D, Marques VAS, Gomes-Filho JE, Moraes JCS, Cintra LTA, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. *Braz Oral Res.* 2016 Nov 21;30(1):e81.

Bueno CRE, Vasques AMV, Cury MTS, Sivieri-Araujo G, Jacinto RC, Gomes-Filho JE, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clin Oral Investig.* 2019 Jan;23(1):169-77.

Bueno CRE, Benetti F, Cury MTS, Vasques AMV, Cosme-Silva L, Queiroz ÍOA, et al. Biological investigation of resinous endodontic sealers containing calcium hydroxide. *PLoS One.* 2023 Jul 6;18(7):e0287890.

Bueno CRE, Sarmiento JL, Vasques AMV, et al. Biocompatibility, Biomineralization and Induction of Collagen Maturation with the Use of Calcium Hydroxide and Iodoform Intracanal Dressing. *J Funct Biomater.* 2023;14(10):507.

Burns LE, Kim J, Wu Y, Alzwaideh R, McGowan R, Sigurdsson A. Outcomes of primary root canal therapy: an updated systematic review of longitudinal clinical studies published between 2003 and 2020. *Int Endod J.* 2022 Oct;55(10):1077-91.

Campello AF, Almeida BM, Franzoni MA, Alves FRF, Marceliano-Alves MF, Rocas IN, et al. Unprepared surface areas, accumulated hard tissue debris, and dentinal crack formation after preparation using reciprocating or rotary instruments: a study in human cadavers. *Clin Oral Investig.* 2021 Nov;25(11):6239-48.

- Chen YZ, Lü XY, Liu GD. Effects of different radio-opacifying agents on physicochemical and biological properties of a novel root-end filling material. *PLoS One*. 2018;13(2):e0191123. Published 2018 Feb 8.
- Cintra LT, de Moraes IG, Estrada BP, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod*. 2006 Jun;32(6):556-9.
- Cintra LT, Ribeiro TA, Gomes-Filho JE, Bernabé PF, Watanabe S, Facundo AC, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dent Traumatol*. 2013 Apr;29(2):145-50.
- Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, et al. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J Endod*. 2017 Dec;43(12):2088-92.
- Criswell S. Von Kossa calcium staining procedure revisited. *J Histochem Cytochem*. 2025 Jan;73(1):1-6.
- da Silva LAB, Pieroni KA, Nelson-Filho P, Silva RAB, Hernández-Gatón P, Lucisano MP, et al. Novel endodontic sealers induced satisfactory tissue response in mice. *Biomed Pharmacother*. 2018 Oct;106:1506-12.
- Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci Rep*. 2020;10(1):7173. Published 2020 Apr 28
- Dioguardi M, Gioia GD, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G. Comparison of endodontic failures between nonsurgical retreatment and endodontic surgery: systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Jul 4;58(7):894.
- Dioguardi M, Gioia GD, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. *Dent J (Basel)*. 2019 May 1;7(2):47.
- Duarte MA, Demarchi ACO, 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 Endod*. 2003 Mar;95(3):345-7.
- Ducret M, Fabre H, Farges JC, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Current challenges in human tooth revitalization. *Biomed Mater Eng*. 2017 Mar 30;28(s1):S159-68.

- Eddy RS, Wesselink PR, Winkelhoff AJ. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. *J Endod.* 2005 Sep;31(9):672-5.
- Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Mar;103(3):e86-91.
- Elias VV, Lima RB, Lucisano MP, Araujo LDC, Pucinelli CM, Nelson-Filho P, et al. Inflammatory response to bioceramic and epoxy resin-based endodontic sealers implanted in mice subcutaneous tissue: an in vivo study. *Microsc Res Tech.* 2024 Nov;87(11):2693-702.
- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe O Jr. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995;6(2):85-90.
- Frisk F. Epidemiological aspects on apical periodontitis. Studies based on the Prospective Population Study of Women in Göteborg and the Population Study on Oral Health in Jönköping, Sweden [dissertation]. Göteborg: University of Gothenburg; 2007.
- Fuss Z, Charniaque O, Pilo R, Weiss E. Effect of various mixing ratios on antibacterial properties and hardness of endodontic sealers. *J Endod.* 2000;26(9):519-522.
- Gatewood RS. Endodontic materials. *Dent Clin North Am.* 2007 Jul;51(3):695-712.
- Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod.* 2009 Feb;35(2):256-60.
- Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX. *Dent Traumatol.* 2012 Dec;28(6):452-6.
- Gomes-Filho JE, de Moraes Costa MM, Cintra LT, Duarte PC, Facundo AC, Fatima A, et al. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):250-4.
- Gomes-Filho JE, de Moraes Costa MT, Cintra LT, Duarte PC, Takamiya AS, Faria MD, et al. Evaluation of alveolar socket response to Angelus MTA and experimental light-cure MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Jul;110(1):93-7.

Gomes-Filho JE, de Azevedo Queiroz IO, Watanabe S, da Silva Santos LM, Lodi CS, Okamoto R, et al. Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization. *Dent Traumatol*. 2015 Feb;31(1):67-72.

Gutmann JL. Adaptation of injected thermoplasticized gutta-percha in the absence of the dentinal smear layer. *Int Endod J*. 1993 Mar;26(2):87-92.

Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 May;91(5):579-86.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Bernabé PFE, Dezan-Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999 Mar;25(3):161-6.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé F, Filho JA, Junior ED, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod*. 2002 Mar;28(3):173-6.

Holland R, Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod*. 1985 Dec;11(12):535-43.

Howland JL. Microbial physiology and metabolism. *Biochem Educ*. 1995 Apr;23(2):106.

Inada RNH, Silva ECA, Lopes CS, Queiroz MB, Torres FFE, da Silva GF, et al. Biocompatibility, bioactivity, porosity, and sealer/dentin interface of bioceramic ready-to-use sealers using a dentin-tube model. *Sci Rep*. 2024 Jul 3;14(1):15298.

International Organization for Standardization. Dentistry—preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials: ISO/TR 7405-1997(E). Geneva: ISO; 1997.

International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation: ISO 10993-6. Geneva: ISO; 2007.

Janini ACP, Moraes BF, Pelepenko LE, et al. Physicochemical properties and biological interaction of calcium silicate-based sealers - in vivo model. *Clin Oral Investig*. 2025;29(1):86. Published 2025 Jan 25.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Sep 1;15(5):308-20.

- Khandelwal A, Karthik J, Nadig P, Jain A, Ginjupalli K, Upadhya N. Periapical healing following root canal treatment using different endodontic sealers: a systematic review. *Biomed Res Int.* 2022 Jul 8;2022:5179027.
- Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica.* 5ª ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan; 2020.
- Meloan S, Puchtler H. Chemical mechanisms of staining methods—Von Kossa's technique: what von Kossa really wrote and a modified reaction for selective demonstration of inorganic phosphates. *J Histotechnol.* 1985;8(1):11-3.
- Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J.* 2008 Nov;41(11):933-8.
- Ng YL, Mann V, Gulabivala K. Outcome of secondary root canal treatment: a systematic review of the literature. *Int Endod J.* 2008 Dec;41(12):1026-46.
- Okamoto M, Matsumoto S, Moriyama K, Huang H, Watanabe M, Miura J, et al. Biological evaluation of the effect of root canal sealers using a rat model. *Pharmaceutics.* 2022 Sep 24;14(10):2038.
- Olsson B, Sliwowsky A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981 Aug;7(8):355-69.
- Ørstavik D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endod Topics.* 2005 Nov;12(1):25-38.
- Pedro FM, Marques A, Pereira TM, Bandeca MC, Lima S, Kuga MC, et al. Status of endodontic treatment and the correlations to the quality of root canal filling and coronal restoration. *J Contemp Dent Pract.* 2016 Oct 1;17(10):830-6.
- Peters OA, Paqué F. Root canal preparation of maxillary molars with the self-adjusting file: a micro-computed tomography study. *J Endod.* 2011 Jan;37(1):53-7.
- Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019 May 1;24(3):e364-72.
- Primus CM, Tay FR, Niu LN. Bioactive tri/dicalcium silicate cements for treatment of pulpal and periapical tissues. *Acta Biomater.* 2019 Sep 15;96:35-54.

Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry*. 1978 Jun;56(3-4):177-85.

Safavi K, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod*. 1993 Feb;19(2):76-8.

Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J*. 2004 Mar;37(3):193-8.

Sampaio G, Pereira KF, Oliveira PHC, Zancoppe K, Dechichi P, Soares PBF. Tissue repair capacity of bioceramic endodontic sealers in rat subcutaneous tissue. *Braz Dent J*. 2023 Jun;34(3):25-32.

Saxena P, Gupta SK, Newaskar V. Biocompatibility of root-end filling materials: recent update. *Restor Dent Endod*. 2013 Aug;38(3):119-27.

Schneider MR. Von Kossa and his staining technique. *Histochem Cell Biol*. 2021 Dec;156(6):523-6.

Silva LAB, Azevedo LU, Consolaro A, et al. Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue. *Clin Oral Investig*. 2017;21(9):2851-2861.

Silva GF, Bosso R, Ferino RV, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(12):4336-4345

Silveira CM, Pinto SC, Zedebski Rde A, Santos FA, Pilatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J*. 2011;22(1):21-7.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod*. 1999 Jan;25(1):14-6.

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

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Aug;96(2):215-22.

- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Oliveira JC, Santos KR. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod.* 2000 May;26(5):274-7.
- Siqueira JF Jr, Alves FR, Versiani MA, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, et al. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res.* 2018 Oct 18;32(suppl 1):e65.
- Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: the usual suspects. *Eur J Dent.* 2016 Jan-Mar;10(1):144-7.
- Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod.* 2014 May;40(5):670-7.
- Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants part I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966 Mar;21(3):379-87.
- van der Sluis LWM, Wu MK, Wesselink PR. An evaluation of the quality of root fillings in mandibular incisors and maxillary and mandibular canines using different methodologies. *J Dent.* 2005 Sep;33(8):683-8.
- Van Nieuwenhuysen JP, D'Hoore W, Leprince JG. What ultimately matters in root canal treatment success and tooth preservation: a 25-year cohort study. *Int Endod J.* 2023 Nov;56(11):1279-92.
- Vertuan GC, Duarte MAH, Bramante CM, Vivan RR, Rosseto MB, Hungaro Duarte MA, et al. Evaluation of physicochemical properties of a new root canal sealer. *J Endod.* 2018 Mar;44(3):501-5.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):79-84.
- Von Kossa J. Ueber die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol.* 1901;29:163-202.
- Williams DF. Biocompatibility pathways and mechanisms for bioactive materials: the bioactivity zone. *Bioact Mater.* 2022 Apr;10:306-22.
- Wong AWY, Zhang S, Li SKY, Zhu X, Zhang C, Chu CH. Clinical studies on core-carrier obturation: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health.* 2017 Dec 19;17(1):167.

Wu MK, R'oris A, Barkis D, Wesselink PR. Prevalence and extent of long oval canals in the apical third. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Jun;89(6):739-43.

Zamparini F, Prati C, Taddei P, Spinelli A, Di Foggia M, Gandolfi MG. Chemical-physical properties and bioactivity of new premixed calcium silicate-bioceramic root canal sealers. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 18;23(22):14351.

## 8 - ANEXOS

### - Anexo I – Certificado CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da resposta inflamatória e capacidade de biomineralização de cimentos endodônticos resinosos**", Processo FOA nº 131-2025, sob responsabilidade de Carlos Roberto Emerenciano Bueno apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de março de 2025.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 11 de maio de 2026.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 11 de junho de 2026.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Inflammatory and biomineralization assessment of resinous endodontic sealers**", Protocol FOA nº 131-2025, under the supervision of Carlos Roberto Emerenciano Bueno presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 19, 2025.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** May 11, 2026.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** June 11, 2026.

**Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

## - Anexo II – Bula fornecida pelo fabricante

### **ENDOSEALER - Root canal sealant**

#### **PRESENTATION:**

1 Bottle with 8 g of Endosealer powder and 1 tube with 9 g of Endosealer resin.

#### **DESCRIPTION:**

Endosealer is a product designed for root canal obturation, with adequate setting time and radiopacity for clinical application. It is presented in powder and resin form for easy handling.

#### **INDICATION:**

Endosealer is a product indicated for root canal obturation.

#### **COMPOSITION:**

Powder: Calcium hydroxide, amine and radiopacifiers. Resin: Epoxy resin.

#### **MODE OF USE:**

1. The product must be manipulated in a glass plate or spatulation block. To do so, deposit an amount of powder intended for clinical work and add the amount of resin to the product. With a spatula, incorporate the powder into the resin. Homogenize until a smooth, yellowish mass is obtained; 2. Add powder or resin until the consistency of the product is 1.5 to 2.5 cm above the glass plate when manipulated with the spatula. The product should form a thread when pulled in the opposite direction to the glass plate. The average ratio is approximately 3 parts powder to 1 part resin by volume; 3. Dry the root canal to be worked. Endosealer cement should be introduced directly into the root canal with the aid of an endodontic instrument such as files, lentulo spiral or even the main gutta-percha cone; 4. If you want to make the material flow more, gently heat the glass plate and bring the material into contact; 5. Clean the glass plate, spatula and other instruments immediately after use.

**Note 1:** When using hydrogen peroxide as an irrigation solution, reirrigation with sodium hypochlorite and saline solution, followed by complete drying, should be done prior to application of the Endosealer. **Setting time:** The setting time refers to the time from the beginning of application (mixing of powder + resin) to complete hardening of the product. At temperatures up to 25 °C the product sets in up to 60 hours. On the other hand, at body temperature, the maximum polymerization time is 24 hours after the start of application.

### **ENDOSEALER PLUS - Root Canal Sealant**

#### **DESCRIPTION**

Endosealer Plus is a root canal sealer with an epoxy-amine resin reaction system with outstanding physical and chemical properties. It features a homogenization system in auto-mixing tips, making it possible to apply it directly into the root canal, saving time and material. It has excellent radiopacity, favoring observation of the clinical field in radiographic images.

#### **PRESENTATION**

1 Double-body syringe with 15 g and 10 application tips.

#### **INDICATION**

Endosealer Plus is a product intended for the permanent filling of root canals, in combination with gutta percha cones.

#### **COMPOSITION**

Amber paste: fillers, amines, radiopacifiers, solvents and stabilizers.  
White paste: fillers, epoxy resin, radiopacifiers, solvents and stabilizers.

#### **MODE OF USE**

The syringe and tips cannot be reprocessed. In all procedures in which Endosealer Plus is used, the professional must wear protective gloves and goggles.

#### **Cavity preparation**

Before applying the material, the root canals must be prepared, properly cleaned and dried. In all these procedures, the techniques intrinsic to endodontics should be used.

**Note 1:** Note 1: Before fitting the auto-mixing tips, a little material should be dispensed onto a surface until the white and amber pastes flow in the same proportion. If the professional does not do this, the product may not set properly and the clinical application may be compromised.

**Note 2:** When hydrogen peroxide is used as an irrigation solution, a new irrigation with sodium hypochlorite and saline solution should be carried out, followed by complete drying, before Endosealer Plus is applied.

#### **Root canal sealant**

1. Remove the cap by pressing down and turning 90° at the same time.
2. To assemble the applicator tip, fit the auto-mixing tip and then the intracanal tip. The tip has a single-position adaptation system so as not to mix the pastes inappropriately.
3. After attaching the applicator tip, the material is available for clinical application.
4. Carefully press down on the syringe plunger and the two pastes will automatically homogenize in the cannula of the auto-mixing tip.
5. After application, replace the syringe cap and sanitize the system with 70% alcohol.
6. This product should be used with gutta percha cones.

#### **Setting time**

Timing refers to the time from the start of application (auto-mixing tip) to complete hardening of the product. At temperatures up to 25 °C, the product sets within 60 hours. On the other hand, at body temperature (36 - 37 °C), the maximum reaction time is 24 hours after the start of application.

### **ENDOSEALER PREMIUM - Root canal**

#### **PRESENTATION:**

1 Bottle of Endosealer Premium powder with 8 g and 1 tube of Endosealer Premium resin with 9 g.

#### **DESCRIPTION:**

Endosealer Premium is a product intended for root canal obturation, with adequate setting time and radiopacity for clinical application. Its composition without bismuth radiopacifiers allows safer clinical procedures, without darkening and graying in the post cure.

#### **INDICATION:**

Endosealer Premium is a product indicated for root canal obturation.

#### **COMPOSITION:**

Powder: Calcium hydroxide, amine and radiopacifiers.  
Resin: Epoxy resin.

#### **MODE OF USE:**

1. The product must be manipulated in a glass plate or spatulation block. To do so, deposit an amount of powder intended for clinical work and add the amount of resin (resin) to the product. With a spatula, incorporate the powder into the resin. Homogenize until a smooth, yellowish mass is obtained.

2. Add powder or resin until the consistency of the product is 1.5 to 2.5 cm above the glass plate when manipulated with the spatula. The product should form a thread when pulled in the opposite direction to the glass plate. The average ratio is approximately 3 parts powder to 1 part resin by volume.

3. Dry the root canal to be worked. Endosealer Premium cement should be introduced directly into the root canal with the aid of an endodontic instrument such as files, lentulo spiral or even the main gutta-percha cone.

4. If you want to make the material flow more, gently heat the glass plate and bring the material into contact.

5. Clean the glass plate, spatula and other instruments immediately after use.

**Note 1:** When using hydrogen peroxide as an irrigation solution, reirrigation with sodium hypochlorite and saline solution, followed by complete drying, should be done prior to application of the Endosealer Premium.

**Setting time:** The setting time refers to the time from the beginning of application (mixing of powder + resin) to complete hardening of the product. At temperatures up to 25 °C the product sets in up to 60 hours. On the other hand, at body temperature, the maximum polymerization time is 24 hours after the start of application.